

3. BEDINGUNGEN FÜR DIE EIGENEN UNTERSUCHUNGEN

3.1. Die DONALD (Dortmund Nutritional Anthropometrical Longitudinally Designed) Studie

Die Donald-Studie ist eine seit August 1985 fortlaufende Studie, in der gesunde Säuglinge, Kinder und Jugendliche in einer Altersspanne von 3 Monaten bis 18 Jahren im Längsschnitt untersucht werden (Kersting et al., 1998). Es werden hauptsächlich Wechselwirkungen zwischen Ernährungsfaktoren sowie Stoffwechsel- und Wachstumsparametern untersucht. Zusätzlich werden aktuelle Entwicklungen ernährungsabhängiger Variablen sowie die Versorgung an einzelnen Nährstoffen analysiert.

An der DONALD-Studie, einer nicht repräsentativen, gemischt longitudinalen Studie, nehmen ca. 500 Jungen und Mädchen regelmäßig teil. Die Teilnehmer stammen aus Dortmund und seiner näheren Umgebung, wobei zwischen 30 und 50 Probanden jährlich die Studie verlassen. Jedoch bleibt die Teilnehmerzahl durch ebenso viele "Neueinsteiger" weitgehend konstant. Kinder werden entweder durch direkte Ansprache von Müttern mit Neugeborenen in Entbindungskliniken oder aufgrund persönlicher Empfehlungen teilnehmender Familien im Freundes- und Bekanntenkreis rekrutiert.

Die Kinder und Jugendlichen werden in einjährigen Abständen, meistens nahe ihres Geburtstages, ärztlich und anthropometrisch untersucht. Nach einer Wäge-Protokollmethode wird ergänzend zum Besuchstermin ein 3-Tages-Ernährungsprotokoll erstellt (Chahda, 1987). Ab einem Alter von 3 Jahren sammeln die Kinder 24h-Urine. Der Blutdruck ab dem vierten Lebensjahr wird zu definierten Terminen gemessen. Während der Pubertät erfolgen zusätzliche ärztliche und anthropometrische Untersuchungen in halbjährlichen Abständen. Der Studienaufbau mit Zeitplan der Untersuchungen ist in **Abbildung 7** zusammengefasst.

