

**Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Tübingen  
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik  
(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und  
Onkologie)**

**Ermittlung von pädiatrischen Referenzwerten für die  
Analyte Testosteron, Estradiol und Cortisol  
(Immunoassay)**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

vorgelegt von

Zehr, Anna Janina

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Binder

2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Gallwitz

Tag der Disputation: 05.11.2018

Für meine Familie

## INHALTSVERZEICHNIS

|   |    |
|---|----|
| <b>1. EINLEITUNG</b> .....  | 1  |
| <b>1.1 Ermittlung von Referenzbereichen für Hormone bei Kindern</b> ..... | 1  |
| <b>1.2 Klinische Relevanz der Referenzbereiche</b> .....                  | 2  |
| 1.2.1 Die Sexualhormone Testosteron und Estradiol.....                    | 2  |
| 1.2.1.1 Pubertas praecox.....   | 4  |
| 1.2.1.2 Pubertas tarda.....   | 6  |
| 1.2.2 Cortisol.....   | 8  |
| 1.2.2.1 Hypocortisolismus.....  | 9  |
| 1.2.2.2 Hypercortisolismus.....   | 10 |
| <br>  |    |
| <b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....                                     | 11 |
| <b>2.1 Präanalytik</b> .....  | 11 |
| <b>2.2 Assays</b> .....   | 12 |
| 2.2.1 Testosteron-Assay.....  | 12 |
| 2.2.2 Estradiol-Assay.....  | 15 |
| 2.2.3 Cortisol-Assay.....   | 19 |
| <b>2.3 Statistische Methoden</b> .....                                    | 23 |
| <b>2.4 Kohorten</b> .....   | 23 |
| 2.4.1 Ein- und Ausschlusskriterien der Testosteron-Kohorte.....           | 24 |
| 2.4.2 Ein- und Ausschlusskriterien der Estradiol-Kohorte.....             | 26 |
| 2.4.3 Ein- und Ausschlusskriterien der Cortisol-Kohorte.....              | 27 |
| <b>2.5 Einteilung der Kohorten in Untergruppen</b> .....                  | 29 |
| 2.5.1 Hodenvolumen und LH-Spiegel.....                                    | 29 |
| 2.5.2 Brustentwicklungsstadium und Alter.....                             | 30 |
| 2.5.3 Abnahmeuhrzeit.....   | 31 |
| <b>2.6 Deskriptive Statistik</b> .....                                    | 32 |
| 2.6.1 Testosteron-Kohorte.....  | 32 |
| 2.6.1.1 Gruppengröße.....   | 32 |
| 2.6.1.2 Altersverteilung.....   | 32 |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.6.1.3 Diagnosen.....  | 33        |
| 2.6.2 Estradiol-Kohorte.....  | 35        |
| 2.6.2.1 Gruppengröße.....   | 35        |
| 2.6.2.2 Altersverteilung.....   | 35        |
| 2.6.2.3 Diagnosen.....  | 36        |
| 2.6.3 Cortisol-Kohorte.....   | 38        |
| 2.6.3.1 Gruppengröße.....   | 38        |
| 2.6.3.2 Altersverteilung.....   | 38        |
| 2.6.3.3 Geschlechterverteilung.....   | 40        |
| 2.6.3.4 Diagnosen.....  | 40        |
| <br>  |           |
| <b>3. ERGEBNISSE.....</b>   | <b>43</b> |
| <b>3.1 Referenzbereiche für die Testosteronkonzentration bei Jungen.....</b>                          | <b>43</b> |
| <b>3.2 Referenzbereiche für die Estradiolkonzentration bei Mädchen.....</b>                           | <b>45</b> |
| <b>3.3 Referenzbereiche für die Cortisolkonzentration bei Kindern.....</b>                            | <b>47</b> |
| <br>  |           |
| <b>4. DISKUSSION.....</b>   | <b>48</b> |
| <b>4.1 Referenzwertermittlung aus Messwerten von kranken Kindern.....</b>                             | <b>48</b> |
| <b>4.2 Unterschiedliche Definitionen der Referenzbereiche.....</b>                                    | <b>49</b> |
| <b>4.3 Einflüsse auf die Hormonspiegel, die in dieser Studie nicht<br/>berücksichtigt wurden.....</b> | <b>50</b> |
| <b>4.4 Diskussion der Ergebnisse der Testosteronreferenzbereiche.....</b>                             | <b>54</b> |
| 4.4.1 Vergleich verschiedener Einteilungskriterien der Pubertäts-<br>stadien.....                     | 55        |
| 4.4.2 Die Ergebnisse dieser Studie im Kontext anderer Studien.....                                    | 57        |
| <b>4.5 Diskussion der Ergebnisse der Estradiolreferenzbereiche.....</b>                               | <b>64</b> |
| 4.5.1 Die Ergebnisse dieser Studie im Kontext anderer Studien.....                                    | 64        |
| <b>4.6 Diskussion der Ergebnisse der Cortisolreferenzbereiche.....</b>                                | <b>69</b> |
| 4.6.1 Die Ergebnisse dieser Studie im Kontext anderer Studien.....                                    | 69        |
| <b>4.7 Schlussfolgerung.....</b>  | <b>75</b> |
| <br>  |           |
| <b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>  | <b>76</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>6. ANHANG.....</b>   | <b>79</b> |
| <b>6.1 Mädchen mit vermuteter Einnahme von oralen Kontrazeptiva.....</b>    | <b>79</b> |
| <b>6.2 Patienten und Patientinnen mit nicht zugeordneten Diagnosen.....</b> | <b>80</b> |
| 6.2.1 Testosteron-Kohorte.....  | 80        |
| 6.2.2 Estradiol-Kohorte.....  | 82        |
| 6.2.3 Cortisol-Kohorte.....   | 83        |
| <b>7. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>   | <b>88</b> |
| <b>Erklärung zum Eigenanteil.....</b>                                       | <b>95</b> |
| <b>Danksagung.....</b>  | <b>96</b> |

