

## 5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollte in Quer- und Längsschnittuntersuchungen überprüft werden, ob die im Harn ausgeschiedenen, mit GC-MS analysierten Steroidhormonmetaboliten entweder einzeln oder summiert möglicherweise einen Einfluss auf mittels pQCT gemessene Knochenmessgrößen am nicht-dominanten Radius ausüben.

### 5.1. Methodische Aspekte

Die Bestimmung der Material- und Architektureigenschaften von Knochen bei Kindern mittels pQCT ermöglicht eine Beurteilung der Entwicklung der lokalen Knochenstärke im Wachstumsalter bei nur äußerst geringer Strahlenbelastung. Die pQCT-Messung ermöglicht außerdem eine spezifische 3-dimensionale Analyse, insbesondere auch vom trabekulären Knochen-Kompartiment. Eine technische Schwäche des pQCT's ist der partielle Volumeneffekt bei kortikalem Knochen (Neu et al., 2001b; Schoenau et al., 2002b), wobei die Voxelgröße eine entscheidende Rolle spielt. Nicht vollständig mit Knochensubstanz gefüllte Voxel (in dieser Arbeit haben sie eine Kantenlänge von 0.4mm) an der endokortikalen und der periostalen Grenze der Kortikalis führen zu einer Unterschätzung von vBMD, welche bei kleineren Knochen stärker ist als bei größeren. Folglich steigt scheinbar die Dichte mit zunehmender kortikaler Dicke. Dem partiellen Volumeneffekt kann entgegengewirkt werden, indem eine kleinere Voxelgröße (z.B. Kantenlänge von 0.2mm) verwendet wird. Das ist allerdings mit einer höheren Strahlenexposition der Probanden verbunden. Dieses ist bei gesunden Kindern und Jugendlichen ethisch nicht zu vertreten.

Die GC-MS erweist sich durch eine höhere Spezifität und Messgenauigkeit gegenüber den meisten Radio-Immuno-Assays als vorteilhaft. (Wudy et al., 2001). Bei einigen der Korrelationen und multiplen Regressionen in der präpubertären Gruppe entsprach die Zahl der Kinder nicht exakt der gesamten Gruppe, denn das 17 $\beta$ -Adiol und das DHEA der jüngsten Kinder lagen in einigen Fällen nicht im dynamischen Messbereich. Dies war für DHEA nicht problematisch, da es nicht einzeln betrachtet wurde sondern stets in Summenparametern (DHEA&M und C19) enthalten war. Im Falle der statistischen Tests, die 17 $\beta$ -Adiol einbezogen, und vor

allem bei den multiplen Regressionen der Längsschnittuntersuchungen, bei denen  $17\beta$ -Adiol häufig die hormonelle Hauptdeterminante war, reduzierte sich die  $n$ -Zahl. Im Rahmen dieser Arbeit, deren primärer Schwerpunkt die adrenalen Steroidhormone ist, wurde der Einfluss der starken gonadalen Sexualhormone Testosteron,  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron, Östradiol, Östriol und Östron nicht untersucht, denn mit der verwendeten Konfiguration des GC-MS-Systems lagen diese Steroide meist nicht im dynamischen Messbereich. Die im Blut zirkulierenden Mengen und letztendlich die renale Ausscheidung dieser Steroidhormone liegen bei Kindern i.d.R. unter den Werten der in dieser Arbeit untersuchten adrenalen Knocheneinflussgrößen. Um den Einfluß der gonadalen Sexsteroiden bestimmen zu können, müsste die Sensitivität des GC-MS-Meßgerätes erhöht werden.