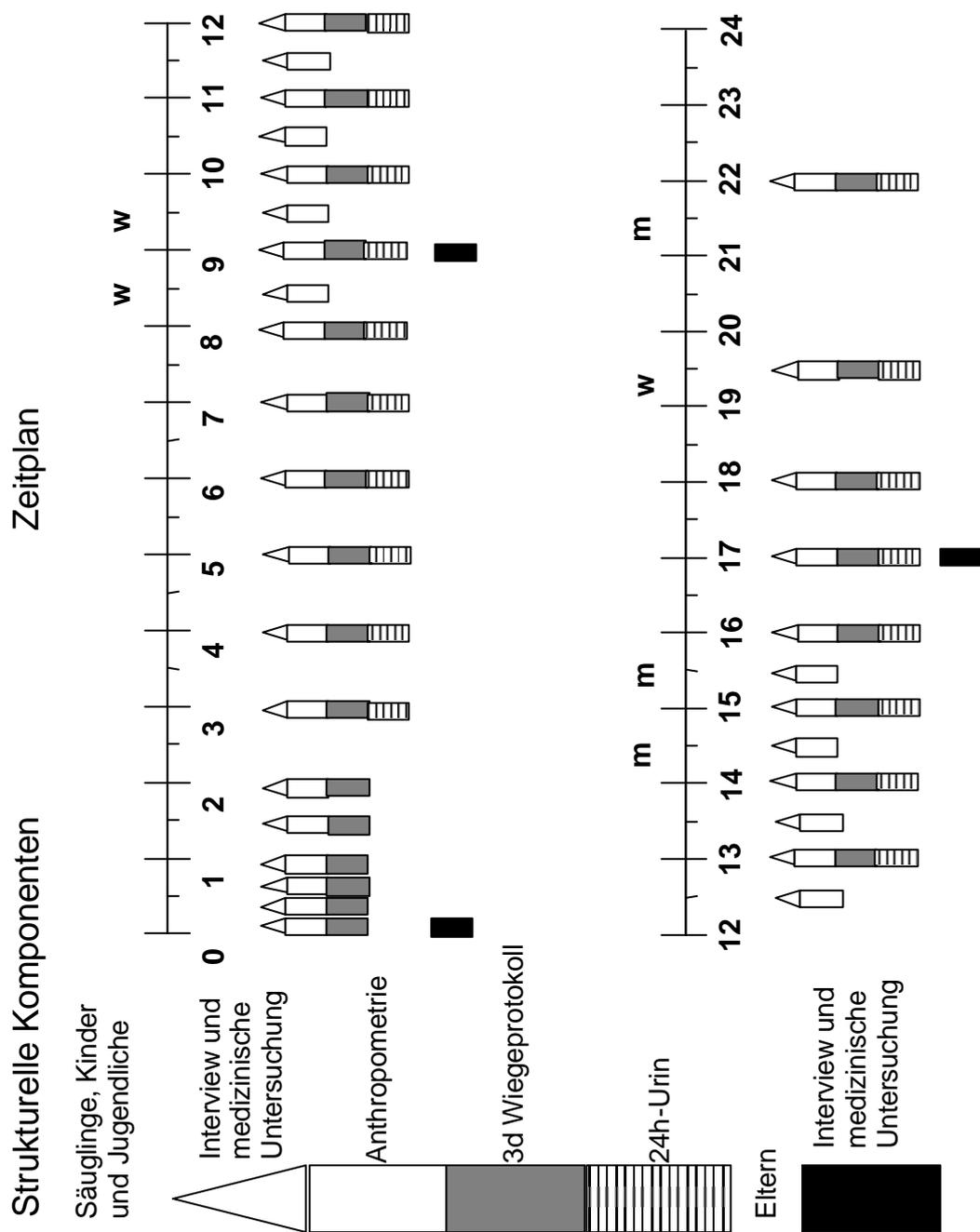


Abbildung 7: Studiendesign der DONALD-Studie: Komponenten der Untersuchungen bei Säuglingen, Kindern, Jugendlichen und Eltern sowie Zeitplan der altersabhängigen Untersuchungen (m = männlich; w = weiblich)

3.1.1. Untersuchungen des Gesundheitszustandes

Die ärztlichen Untersuchungen dienen der Beurteilung und Dokumentation des Gesundheitszustandes und der körperlichen Entwicklung der Kinder. Sie erfolgen mittels standardisierter Untersuchungsmethoden und altersspezifisch ausgelegtem Frage- und Anamnesebogen. Die Erfassung der sexuellen Reife erfolgt nach der von Tanner entwickelten Methode, wobei bei Mädchen die Brust- und Schamhaarentwicklung und bei Jungen die Penis-, Hoden- sowie die Schamhaarentwicklung beurteilt werden. In dieser Arbeit wird nur die Schamhaarentwicklung als Einstufungskriterium verwendet, da ein Teil der Kinder (insbesondere in der Pubertät) eine Beurteilung der anderen Größen nicht zuließ. Tanner = 1 gilt als präpubertär und Tanner ≥ 2 als pubertär.

3.1.2. Anthropometrische Messungen

Die Körpergröße wird regelmäßig mittels eines an der Wand fest installierten, digitalen Stadiometers (entsprechend des Harpenden Stadiometers, Harpenden, Coymych, Großbritannien Messgenauigkeit: 1mm) und das Körpergewicht mit einer elektronischen Seca 753 E Waage (Seca, Hamburg, Messgenauigkeit: 0.1kg) gemessen. Die Kinder tragen während der Messungen lediglich ihre Unterwäsche und Socken.

