

2. METHODIK

Von November 2001 bis Ende März 2002 wurden 344 Schwangere überwiegend im 2. Trimenon in 48 Berliner Frauenarztpraxen einmalig zu ihrem Nikotin- und Alkoholkonsum befragt. Zusätzlich wurden Blut- und Urinuntersuchungen zum Alkohol- bzw. Nikotinkonsum durchgeführt. Dabei arbeitete die Autorin der vorliegenden Ausführungen zum Nikotinkonsum mit der Doktorandin Cornelia Milto zusammen, welche über den Alkoholkonsum berichtet. Die Leitung der Studie hatte Frau Professor Renate Bergmann der Klinik für Geburtsmedizin des Virchow-Klinikums (Charité Berlin).

2.1 Auswahl der Probandinnen

Es wurden an alle niedergelassenen Berliner Gynäkologen Informationsbriefe verschickt, die eine Rückantwort-Karte enthielten. Gleichzeitig wurden die Ärzte telefonisch über das Vorhaben aufgeklärt. Circa 80 Praxen (von 520) waren zur Teilnahme bereit. Es wurden vornehmlich jene mit einem hohen Anteil an schwangeren Patientinnen in die Studie aufgenommen, und es wurde versucht, eine gleichmäßige Verteilung in den Berliner Stadtbezirken zu erreichen, um damit wenigstens ungefähr die Bevölkerungsstruktur widerzuspiegeln .

Die Teilnahme an der Studie war freiwillig und erfolgte ohne finanzielle Aufwandsentschädigung. Als Anreiz für die Arztpraxen wurden die entnommenen Laborwerte, inklusive eines kleinen Blutbildes und der Alkoholbiomarker zur Verfügung gestellt. Die Schwangeren erhielten die Blut-Messwerte umgehend in einem anonymisierten verschlossenen Umschlag und konnten die erst später bestimmten Cotinin-Werte erfragen. Somit erhielten sie einen Eindruck der vermutlichen Belastung des Kindes durch Alkohol und Nikotin.

Auf der Grundlage der Bevölkerungsverteilung in den Berliner Bezirken (Statistisches Landesamt Berlin, Juli 2001) wurden in den drei größten Bezirken je fünf Praxen, in den nächst kleineren Bezirken je vier Praxen und im kleinsten Bezirk drei Praxen in die Studie eingeschlossen.