Insbesondere die Längsschnittuntersuchungen wiesen wegen der relativ kleinen Gruppengrößen und der Tatsache, dass Jungen und Mädchen zusammen untersucht wurden, gewisse Schwächen auf, wie z.B. die Altersheterogenität der Gruppen und die Tatsache, dass jeweils nur ein Sammelurin und ein Knochenanalysetermin untersucht wurden. Daher war es auch notwendig, die multiplen Regressionsmodelle mit *Standard Deviation Scores* (SDS) sowohl der Einfluss- als auch der Zielgrößen durchzuführen. Auch die Knochendaten der Mütter, die als eine wichtige die Genetik reflektierende Einflussgröße des kindlichen Knochens gelten, wurden als SDS in den Regressionen berücksichtigt. Vorteilhaft wären sicherlich zwei Knochenuntersuchungstermine, die mehrere Jahre auseinander liegen, mit zum jeweiligen Messtermin gleichzeitig gesammelten 24-h Urine, anhand derer mit Hilfe von  $\Delta$ -Werten die Langzeiteffekte von Einfluss- und Zielgrößen genauer evaluiert werden könnten. Noch besser wäre eine Kohorte gleichaltriger Kinder sowie eine Reihe von in regelmäßigen Abständen wahrgenommenen Messterminen. Bei gesunden Kindern ist dies, wie bereits oben angesprochen, wegen der mehrfachen Strahlenbelastung (ohne krankheitsbedingten Anlass) aus ethischen Gründen jedoch nicht möglich.

## 5.2. Muskulatur

Dass der kortikale Knochen unter physiologischen Bedingungen am stärksten von Muskelkontraktionen beeinflusst wird und nicht von der passiven Schwerkraft, findet in der Humanmedizin zunehmende Akzeptanz (Rauch & Schoenau, 2002; Klein et al., 2002). Eine nicht ausreichende Anpassung von BMC an die Muskulatur wurde vor kurzem von Schoenau et al. (2002a) bei Kindern mit mehreren Knochenbrüchen festgestellt. Die Stabilität von Knochen ist daher, um eine gesunde Funktion gewährleisten zu können, physiologisch mit der Entwicklung der lokalen Muskelkraft eng verbunden. Dies erklärt, dass die Variabilität der proximalen Knochenmessgrößen, wie in dieser Arbeit klar erkennbar, stärker durch die mit pQCT gemessene Muskelfläche als durch das Alter beeinflusst wird. Eine Ausnahme stellt hier die  $vBMD_{65}$  dar. Die in **Tabelle 5** dargestellte Altersabhängigkeit von  $CA_{65}$ ,  $BMC_{65}$  und  $SS_{65}$ , lässt sich also in erster Linie durch die örtliche Zunahme der Muskulatur erklären. Die Muskulatur nimmt mit dem Alter zu, da die durch das Längenwachstum verursachten stärkeren Hebelkräfte am Unterarm mehr Muskeln benötigen, um eine adäquate Bewegung und Funktion der Knochen zu gewährleisten. Durch die größeren und stärkeren Muskeln wird die Diaphyse wiederum größeren Biegekräften ausgesetzt und reagiert mit einer Umfangszunahme (größere Querschnittsfläche) und mehr Knochenmasse. Die scheinbare Alterszunahme von  $vBMD_{65}$  entsteht u.a. durch den partiellen Volumeneffekt (Neu et al., 2001b; Schoenau et al., 2002b, siehe auch 5.1.). Schoenau et al. (2002b) konnten jedoch zeigen, dass unabhängig vom partiellen Volumeneffekt Geschlechtsunterschiede bezüglich der Dichte existieren. Es liegt also nahe, dass die  $vBMD_{65}$  keine konstante Größe ist sondern vielmehr durch biologische, nicht messtechnischbedingte Faktoren, wie z.B. das auch hormonabhängige intrakortikale Remodelling, beeinflussbar ist.

Die Altersabhängigkeit von  $BMC_4$  und  $SS_4$  in **Tabellen 10 und 11** lässt sich ebenfalls durch Muskeln erklären und durch die Kräfte, die durch das Spreizen des Gelenkes auf den Knochen einwirken. Eine eindeutige Altersabhängigkeit konnte für den radialen  $vBMD_{trab}$  nicht gezeigt werden, für den  $vBMD_{tot}$  dagegen in der Pubertät. Nach Buchanan et al. (1988) kann der Einfluss von endokrinen Faktoren, wie z.B. von Sexualsteroiden, hier größer als der der Muskulatur sein, was z.T. mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmt. In den Regressionsmodellen zeigte sich

die Griffstärke – und damit die Muskulatur – durchgehend als stärkster Prädiktor von  $BMC_4$ . Sie zeigte jedoch keinen Einfluss auf  $vBMD_{trab}$  und  $vBMD_{tot}$ .