3.1.3. Sammlung von 24h-Urinen

Alle 24h-Urinsammlungen erfolgen zu Hause, nachdem geschultes Institutspersonal die Kinder und Eltern eingehend mit der Urin-Sammelvorschrift vertraut gemacht hat. Folgende Vorschriften werden bei der Sammlung beachtet: Die Sammlung beginnt morgens mit dem Verwerfen des letzten Nachturins, wobei dieser Zeitpunkt dem Sammelbeginn entspricht. Alle folgenden Miktionen werden vollständig in beschrifteten Sammelgefäßen aufgefangen und sofort tiefgekühlt. Es erfolgt kein Zusatz von Konservierungsmitteln. Jeder Miktionszeitpunkt wird dokumentiert. Die Sammelperiode wird am darauf folgenden Morgen mit der vollständigen Sammlung des Nachturins beendet. Wurde eine Miktion nicht aufgefangen, wird dieser Ausfall notiert und das entsprechende Zeitintervall zur vorhergehenden Miktion als Ausfallzeit berücksichtigt. Bei den in dieser Arbeit berücksichtigten Urinen durfte die

Gesamtausfallzeit 240 Minuten nicht überschreiten. Die Gesamtsammeldauer (unter Einbeziehung der Ausfallzeiten) musste zwischen 1140 und 1560 Minuten (24 Stunden = 1440 Minuten) betragen. Aus der gemessenen Harnmenge und der dokumentierten Sammelzeit wurde das Harnvolumen bezogen auf 24 Stunden berechnet.

Urine, die während der Sammlung nicht ordnungsgemäß gekühlt wurden, sowie Urine von kranken Kindern wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Wurden während der Urin-Sammlung Medikamente eingenommen, die in der Lage sind, die zu analysierenden Parameter zu beeinflussen, wurden die entsprechenden 24h-Urine ebenfalls nicht in der Untersuchung berücksichtigt. Weitere Ausschlusskriterien der Urine sind im Folgenden zusammengefasst:

Extremer Niederschlag	Urin zeigt Zeichen der Zersetzung
Fremdkörper im Urin	Sammelbeginn /-ende geschätzt
Stuhlbeimengung	Sammelzeit unklar
Verdacht auf Blutbeimengung	Verdacht auf Urinsammelfehler / Sammelfehler
Crementebeimengung	Nachturin fehlt

3.1.4. Messungen im Rahmen der Knochendichte-Teilstudie

Die Knochendichtestudie, eine densitometrische Querschnittsuntersuchung im Rahmen der DONALD Studie, fand zwischen Mitte Juli 1998 und Mitte Juni 1999 statt. In diesem Zeitraum wurden an 379 gesunden Kindern und Jugendlichen eine einmalige Knochendichte-Messung am nicht-dominanten Unterarm mittels peripherer quantitativer Computer Tomographie (pQCT) durchgeführt. Zum größten Teil wurden auch Eltern der Kinder radiologisch untersucht, wobei hier weit mehr Mütter als Väter zur Verfügung standen.

3.1.4.1. Analyse mittels peripherer quantitative Computer Tomographie (pQCT)

Mit einem XCT-2000 Scanner (Stratec, Inc., Pforzheim) wurde jeweils im proximalen und ultradistalen Bereich eine 2mm breite Knochen-Scheibe durchleuchtet und mit einem Softwareprogramm (Version 5.40 der Firma Stratec) ein differenzierter

Querschnitt der Strukturen des Unterarmes graphisch aufgezeichnet und analysiert. Die Auflösung des Scanners wird in Voxel, einer dreidimensionalen Verallgemeinerung eines Pixels, angegeben. Ein Voxel wird in dieser Arbeit durch eine Kantenlänge von 0.4mm definiert. Die Scangeschwindigkeit bei dieser Untersuchung liegt bei 15mm/s. Von den individuellen Unterarmmaßen abhängig liegt die durchschnittliche Untersuchungsdauer zwischen 2 und 5 Minuten pro Proband.