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|       |   |
|-------|---|
| ACTH  | Adrenocorticotropes Hormon, Adrenocorticotropin   |
| AGS   | Adrenogenitales Syndrom   |
| CRH   | Corticotropin-Releasing Hormon  |
| EDTA  | Ethylendiamintetraessigsäure  |
| FSH   | Follikelstimulierendes Hormon   |
| GnRH  | Gonadotropin-Releasing Hormon   |
| hCG   | humanes Choriogonadotropin  |
| HV    | Hodenvolumen  |
| KEV   | Konstitutionelle Entwicklungsverzögerung, konstitutionelle Verzögerung von Entwicklung und Pubertät |
| LH    | Luteinisierendes Hormon, Lutropin   |
| Max.  | Maximum   |
| Min.  | Minimum   |
| MW    | Mittelwert  |
| N     | Anzahl  |
| SD    | Standardabweichung  |
| SGA   | Small for gestational age, vorgeburtliche Wachstumsverzögerung                                      |
| V. a. | Verdacht auf  |
| Z. n. | Zustand nach  |
| ZNS   | Zentrales Nervensystem  |

## 1. EINLEITUNG

Der häufig verwendete Spruch „Kinder sind keine kleinen Erwachsenen“ trifft auf viele Bereiche der Medizin zu. So können sich die selben Krankheiten bei Kindern mit anderen Symptomen äußern, als sie bei Erwachsenen üblich sind. Auch können die Dosierungen von Medikamenten teilweise nicht einfach auf das geringere Körpergewicht der Kinder umgerechnet werden, sondern müssen wegen des speziellen Stoffwechsels im Kindesalters manchmal höher oder niedriger dosiert werden. Laborergebnisse können außerdem nicht immer anhand von Referenzwerten für Erwachsene beurteilt werden, sondern es sind eigene Referenzwerte für das Alter oder das Entwicklungsstadium der Kinder notwendig.