Dass die Muskulatur insgesamt den stärksten Einfluss hat, bestätigt die Mechanostat-Theorie, die besagt, dass sich der Knochen physiologisch einwirkenden mechanischen Kräften anpasst, um die zellulär registrierten Belastungen, die sogenannten *Strains*, so nah wie möglich an einem Sollwert zu halten (Frost, 1987, Schoenau et al., 2002a).

### 5.3. Adrenale Androgene

Sexualsteroiden üben direkt und indirekt über die Muskulatur starke anabole Einflüsse auf den Knochen aus. Bei Erwachsenen verlangsamen sie das Remodelling, also den Knochenumsatz, und beugen einem beschleunigten Knochenschwund vor. Gene, die für die mesenchymale Zelldifferenzierung und ebenfalls für die Osteoklastenbildung verantwortlich sind, werden durch die Sexualhormone in ihrer Aktivität herunterreguliert (Bland, 2000; Manolagas et al., 2002). Auf die Osteoblasten und Osteozyten sind außerdem nicht-genotrope und anti-apoptotische Effekte wirksam (Manolagas et al., 2002). Die Vermehrung von Osteoblasten und die Genexpression mehrerer Marker des Knochenaufbaus werden unter anderem durch Androgen- und Östrogeneinwirkung angeregt (Bland, 2000). Studien an Kindern, die aufgrund einer verfrühten Adrenarche oder aufgrund eines AGS einer erhöhten Bildung von adrenalen Androgenen ausgesetzt sind, zeigen, dass anabole Effekte durch einen Überschuss an adrenarcheabhängigen Steroiden erzielt werden können (Arisaka et al., 2001; Sopher et al., 2001).

In dieser Arbeit wird erstmals gezeigt, dass die adrenalen Androgene in einer physiologischen Sekretionsspanne bei gesunden Kindern auch vor Erreichen der Pubertät einen unabhängigen Einfluss auf den Zuwachs der Knochenstabilität ausüben. Obwohl die renale Ausscheidung des Adrenarche-Markers DHEA&M in einfachen Korrelationsanalysen weniger stark als die Muskulatur und das Alter mit diaphysealen Knochenparametern assoziiert war, zeigte sich dennoch ein signifikanter Erklärungsbeitrag für die Variabilität von  $vBMD_{65}$  und  $BMC_{65}$ . Die eindeutige positive Wirkung von C19 auf alle vier Zielgrößen ( $vBMD_{65}$ , CA,  $BMC_{65}$  und  $SSI_{65}$ ) vor Pubertätsbeginn unterstreicht, wie wichtig die Adrenarche für den

präpubertären diaphysealen Knochen ist, denn vor der Pubertät entstammen die gesamten Androgen-Metabolite fast ausschließlich der NNR. Offensichtlich wird das intrakortikale Remodelling (Knochenumbau), das die Porosität erhöhen und die Dichte entsprechend vermindern kann (Schoenau et al., 2002b), durch die adrenalen Androgene herabgesetzt. Die Zunahme von CA, BMC<sub>65</sub> und SS<sub>65</sub>, kann also auch wenigstens teilweise durch ein reduziertes Remodelling erklärt werden, denn diese Größen beschreiben direkt (BMC<sub>65</sub>) oder indirekt (CA, SS<sub>65</sub>) die vom Remodelling abhängige Knochenmasse.