3.1.4.1.1. Proximaler Unterarm

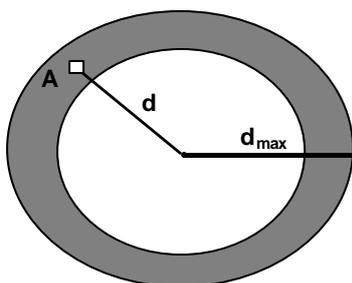
An einer Stelle, die 65% der Länge des Unterarms proximal des Griffelfortsatzes der Speiche (Processus styloideus ulnaris) entspricht, wurden Messungen vorgenommen. Dieser Messpunkt entspricht dem maximalen Unterarmumfang. Die Messungen dienen der Beurteilung von kortikalem Knochen und der Muskelfläche (mm²) im Querschnitt. In dieser Arbeit werden vier Knochenparameter aus diesem Bereich berücksichtigt.

1. Die volumetrische Kortikalisdichte (**vBMD_{cort}**) - sie ist die mittlere volumetrische Materialdichte der Kortikalissubstanz angegeben in g/cm³.
2. Die Kortikalisfläche (**CA**) - angegeben in cm².
3. Der Knochengehalt (bone mineral content, **BMC₆₅**) einer 1mm starken Knochen-scheibe - er wird auf folgende Weise errechnet (Schoenau et al., 2001):

$$\text{BMC}_{65} \text{ (mg/mm)} = \frac{\text{CA (mm}^2\text{)} \times \text{vBMD}_{\text{cort}} \text{ (mg/cm}^3\text{)}}{1000}$$

4. Der Strength-Strain-Index (Stärke-Verformungs-Index, **SSI₆₅**) – er verbindet Geometrie und Dichte des Knochens und wird wie folgt errechnet (Schoenau et al., 2001):

$$\text{SSI}_{65} \text{ (mm}^3\text{)} = \frac{S(d^2 \times A \times \text{vBMD}_{\text{vox}} / \text{vBMD}_{\text{max}})}{d_{\text{max}}}$$



A = Querschnittsfläche eines Voxel (0.4mm x 0.4mm = 0.16mm²)

d = Abstand des Voxel vom Knochenschwerpunkt

d_{max} = maximaler möglicher Abstand eines Voxel vom Knochenschwerpunkt

vBMD_{vox} = volumetrische Knochendichte innerhalb des Voxel

vBMD_{max} = maximale physiologisch erreichbare Knochendichte (1200mg/cm³)

Der untere Dichte-Schwellenwert zur Erfassung von $vBMD_{cort}$, CA und BMC liegt bei 710 mg/cm^3 ; für der SSI_{65} bei 480 mg/cm^3 . Muskulatur hat eine deutlich niedrigere Dichte, deren untere und obere Bemessungsgrenzen bei 20 mg/cm^3 und 60 mg/cm^3 liegen.

3.1.4.1.2. Distaler Unterarm

Die distale pQCT-Messung wurde an einem Messpunkt durchgeführt, der von einer Referenzlinie ausgehend 4% der Länge des Unterarms entspricht. Um die Referenzlinie zu bestimmen, musste zur Ermittlung der Lage der Wachstumsfuge (sofern noch vorhanden) einmal "vorgescanned" werden. Konnte diese eindeutig identifiziert werden, verlief die Referenzlinie durch die am weitesten distal gelegenen Stelle der Wachstumsfuge. Konnte diese nicht ermittelt werden, verlief die Referenzlinie mitten durch die Grenze zwischen Knochen und Gelenkknorpel der Speiche. In **Abbildung 8** wird dieser Vorgang verdeutlicht.

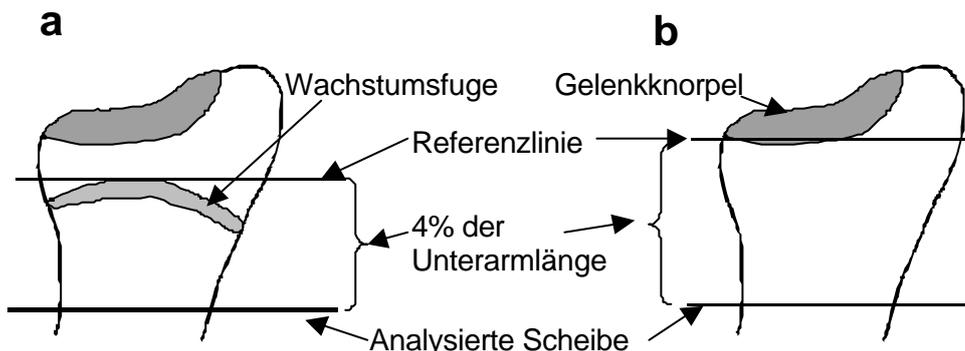


Abbildung 8: Auswahl der Referenzlinie im ultradistalen Unterarmbereich bei
a) vorhandener und b) nicht vorhandener Wachstumsfuge