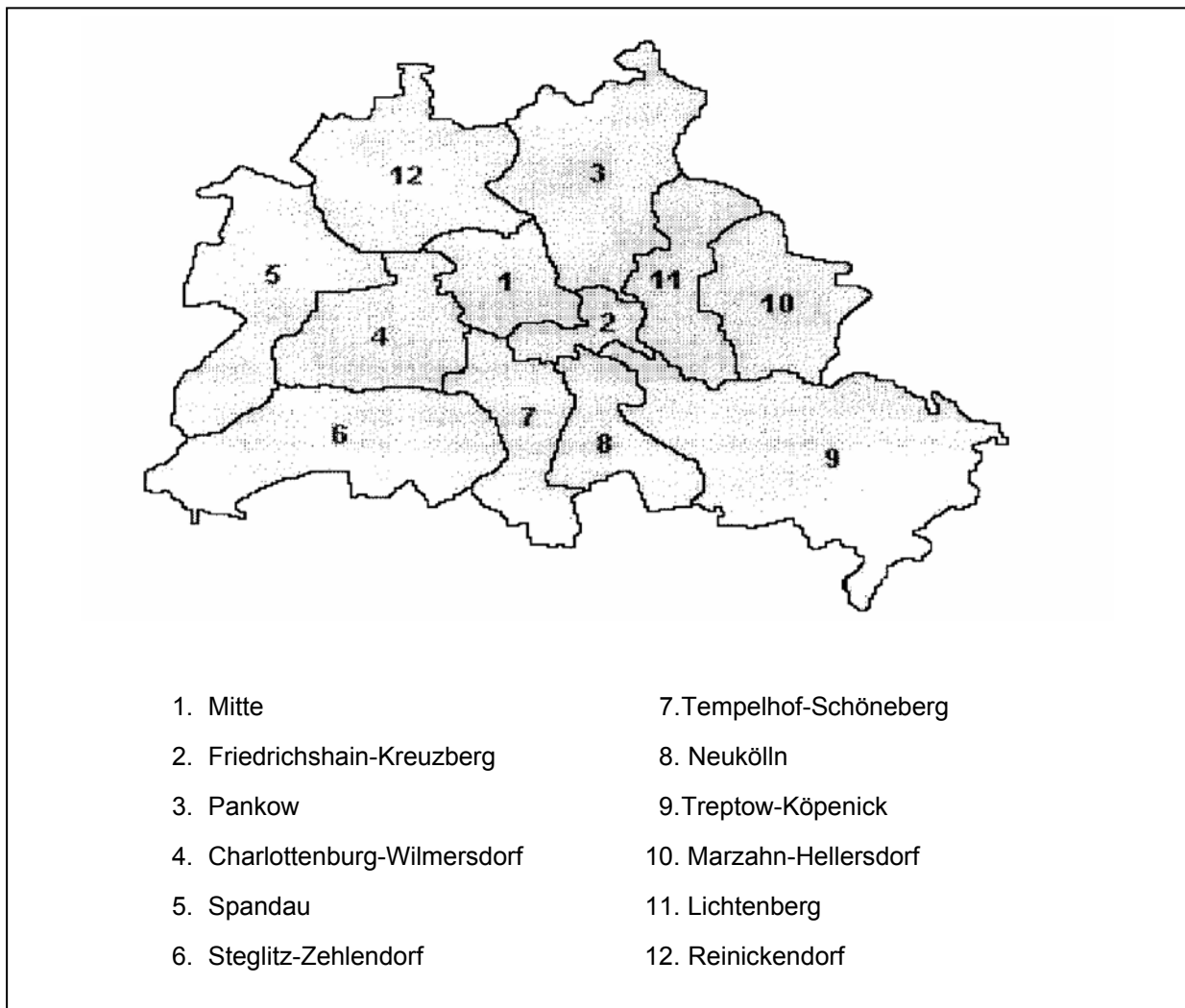


Abb. 2: Berliner Stadtbezirke

In einem persönlichen Gespräch wurden die Arztpraxen über den Studienablauf informiert. Sie erhielten dabei eine Mappe mit den notwendigen Materialien, dies waren pro Patientin:

1. Ein Anschreiben, in dem über Ziel und Durchführung der Untersuchung informiert wurde.
2. Der Fragebogen, versehen mit einer Probandennummer. Diese konnte nur von der jeweiligen Arztpraxis entschlüsselt werden.
3. Ein Set für die Blutentnahme und die Urinprobe, ebenfalls anonymisiert.

Außerdem erhielten sie ein Merkblatt über den Ablauf der Studie und eine Strichliste, in die teilnehmende und nicht teilnehmende Patientinnen von den PraxismitarbeiterInnen einzutragen waren.

Die Anschreiben an die Patientinnen zur Information über die Studie wurden ihnen am

Termin zum Antikörpersuchtest im 2. Trimenon von den Praxismitarbeiterinnen überreicht. Die teilnehmenden Patientinnen füllten dann in der Praxis den Fragebogen aus und gaben eine Urinprobe ab. Die Blutentnahme erfolgte gekoppelt an die Blutabnahme zum Antikörpersuchtest.

2.2 Fragebogen

Der Fragebogen (siehe Anhang) wurde aus validierten Testbögen (Fagerström 1978, 1989; Heatherton, Kozlowski 1991, Russell et al.1996) und eigenen Fragen in Zusammenarbeit mit dem Sozialwissenschaftler Herrn Rolf Richter entworfen. Er besteht aus 36 Fragen und ist in drei Abschnitte untergliedert.