Mit dem zuletzt genannten Punkt beschäftigt sich diese Arbeit. Dazu wurden Referenzbereiche für die im Hormonlabor der Tübinger Universitätskinderklinik verwendeten Messsysteme für folgende Hormone ermittelt: für die Geschlechtshormone Testosteron bei Jungen und Estradiol bei Mädchen in den einzelnen Pubertätsstadien sowie für das Stresshormon Cortisol bei Kindern in verschiedenen Abnahmezeiträumen.

### **1.1 Ermittlung von Referenzbereichen für Hormone bei Kindern**

Referenzbereiche sollen allgemein dazu dienen, bei Patienten gemessene Werte einordnen und beurteilen zu können. In der Medizin wird häufig der Bereich als Referenzbereich angegeben, in welchem sich 95 % der Messergebnisse von Gesunden befinden. Diese Definition bedeutet im Umkehrschluss, dass auch 5 % der Gesunden Messwerte außerhalb des Referenzbereiches aufweisen. Wird der Referenzbereich als der Bereich zwischen der zehnten und der 90. Perzentile definiert, befindet sich sogar bei jedem zehnten Gesunden der Messwert außerhalb des Referenzbereiches.

Vor allem in der Pädiatrie ist es sehr schwierig, ausreichend viele Messwerte von gesunden Kindern zu bekommen, um aussagekräftige Referenzbereiche ermitteln zu können. Zu der Bestimmung der Serumhormone ist eine Blutentnahme notwendig, aber die meisten Kinder und auch deren Eltern würden nicht



mehr Blutentnahmen zustimmen, als unbedingt notwendig sind. Folglich stammen die Messergebnisse oft von Kindern, bei denen ohnehin Blut abgenommen wurde. Dies sind allerdings im Allgemeinen Kinder mit Erkrankungen oder zumindest mit Symptomen und Verdachtsdiagnosen zur Abklärung. Es gibt mathematische Verfahren, wie beispielsweise das Hoffmann-Vorgehen (Hoffmann RG, 1963), die es ermöglichen, aus Daten, die von kranken Patienten stammen, Referenzbereiche zu ermitteln. Deren Anwendung wäre in dieser Studie allerdings nicht sinnvoll gewesen, wie in Abschnitt 4.1 (S. 48 f.) genauer erläutert wird.

## **1.2 Klinische Relevanz der Referenzbereiche**

### **1.2.1 Die Sexualhormone Testosteron und Estradiol**

Bei Testosteron und Estradiol handelt es sich um Steroidhormone. Die Biosynthese von Testosteron aus Cholesterin findet bei Jungen in den Leydigzellen im Hoden und in geringem Maß in der Nebennierenrinde und anderen Geweben statt. Bei Mädchen erfolgt die Biosynthese von Androgenen in den Thekazellen der Ovarien. Anschließend folgt die Umwandlung in das weibliche Geschlechtshormon Estradiol durch das Enzym Aromatase in den Granulosazellen der Ovarien. Auch bei Mädchen werden geringe Mengen an Estradiol in der Nebennierenrinde sowie weiteren Geweben gebildet. Jungen produzieren ebenfalls Estradiol, genauso wie Mädchen auch Testosteron bilden, die Konzentrationen sind dabei allerdings spätestens ab der pubertären Entwicklung jeweils deutlich niedriger als beim anderen Geschlecht.