1. $vBMD_{trab}$ entspricht der durchschnittlichen Dichte des 45%igen mittleren Bereichs (trabekuläres Kompartiment) der Querschnittsfläche des Knochens. Dieser Parameter wird in **Abbildung 9** verdeutlicht.
2. Die volumetrische Gesamtdichte ($vBMD_{tot}$) beinhaltet sowohl das trabekuläre Kompartiment als auch die dünne kortikale Schicht.

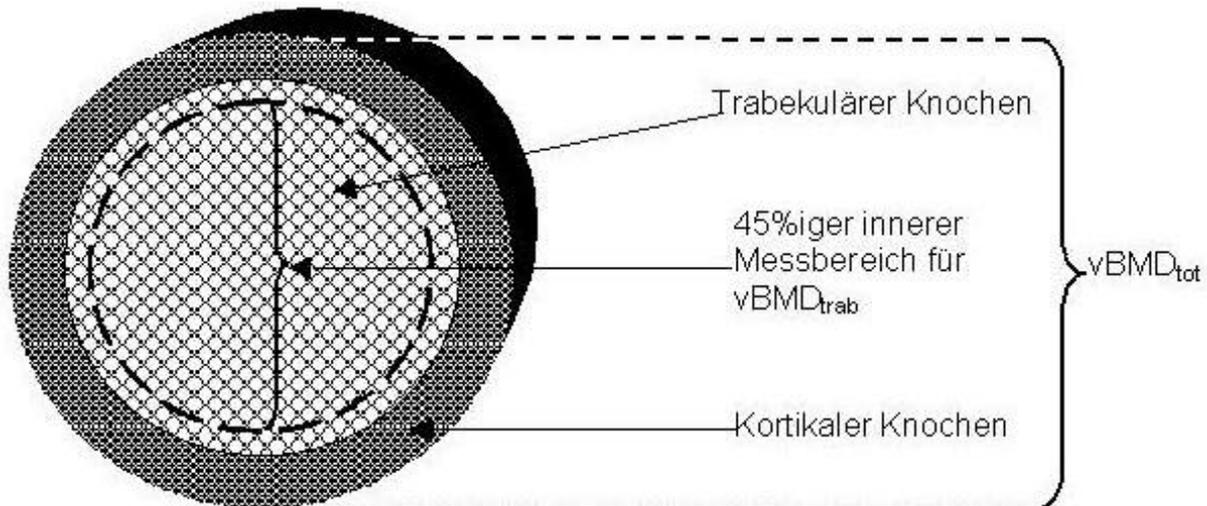


Abbildung 9: Bereiche der Messungen von DichtevARIABLEN im Querschnitt des ultradistalen Radius

3. Der Knochengehalt (bone mineral content, **BMC₄**) einer Knochenscheibe wird auf folgende Weise errechnet:

$$\mathbf{BMC_4 \text{ (mg/mm)} = \frac{BA \text{ (mm}^2\text{)} \times vBMD_{tot} \text{ (mg/cm}^3\text{)}}{1000}}$$

BA = Gesamtknochenquerschnittsfläche (Bone Area)

4. Der Strength-Strain Index, **SSI₄**, wird mit der gleichen Formel berechnet wie der **SSI₆₅** unter Berücksichtigung der Werte des distalen Bereichs.

Der untere Dichte-Schwellenwert von allen vier oben genannten trabekulären Knochenvariablen liegt bei 280 mg/cm³.