- Der erste Teil enthält 15 Fragen zum Gesundheitszustand und zu sozialen Faktoren: chronische Krankheiten, vorangegangene Schwangerschaften, Alter, Nationalität, Familienstand, Bildung, Erwerbstätigkeit.
- Im zweiten Abschnitt mit 10 Fragen wird nach dem Rauchverhalten bzw. der Nikotinabhängigkeit gefragt. Dazu wurde das Fagerström-Toleranz-Questionnaire (siehe Anhang) übernommen; in diesem wird der Grad der Nikotinabhängigkeit anhand der Häufigkeit und Menge gerauchter Zigaretten ermittelt. Außerdem wird gefragt, inwieweit die Schwangerschaft das Rauchverhalten beeinflusst hat und ob der Partner Raucher ist.
- Der dritte Teil des Fragebogens widmet sich dem Genuss von Alkohol. Diese 11 Fragen zum Alkoholkonsum werden in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt.

2.3 Fagerström-Test

Der Fagerström-Test ist ein standardisierter, validierter Fragebogen zum Nikotinkonsum. Er besteht aus sechs Fragen, deren Antworten eine bestimmte Punktzahl zugeordnet wird. Die einzelnen Punktwerte werden dann addiert und mit einer Skala von 0-10 verglichen, wobei 0 eine sehr geringe und 10 eine sehr starke Nikotinabhängigkeit bedeuten (siehe Abbildung 3).

| Frage | Antwort | Punkte |
|--|------------------------------|--------|
| 1. Wie viele Zigaretten rauchen Sie pro Tag? | Über 30 | 3 |
| | 21-30 | 2 |
| | 11-20 | 1 |
| | 1-10 | 0 |
| 2. Wann rauchen Sie nach dem Aufstehen Ihre erste Zigarette? | Innerhalb von 5 min | 3 |
| | Nach 6-30 min | 2 |
| | Nach 31-60 min | 1 |
| | Nach mehr als 1 Stunde | 0 |
| 3. Rauchen Sie in den ersten Stunden nach dem Aufstehen mehr Zigaretten als am Rest des Tages? | Ja | 1 |
| | Nein | 0 |
| 4. Fällt es Ihnen schwer, ein Rauchverbot einzuhalten? | Ja | 1 |
| | Nein | 0 |
| 5. Auf welche Zigarette möchten Sie am wenigsten verzichten? | Die erste nach dem Aufstehen | 1 |
| | Eine andere | 0 |
| 6. Rauchen Sie gelegentlich auch, wenn Sie wegen einer Erkrankung im Bett liegen? | Ja | 1 |
| | Nein | 0 |
| Gesamtpunktzahl | | |

Gesamtpunktzahl

 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

 Geringe Nikotin- Starke Nikotin-
abhängigkeit abhängigkeit

Abb. 3: Fagerströmtest

2.4 Gewinnung und Transport der Blut- und Urinproben

Um den Ablauf so komplikationslos wie möglich zu gestalten, wurde die Blutentnahme mit der Abnahme zum 2. Antikörpersuchtest gekoppelt. Dieser findet gewöhnlich zwischen der 22. und der 30. Schwangerschaftswoche statt. Ebenfalls an diesem Tag wurde die Urinprobe von der Probandin abgegeben und dann sofort eingefroren und gelagert.

Die Urinproben wurden bei -20°Celsius im Labor 28 für einige Monate gelagert und dann tiefgekühlt durch die Autorin in die Universitätsklinik Rostock transportiert. Dort wurden sie unter der Leitung von Herrn Dr. Günter Merkel in der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene mittels standardisierter Messverfahren untersucht (siehe 2.5).