Die Produktion der Sexualhormone wird durch das Luteinisierende Hormon (LH, Lutropin) aus der Hypophyse angeregt, dessen Ausschüttung wiederum durch das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) aus dem Hypothalamus stimuliert wird. Präpubertär wird der GnRH-Pulsgenerator noch durch zentralnervöse Einflüsse gehemmt. Die Aufhebung dieser Hemmung führt zu einer pulsatilen Sekretion von GnRH, das wiederum zu einer pulsatilen Ausschüttung von LH und Follitropin (follikelstimulierendes Hormon, FSH) führt und das Einsetzen der Pubertät mit Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale bedingt. (Hauffa BP, 2010)

Die Messung der Sexualhormone im Serum wird vor allem bei Kindern durchgeführt, bei denen der Verdacht auf eine Störung der Pubertät vorliegt. Ganz allgemein kann man zwischen Störungen, die zu einer verfrühten Pubertät führen, und solchen, die zu einer verzögert einsetzenden, nicht weiter fortschreitenden oder ausbleibenden Pubertät führen, unterscheiden. Eine frühe Pubertät kann als Normvariante, häufig bei positiver Familienanamnese, auftreten und hat in diesem Fall keinen Krankheitswert und keine Behandlungsbedürftigkeit. Die Kinder sind schon vor der Pubertät meist größer als ihre Altersgenossen und kommen dann früh in die Pubertät, was zu einem weiteren Wachstumsschub führt. Aber sie schließen die Pubertätsentwicklung wie auch das Wachstum früher ab als ihre Altersgenossen und befinden sich mit ihrer Endgröße schließlich im Streubereich ihrer Zielgröße. Diese Normvariante wird als „konstitutionelle Entwicklungsbeschleunigung“ bezeichnet. (Hauffa BP, 2010)

Ebenso gibt es auch eine verspätete Pubertät als Normvariante. Die Kinder gehören vor ihrem Pubertätsbeginn meist zu den Kleineren. Die Pubertät der Kinder beginnt zwar verspätet, aber läuft ansonsten spontan und normal ab. Der damit verbundene pubertäre Wachstumsschub tritt bei diesen Kindern in einem Alter auf, in dem der Wachstumsschub der Altersgenossen meist schon abgeschlossen ist. Durch dieses „Aufholwachstum“ wird von den Kindern meist eine Endgröße im Streubereich ihrer Zielgröße erreicht. Auch wenn es sich bei dieser als „konstitutionelle Verzögerung von Wachstum und Pubertät“ (KEV) bezeichneten Normvariante nicht um eine Erkrankung handelt, kann sie doch bei den betroffenen Kindern zu einem erheblichen Leidensdruck führen, da sie zeitweise zum einen kleiner und zum anderen von der körperlichen pubertären Entwicklung verzögert im Vergleich zu ihren Altersgenossen sind. (Binder G, 2010)

Von diesen Normvarianten zu unterscheiden sind einige Erkrankungen, die zum Teil ohne Therapie erhebliche Folgen für die Kinder und ihre Entwicklung hätten. Im Folgenden werden kurz einige Krankheitsbilder beleuchtet, für deren Diagnose die Messung der Sexualhormone im Serum und deren Bewertung anhand von geeigneten Referenzbereichen wichtig ist.

### **1.2.1.1 Pubertas praecox**

Bei der Pubertas praecox werden zwei verschiedene Formen unterschieden: die GnRH-abhängige Pubertas praecox vera und die GnRH-unabhängige Pseudopubertas praecox. Die rechtzeitige Diagnose und Therapie der Pubertas praecox ist sehr wichtig, da es sonst bei den Kindern zu einem verfrühten pubertären Wachstumsschub kommt, wodurch die Kinder zunächst im Vergleich zu ihren Altersgenossen eher groß erscheinen. Jedoch führt dies auch zu einem vorzeitigen Verschluss der Wachstumsfugen, was letzten Endes zu einem erheblichen Kleinwuchs der Kinder führen kann. (Hauffa BP, 2010)

#### **1.2.1.1.1 Pubertas praecox vera**

Bei gesunden Kindern beginnt die Pubertät, wenn die hemmenden zentralnervösen Einflüsse auf den hypothalamischen GnRH-Pulsgenerator aufgehoben werden. Außerdem wird die Sensitivität des Hypothalamus und der Hypophyse auf zirkulierende Geschlechtshormone herabgesetzt. Eine verminderte Sensitivität verringert den negativen Feedbackmechanismus. GnRH stimuliert in der Hypophyse die Ausschüttung von LH und FSH, welche dann die Produktion der Sexualhormone in den Gonaden anregen, die schließlich zur Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale führen.