3.1.4.2. Griffstärke

Unter Zuhilfenahme eines Standard-Jamar-Dynamometers (Preston, Jackson, MI, USA) wurde die maximale isometrische Griffstärke (angegeben in N) ermittelt. Ein justierbarer Griff wurde so eingestellt, dass die proximalen interphalangealen Gelenke der nicht-dominanten Hand darauf lagen. Die Kinder mussten die ihnen maximal mögliche Druckkraft ausüben. Zur Auswertung und Dokumentation wurde von zwei Durchläufen der jeweils höhere Wert herangezogen.

3.2. Analytik

3.2.1. Kreatinin im Urin

Die Bestimmung von Kreatinin basiert auf einer kinetischen Messung, der sogenannten Jaffé-Reaktion (Jaffé, 1886). Die Probe wurde in einem halbautomatischen Analyser (Creatinine Analyser 2, Beckmann Instruments, München) mittels einer modifizierten Jaffé-Reagenz (Beckmann, München) analysiert. In alkalischer Lösung bildet Kreatinin mit Pikrinsäure einen roten Farbkomplex (Meißenheimer Komplex), der zeitabhängig bei 520nm absorptiomtrisch gemessen wird. Die Konzentration an Kreatinin (mmol/l) ist proportional zur ermittelten Reaktionsgeschwindigkeit.

Die tägliche Kreatininausscheidung bezogen auf die Körpermasse wird als ein Indikator für grobe Sammelfehler bzw. für potentiell unvollständig gesammelte 24h-Urine herangezogen (Remer et al., 2002). Sie wird mit folgender Formel berechnet.

$$\text{24h Kreatininausscheidung (mmol/kg/d)} = \frac{\text{Kreatinin (mmol/l)} \times \text{24h Harnvolumen(ml/d)}}{\text{Gewicht(kg)} \times 1000}$$

Urinproben mit Werten ≤ 0.08 mmol/kg/ wurden als "nicht vollständig" beurteilt und als nicht repräsentativ von dieser Arbeit ausgeschlossen.

3.2.2. Harnsteroidprofile mit Gas Chromatographie-Massensspektrometrie (GC-MS)

Das angewendete Verfahren zur quantitativen GC-MS Harnsteroidprofilanalyse lehnt sich an eine von Shackleton entwickelte Methodik an (Shackleton, 1993). Zur Verfügung steht ein GC/MS-System bestehend aus einem Gaschromatographen (Agilent 6890 Serie GC; Agilent 7683 Serie Injektor), der an einen bench-top massenselektiven Detektor (Agilent 5973N MSD) gekoppelt ist.

Die freien und konjugierten Harnsteroiden wurden mittels Festphasenextraktion (Sep-Pak™-C18-Kartuschen, Waters Associates, Milford, MA) aus 5 ml Harn extrahiert. Danach wurde eine enzymatische Hydrolyse der Konjugate (Aryl-Sulfatase aus Helix Pomatia, Sigma Chemical Co., St Louis, MO) durchgeführt. Nach einer erneuten Extraktion und Zugabe bekannter Mengen von 3 internen Standards (5 α -Androstan-3 α ,17 α -diol, Stigmasterol und Cholesteryl Butyrat) erfolgte die Derivatisierung der Harnsteroiden zu Methyloxim-Trimethylsilyl-Äthern.

Die gaschromatographischen Harnsteroidprofile wurden unter Verwendung einer Optima-1 Kieselglassäule ermittelt, wobei Helium als Trägergas diente. Die Identifizierung der einzelnen Steroide erfolgte massenspektrometrisch über das sogenannte selected ion monitoring (SIM, Einzelmassenregistrierung) ausgewählter Massenbereiche (Molekülionen oder charakteristische Fragmentationen).