Die Ergebnisse der Laboruntersuchungen wurden an die Praxen übergeben und von diesen an die Patientinnen weitergereicht. Die Ausdrucke wurden ihnen jeweils in einem verschlossenen anonymisierten Umschlag überreicht. So konnten die Patientinnen selbst darüber entscheiden, ob sie die Ergebnisse mit ihrem Arzt oder den Mitarbeitern der Forschungsgruppe besprechen wollten. Durch die Aussicht, nicht bloßgestellt zu werden, sollte auch für Alkohol konsumierende Schwangere die Hürde, an der Studie teilzunehmen, möglichst gering gehalten und somit eine möglichst hohe Rücklaufquote erzielt werden. Die Ergebnisse der Cotininbestimmung wurden gesammelt und an die jeweilige Praxis übergeben. Zur Interpretation konnten die Probandinnen telefonisch Kontakt zu unserer Forschungsgruppe aufnehmen.

2.5. Laborbestimmungen

Die Untersuchung der Blutproben erfolgte im „Labor 28“ in Berlin. Da sich die vorliegende Arbeit mit Nikotin in der Schwangerschaft befasst, wird auf die im Blut bestimmten Alkoholmarker an dieser Stelle nicht weiter eingegangen.

Anhand der Urinproben wurden Nikotin und Cotinin als Abbauprodukt von Nikotin mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) in Rostock bestimmt. Als Grundlage diente die von Merkel modifizierte Methode nach Hariharan und Noord (Hariharan und van Noord 1991, Merkel 1992).

2.5.1 Arbeitsanweisung zur Vorbereitung der Urinproben

Die Urinproben werden schonend bei Kühlschranktemperatur (4°Celsius) über Nacht aufgetaut und danach zur Homogenisierung kurz geschüttelt. Je 1 ml Urin wird in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gefüllt. Zugegeben werden

50 µl interner Standard (N-Ethyl-Norcotinin)

200 µl 12,5 molares Kaliumhydroxid

500 µl Dichlormethan.

Dieses Gemisch wird 30 Sekunden im Gyrator geschüttelt und dann 20 Minuten lang bei 14000 U/min zentrifugiert. Nun wird einmal mit Deionat aufgefüllt und das Wasser fast vollständig abgesaugt. Danach wird die Dichlormethan-Phase in ein 0,5 ml Safe Lock Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt.

Nach Zugabe von 80 µl 0,1 molarer Schwefelsäure 30 s Schütteln im Gyrator und Zentrifugieren für 2 Minuten. Die obere wässrige Phase wird in ein 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gefüllt.

Wenn die Probe klar ist, wird sie mit 8 µl 4-molarem Natriumacetat 0,3% versetzt (dieses vorher in die Reaktionsgefäße geben), kurz geschüttelt und zur Messung in das HPLC-Gerät gegeben.

Wenn die Probe noch nicht klar ist, wird sie nochmals für 1 Minute zentrifugiert, und die obere wässrige Phase wird in 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße, die die genannte Acetatlösung enthalten, überführt, kurz geschüttelt und zur Messung ins HPLC-Gerät gegeben.

2.5.2 Messung mit Hilfe der HPLC

Die HPLC erfolgt an einer Shimadzu-HPLC-Anlage (Kyoto, Japan). Als Trennsäule dient eine 250 x 3 mm Nucleosil 300-3 C4-Trennsäule der Firma Macherey-Nagel (Düren). Die mobile Phase besteht aus einer Wasser-/Acetonitril-Mischung mit Zusätzen von Natrium-Heptansulfonat, Triethylamin, Dikaliumhydrogenphosphat, Zitronensäure und Natriumazid. Die UV-Detektion wird bei 256 nm vorgenommen.

Die Auswertung erfolgt über die Quotienten der Peakhöhen Nikotin/Standardlösung bzw. Cotinin/Standardlösung. Zur Überprüfung der Kalibrierung wird außer einer Blindprobe (Urinprobe ohne Nikotin bzw. Cotinin) nach jeweils 25 Proben eine Kontroll-Urinprobe mit je 30 ng/ml Cotinin und Nikotin mitgeführt.