Setzen diese Mechanismen verfrüht ein, spricht man von einer Pubertas praecox vera. Die Ursachen hierfür können sehr unterschiedlich sein. Es gibt Formen der Pubertas praecox, die familiär gehäuft auftreten. Eine Pubertas praecox vera kann in Verbindung mit Syndromen wie beispielsweise dem Williams-Beuren-Syndrom stehen. Auch nach verschiedenen Schädigungen des zentralen Nervensystems (ZNS), sei es durch ein Trauma, entzündliche oder vaskuläre ZNS-Erkrankungen oder verschiedene ZNS-Tumoren, kann es später zu einem Auftreten einer Pubertas praecox vera kommen, wenn dadurch die pubertätsinhibierenden Strukturen im Gehirn beschädigt wurden. In den meisten Fällen tritt die Pubertas praecox vera allerdings idiopathisch auf. (Hauffa BP, 2010)

### **1.2.1.1.2 Pseudopubertas praecox**

Von der Pubertas praecox vera ist die GnRH-unabhängige Pseudopubertas praecox zu unterscheiden. Bei dieser kommt es zu einem Anstieg der Sexualsteroiden, der nicht durch die Hormone des Hypothalamus getriggert ist. Durch den negativen Feedback-Mechanismus ist der GnRH-Spiegel sogar vermindert. Die Ursachen einer Pseudopubertas praecox können sehr unterschiedlich sein und sind zum Teil geschlechtsspezifisch.

Bei dem McCune-Albright-Syndrom kommt es neben den typischen Café-au-lait-Flecken und den Knochenveränderungen zu einer vorzeitigen Pubertät. Bei Mädchen kann die Pubertät in Schüben verlaufen aufgrund immer wieder auftretender östrogenproduzierender Ovarialzysten, die sich wieder spontan zurückbilden, gefolgt von Ruhephasen. Östrogenproduzierende Ovarialzysten können auch isoliert ohne Vorliegen eines McCune-Albright-Syndromes vorkommen und eine Pseudopubertas praecox bei Mädchen auslösen.

Tumoren, die humanes Choriogonadotropin (hCG) produzieren, das die Leydigzellen zur Testosteronproduktion anregt, können bei Jungen zu einer Pseudopubertas praecox führen. Bei Mädchen sind östrogenproduzierende Tumoren, z. B. beim Peutz-Jeghers-Syndrom, eher eine seltene Ursache einer Pseudopubertas praecox.

Mutationen der LH-Rezeptoren, die dadurch auch ohne LH-Bindung die Leydigzellen zur Testosteronproduktion anregen, lösen eine Pseudopubertas praecox bei Jungen aus. Bei Mädchen kann die Ursache eine aktivierende Mutation in dem Gen sein, das für die Aromatase kodiert, welche die Umwandlung von Androgenen in Östrogene katalysiert.

Auch die Exposition mit exogenen Androgenen bei Jungen und Östrogenen bei Mädchen kann Ursache einer Pseudopubertas praecox sein. (Hauffa BP, 2010) Das Adrenogenitale Syndrom (AGS) beschreibt eine meist autosomal-rezessiv vererbte Störung in der Biosynthese der Steroidhormone, die mit einer gestörten Geschlechtsdifferenzierung einhergeht. Die häufigste Ursache ist ein Mangel an 21-Hydroxylase, wobei es zahlreiche andere Enzyme gibt, deren Mangel oder Defekt zu verschiedenen Formen des AGS führen. Die Erläuterung der genauen Pathomechanismen und der Unterschiede zwischen