Die Kalibrierung des GC-MS-Systems erfolgte mit einer Referenzlösung, die bekannte Mengen aller zu messenden Substanzen enthält. Die Lösung wurde bei einer Starttemperatur von 80°C (2min) in das System injiziert. Danach wurde in 20°C/min Schritten auf 190°C erhitzt und die Temperatur 1 Minute konstant gehalten. Anschließend wurde bei Temperaturzunahmen um 2.5°C/min auf 272°C erhöht. Bei dieser Temperatur erfolgte schließlich die Trennung der Steroide. Die Ermittlung der Exkretionswerte der einzelnen Steroide erfolgte aus den Messungen der selected ion peaks gegenüber den internen Standards (Wudy, 1999). Die Konzentration wurde in µg/l angegeben und danach in die 24h-Ausscheidungsrate (µg/d) umgerechnet.

Von dem Gesamtausscheidungsprofil von 36 Steroiden und Steroidmetaboliten werden in dieser Arbeit insgesamt 15 berücksichtigt, entweder solitär oder als Summenparameter. Cortisol (F) und 5-Androsten-3β,17β-diol (17β-Adiol) wurden einzeln betrachtet. Drei Summenparameter wurden aus der Summe von drei bzw. sieben einzelnen Metaboliten zur Charakterisierung der Adrenarche (DHEA&M), der Gesamtandrogenausscheidung (C19) und der Gesamtcortisolsekretion (C21) ermittelt.

<u>DHEA&M</u>	<u>C19</u>	<u>C21</u>
Deyhydroepiandrosteron	Androsteron	Tetrahydrocortison
16α-Hydroxy DHEA	Ätiocholanolon	Tetrahydrocortisol
Androstentriol-16α	Deyhydroepiandrosteron	5α-Tetrahydrocortisol
	16α-Hydroxy DHEA	20α-Cortol
	Androstentriol-16α	20β-Cortol
	Androstendiol-17α	20α-Cortolon
	Androstendiol-17β	20β-Cortolon

Die Harnsteroidprofile wurden im Steroidforschungslabor der Kinderklinik der Universität Giessen analysiert.

3.3. Auswahl der Kinder für die Teilstudien

Die Auswahl der Kinder für die verschiedenen Teilstudien dieser Arbeit basierte auf dem Teilkollektiv der DONALD-Studie, das sich einer pQCT-Knochenmessung unterzogen hatten. Von insgesamt 379 Kindern lagen Knochenanalysen der Speiche des nichtdominanten Unterarms vor. Probanden, deren Knochenaufnahmen Artefakte oder morphologische Besonderheiten (z.B. Knochen trabekeln im diaphysären Bereich) aufwiesen, sowie Probanden, die Krankheiten hatten oder Medikamente einnahmen (Glucocorticoide, Testosteron, Thyroxin), die in der Lage waren, die Knochenparameter zu beeinflussen (z.B. Morbus Perthes, Voeltzkow Kuhmilcheiweißallergie, Morbus Hirschsprung, Sphärozytose, Splenomegalie, Anämie), wurden von der Arbeit ausgeschlossen. Kinder nicht-europäischer Herkunft wurden ebenfalls nicht berücksichtigt. Es wurden nur Probanden ausgewählt, die zum Knochenmesstermin älter als 5,5 Jahre oder jünger als 18,5 Jahre waren, was prinzipiell einem Altersbereich von 6-18 Jahren entspricht.

3.3.1. Querschnitt

Insgesamt hatten 336 der 379 Kinder einen 24h-Urin gesammelt. Die ausgewählten Harnproben der spezifisch selektierten Probanden mussten in einem Zeitfenster von 183 Tagen (6 Monate) vor und 183 Tagen nach dem jeweiligen Knochenmesstermin gesammelt worden sein, so dass das ermittelte Steroidhormonniveau annähernd den Zeitraum der jeweiligen Knochenanalyse widerspiegelte. 43 Probanden mit einer 24h-Harnsammlung erfüllten diese Bedingung nicht. Die Gesamtheit der Auswahlkriterien führte zu einer Querschnittsgruppe von 205 Kindern und Jugendlichen mit adäquater 24h-Urinsammlung im genannten Zeitfenster. In der präpubertären (n=109) Entwicklungsgruppe befinden sich 59 Jungen und 50 Mädchen, während 41 Jungen und 55 Mädchen die pubertäre Gruppe (n=96) bilden.