Zur Datenerfassung und -auswertung wird die Chromeleon-Software (Version 6.11) der Firma Dionex (Idstein) verwendet.

Die Empfindlichkeit (Nachweisgrenze) lag bei 4 ng/ml für Cotinin und 2 ng/ml für Nikotin.

Die Cotininwerte wurden nach Jatlow (2003) und Thompson (1990) auf Kreatinin bezogen. Dafür wurde Kreatinin nach der Jaffé-Methode aus dem Urin bestimmt und

der Quotient aus dem Cotinin- und Kreatininwert gebildet:

$$\frac{\left(\frac{\text{ng}}{\text{ml}}\right)}{\left(\frac{\text{mmol}}{\text{l}}\right)} = \frac{\left(\frac{\mu\text{g}}{\text{l}}\right)}{\left(\frac{\text{mmol}}{\text{l}}\right)} = \frac{\mu\text{g}}{\text{mmol}} .$$

Zur Unterscheidung zwischen Nicht-/Passiv- und Aktivraucherinnen wurde zunächst der Schwellenwert von 28 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ nach Greaves et al. (2001) verwendet, wobei unter aktiv rauchen ein regelmäßiger, aktiver Zigarettenkonsum verstanden wird.

2.6 Dateneingabe

Die Daten aus den Fragebögen wurden mittels einer durch das Institut für medizinische Biometrie (Leiter: Prof. Dr. Wernecke) erstellten Maske in einer Excel-Datei erfasst. Dabei wurden die Fragebogen-Angaben numerisch kodiert und die Laborwerte absolut übernommen. Die ersten 50 Datensätze wurden doppelt von den beiden Autorinnen der Studie eingegeben, um zu testen, wie groß die Fehlerbreite durch Eingabefehler ist. Da diese sehr gering war, konnte im Weiteren davon ausgegangen werden, dass dies eine zu vernachlässigende Fehlerquelle sei, so dass die übrigen Datensätze einfach eingegeben wurden.

2.7 Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels SPSS Version 10.1. Zum Vergleich der soziodemographischen Merkmale der Stichprobe mit denen der Berliner und der deutschen Bevölkerung wurde der Chi^2 -Test, bzw. bei dichotomen Variablen Fisher's exakter Test verwendet. Korrelationen von Ordinalmaßen wie Altersgruppe, Schulbildung, Einkommensgruppe usw. mit den subjektiven Angaben und den Laborwerten zum Nikotinkonsum wurde mittels Kendall's Tau b errechnet. Korrelationen von Nominalmaßen wie Familienstatus, Rauchverhalten des Partners und Gesundheitszustand mit dem Rauchverhalten der Schwangeren wurden mittels Chi^2 -Test ermittelt.

Für die Analyse der Beziehung von metrischen Variablen zueinander und deren Signifikanz wurden Pearson's Produkt-Moment-Korrelation, bzw. bei nicht normal

verteilten metrischen Variablen Spearman's Rangkorrelation benutzt. Bei dem Vergleich der subjektiven Angaben zum Tabakkonsum mit den Laborwerten wurde überwiegend Kendall's Tau b verwendet, zur Überprüfung der mittleren Ränge der einzelnen Rauchgruppen der Kruskal-Wallis-Test und der Mann-Whitney-Test. Mittelwerte für zwei Gruppen wurden mit dem t-Test bzw. dem Mann-Whitney-U-Test (für nicht normal verteilte metrische Variablen) und für mehrere Gruppen mit der univariaten Varianzanalyse mit anschließendem Bonferroni-Test verglichen.

Zur Bestimmung eines Cotinin-Schwellenwertes zur Unterscheidung zwischen Aktiv- und Passivrauchen wurden ROC-Kurven (Receiver-Operator-Charakteristik) verwendet.

Im Ergebnisteil wurde $p < 0,05$ als signifikant bezeichnet. Die Statistische Auswertung erfolgte mit der Hilfe des Sozialwissenschaftlers Rolf Richter.