Ein besonderer, unmittelbarer DHEA-Metabolit, nämlich das 17 $\beta$ -Adiol, entfaltet in verschiedenen Geweben östrogene und/oder androgene Wirkungen (Leroy et al., 1988; Najid und Habrioux, 1999; Miyamoto et al., 1998; Maggiolini et al., 1999). Dass sich 17 $\beta$ -Adiol, auch Hermaphrodiol genannt (Adams et al., 1990), als ein Prädiktor der präpubertären CA und SS<sub>65</sub> erweist und bei Mädchen auch als Prädiktor von vBMD<sub>trab</sub>, BMC<sub>4</sub> und SS<sub>4</sub>, bestätigt die besondere Bedeutung von Geschlechtshormoneffekten bereits vor der Pubertät. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergänzen und bestätigen das oben skizzierte *in vitro* Wissen nun auch *in vivo* und lassen auf einen physiologisch bedeutsamen adrenarchalen Knocheneinfluss schließen.

Dass der prädiktive Effekt von 17 $\beta$ -Adiol metaphyseal vor allem bei den Mädchen zur Geltung kommt, liegt vermutlich an einer geringeren Expression der 17 $\beta$ -HSD in Knochenzellen von Jungen. Die 17 $\beta$ -HSD ist für die direkte Konversion von DHEA zu 17 $\beta$ -Adiol verantwortlich. In diesem Zusammenhang konnten Ishida et al. (2002) zeigen, dass in Osteoblasten aus den Wirbelknochen weiblicher Ratten die *in vitro* Verstoffwechslung von DHEA zu 17 $\beta$ -Adiol doppelt so groß ist wie in denen der Männchen.

Das 17 $\beta$ -Adiol hat anscheinend einen nachhaltigen Einfluss auf den radialen Knochen, denn in den Längsschnittuntersuchungen hatte dieses "Androgen" sogar im 8-Jahres-Zeitraum einen prädiktiven Einfluss auf 6 der untersuchten Knochen-Zielgrößen. Im 4-Jahres-Zeitraum war dieser Effekt jedoch nicht so ausgeprägt, was an der kleineren Gruppengröße (n=37) liegen könnte. Bei einigen Kindern (n=17 [Gesamtgruppengröße n=54]) lag der 17 $\beta$ -Adiol-Spiegel im nicht-messbarem Bereich. Der aktuelle Muskelstatus hat, wie bereits beschrieben, einen stärkeren

Effekt auf den Knochen als dieses Steroid. Es ist denkbar, dass das  $17\beta$ -Adiol als Wegbereiter für die bevorstehende Pubertät fungiert, denn durch seine androgene und/oder östrogene Wirkungsweise werden die Knochenzellen möglicherweise auf die später wirksam werdenden starken Sexualhormone Testosteron und  $17\beta$ -Östradiol "vorbereitet".

In der Pubertät sind die adrenalen Androgene offenbar von geringerer Bedeutung. Dass ein signifikanter Einfluss der adrenalen Androgene in der pubertären Gruppe kaum noch erkennbar war, liegt wahrscheinlich an der entwicklungsbedingten pubertären Zunahme der gonadalen Steroide. Entsprechend wird ein adrener Androgen-Einfluss auf den erwachsenen Knochen erst wieder deutlich, wenn die gonadalen Steroide im Blut stark abnehmen wie es z.B. bei jungen Frauen mit Anorexia nervosa (Gordon et al., 1999) und postmenopausalen Frauen (Labrie et al., 2001) der Fall ist.