3.3.2. Längsschnitt

Es wurden zwei unterschiedliche Längsschnittbetrachtungen zum einen mit präpubertären zum anderen mit pubertären Kindern durchgeführt. Im Fall der präpubertären Kinder wurden Urine zur Steroidanalyse selektiert, die 4 (3,5 - 4,5) Jahre vor der pQCT Messung gesammelt wurden. Bei der pubertären Gruppe

mussten die Kinder zum Zeitpunkt der Knochenanalyse Tannerstadium ≥ 3 erreicht und 8 (7,5 - 8,5) Jahre zuvor einen geeigneten 24h Urin gesammelt haben. Zur Zeit der Urinsammlung für den 8-Jahreslängsschnitt durfte der Entwicklungsstand Tannerstadium = 1 nicht überschritten worden sein. Für die Harnproben galten die gleichen Auswahlkriterien wie zuvor skizziert. Die Anzahl der Probanden in der jeweiligen Längsschnittuntersuchung lag bei 54 präpubertären und 55 pubertären Kindern.

3.4. Statistik

Als statistische Maßzahlen zur Beschreibung der stetigen Merkmale der jeweiligen Stichproben dienten der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung. Nach Feststellung einer Abweichung von der Normalverteilung (z.B. bei Bestätigung rechtsschiefer Verteilung) mittels Shapiro-Wilk Tests (Dufner et al., 1992) und nach Berücksichtigung von Skewness und Kurtosis (Healy, 1994) wurden die entsprechenden Größen auch als Median mit Interquartilbereichen dargestellt.

Mittelwertsvergleiche wurden bei normalverteilten Messgrößen mit dem t -Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Bei Nicht-Normalverteilung wurden die Daten vor dem t -Test logarithmiert und die transformierten Werte auf Normalverteilung überprüft (siehe oben). Bei mehr als 2 Vergleichsgruppen erfolgte im Falle unabhängiger Stichproben die Datenanalyse durch ein- oder mehrfaktorielle Varianzanalysen (ANOVA).

Kovarianzanalysen (ANCOVA) wurden mit Hilfe des GLM-Modells (general linear model procedure) durchgeführt, um das Vorhandensein von Interaktionen zwischen Geschlecht und Steroidhormonen zu überprüfen.

Einfache Zusammenhänge zwischen Variablen wurden mittels Pearson Korrelation überprüft. Einfache und multiple Regressionsmodelle wurden benutzt, um den Erklärungsbeitrag der Androgene und Glucocorticoide, neben anderen potentiellen Prädiktoren, für die Variabilität der jeweiligen Knochenvariablen zu berechnen.

In den Längsschnittanalysen wurden für alle Einflussgrößen (Muskulatur, Alter und Steroide) sowie Zielvariablen (diaphysaler und metaphysaler Knochen) *Standard Deviation Scores* (SDS) errechnet und diese dann in Regressionsanalysen untersucht. Die Berechnung der SDS der Knochen (der Kinder und ihrer Mütter) und der Muskelfläche wurde anhand von veröffentlichten Referenzwerten vorgenommen (Neu et al., 2001a; Neu et al., 2001b; Schoenau et al., 2001; Neu et al., 2002; Schoenau et al., 2002b). Die SDS der steroidalsten Einflussgrößen stammen aus noch nicht veröffentlichten Daten der DONALD-Studie. SDS wurden altersspezifisch wie folgt berechnet:

$$\text{SDS} = \frac{\text{Individualwert des Kindes} - \text{Mittelwert der Referenzgruppe}}{\text{Standardabweichung der Referenzgruppe}}$$

Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p=0.05$ festgelegt. Neben signifikanten Resultaten wurden auch tendenziell erkennbare Einflüsse ($p<0.1$) auf Knochenvariablen in den entsprechenden Ergebnistabellen ausgewiesen.

Alle Berechnungen und statistische Analysen wurden mit dem Statistik-Paket SAS (Version 6.12 Cary, NC, USA) durchgeführt.