#### **5.4. Glucocorticoide**

Obwohl in der wissenschaftlichen Literatur häufig gezeigt wurde, dass ein Überschuss an Glucocorticoiden Knochenschwund verursachen kann, bleibt zu klären, ob der Einfluss einer im physiologischen Sekretionsbereich erhöhten Sekretion ebenfalls knochenschädigend wirkt. Abu et al. (2000) zeigten bei Osteoblasten eine vermehrte Glucocorticoidrezeptor-Expression an Orten des Remodelling auf. Diese örtlich begrenzte, erhöhte Rezeptoraktivität ist vermutlich ein Grund für den während der ersten Monate einer supraphysiologischen Glucocorticoidtherapie beobachtbaren trabekulären Knochenverlust von bis zu 30% (Reid, 1997). Cortisol hat anscheinend bereits bei einer nur leicht erhöhten Sekretion einen negativen Einfluss, wie am Beispiel von  $vBMD_{\text{trab}}$ ,  $vBMD_{\text{tot}}$  und  $BMC_4$  der präpubertären Jungen gezeigt werden konnte. Es erscheint möglich, dass der fehlende Einfluss von Sexualhormonen zu diesem negativen Zusammenhang beiträgt, denn die Jungen zeigten, im Gegensatz zu den Mädchen, keinen anabolen  $17\beta$ -Adiol-Effekt im metaphysealen Bereich. Hiermit übereinstimmend sind Beobachtungen an älteren Menschen, die im allgemeinen einen verminderten oder keinen Sexualsteroidspiegel mehr aufweisen. In einer Studie an 70-80jährigen zeigte sich, dass eine individuell erhöhte Cortisolausscheidung im Urin zukünftigen Knochenbrüchen vorausgeht (Greendale et al.,

1999). Versuche mit Dexamethason an Labormäusen führten zu einem gesteigerten Absterben (Apoptose) von Osteoblasten, was aber durch eine gleichzeitige Gabe von  $17\beta$ -Estradiol verhindert werden kann (Gohel et al., 1999), so dass möglicherweise katabole Glucocorticoideffekte durch Sexualsteroid- und eventuell auch durch  $17\beta$ -Adiol-Einflüsse kompensiert werden können.

Im Gegensatz zum merklich inhibierenden Effekt hoher Glucocorticoiddosen auf die Knochenbildung *in vivo*, zeigen sich *in vitro* sowohl katabole als auch anabole Effekte auf die Knochenbildung sowie die Osteoblasten-Differenzierung (Dempster et al., 1997; Kream und Lukert, 2002). Eine kurzfristig anregende Wirkung von Cortisol auf die Kollagensynthese, sowie eine längerfristige Verstärkung der osteogenen Differenzierung wurde mehrfach beobachtet. Dass in dieser Arbeit deutlich positive Zusammenhänge zwischen C21 oder F und den metaphysealen Knochenparametern der pubertären Jungen und Mädchen erkennbar sind, lässt auf einen anabolen *in vivo* Effekt von Cortisol zumindest in bestimmten Wachstumsphasen schließen. Interessant ist, dass die Anregung der Kollagensynthese durch Glucocorticoide abhängig ist von der Aktivität der IGFs im Kulturmedium (Kream und Lukert, 2002). Es erscheint also möglich, dass auch die IGF-I Achse, im Zusammenspiel mit einer ausreichenden pubertären Sexualhormonaktivität, an anabolen Glucocorticoideffekten *in vivo* beteiligt ist. Das stimmt mit der Tatsache überein, dass die IGF-I Sekretion während des Wachstums speziell in der Pubertät ihren Höhepunkt erreicht.

Insgesamt zeigt die vorliegende Arbeit, dass der präpubertäre Anstieg der adrenalen Androgensekretion einen klaren unabhängigen Einfluss auf den Zuwachs an diaphysealer Knochenstärke am Radius ausübt. Die Untersuchungen zeigen außerdem erstmals einen klaren Geschlechts-Dimorphismus für adrenale Steroide (Cortisol und  $17\beta$ -Adiol) auf trabekuläre Knochenparameter im Wachstumsalter. Cortisol übt klare negative Effekte bei präpubertären Jungen aus. Bei präpubertären Mädchen spielt die adrenarhebedingte Bereitstellung des z.T. östrogenwirksamen  $17\beta$ -Adiol wahrscheinlich eine wichtige Rolle für die trabekuläre Knochenstruktur der Speiche. Inwieweit diese Zusammenhänge zwischen adrenalen Steroidhormonen und Knochenmessgrößen auch im Bereich anderer Skelettstrukturen z.B. bei Wirbel- Becken- oder Oberschenkelknochen in der Wachstumsphase beim Menschen bedeutsam sind, lässt sich nur durch entsprechende Folgeuntersuchungen klären.