all diesen Formen würde an dieser Stelle zu sehr in die Tiefe gehen. Ganz allgemein führen die Defekte zu einer verminderten oder fehlenden Synthese von Glukokortikoiden. Der Mangel führt zu einer dauerhaften Stimulation der Nebennierenrinde durch erhöhte Spiegel des adrenocorticotropen Hormons (ACTH). Die Vorstufen der Steroidhormone akkumulieren und aus ihnen werden vermehrt die Hormone synthetisiert, deren Synthese nicht vom Enzymdefekt betroffen ist. Je nachdem, welcher Schritt der Biosynthese defekt ist, kommt es zu einem alleinigen Mangel an Glukokortikoiden und erhöhten Spiegeln der Sexualhormone. Dies führt bei Mädchen zu einer unterschiedlich massiv ausgeprägten, meist pränatal auftretenden Virilisierung und einer heterosexuellen Pseudopubertas praecox. Bei Jungen kommt es zu einer isosexuellen Pseudopubertas praecox. Nicht selten ist nicht nur die Synthese der Glukokortikoide, sondern auch die der Mineralokortikoide gestört, wodurch zusätzlich zur oben beschriebenen Symptomatik ein Salzverlustsyndrom vorliegt. Selten liegt ein Defekt vor, der ebenfalls die Synthese der Sexualhormone betrifft, was zu einer fehlenden oder gestörten Geschlechtsentwicklung führt. (Riepe FG, 2010)

#### **1.2.1.2 Pubertas tarda**

Bei der Pubertas tarda können zwei Formen voneinander unterschieden werden: der hypogonadotrope Hypogonadismus, bei dem nicht nur die Spiegel von Testosteron bzw. Estradiol, sondern auch die von LH und FSH erniedrigt sind, und der hypergonadotrope Hypogonadismus, bei dem zwar hohe LH- und FSH-Spiegel vorliegen, Testosteron bzw. Estradiol aber trotzdem nicht in ausreichender Menge gebildet wird. Bei Vorliegen einer Pubertas tarda ist die Therapie mit Testosteron bei Jungen und Estradiol bei Mädchen indiziert, um die Pubertät in Gang zu setzen. Ohne Therapie würde es bei den Kindern zum einen nicht zu einer Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale kommen, zum anderen wären sie zum Teil aufgrund des ausbleibenden pubertären Wachstumsschubes kleinwüchsig. (Hauffa BP, 2010)

#### **1.2.1.2.1 Hypogonadotroper Hypogonadismus**

Die mangelhafte LH- und FSH-Sekretion kann durch verschiedene ZNS-Schädigungen hervorgerufen werden wie beispielsweise durch ein Trauma, Fehlbildungen, einen Tumor, entzündliche Erkrankungen oder als Folge einer Bestrahlung. Häufig verursachen solche Schädigungen gleich multiple Hormonausfälle auf der Ebene des Hypothalamus und der Hypophyse.

Zu einem isolierten GnRH-Ausfall kommt es bei dem Kallmann-Syndrom und anderen monogenen Störungen der GnRH-Ausschüttung. Auch andere Syndrome, wie z. B. das Prader-Willi-Syndrom, gehen typischerweise mit einer zentralen Pubertas tarda einher.

Außerdem kann es im Rahmen von chronischen und schweren Allgemeinerkrankungen, z. B. Essstörungen, zu einem funktionellen hypogonadotropen Hypogonadismus kommen. (Hauffa BP, 2010)

#### **1.2.1.2.2 Hypergonadotroper Hypogonadismus**

Dass die Gonaden trotz Stimulation durch die hypophysären Hormone nicht ausreichend Testosteron bzw. Estradiol produzieren, kann Folge einer Schädigung der Keimdrüsen durch Noxen, Traumen, Infektionen, Bestrahlung oder als Begleiterscheinung einer schweren chronischen Erkrankung oder Endokrinopathie sein. Der hypergonadotrope Hypogonadismus kann auch bei dem Klinefelter-Syndrom (Karyotyp 47,XXY) auftreten, bei dem die Jungen oft eher kleine Hoden mit einer herabgesetzten Spermaproduktion aufweisen. Mädchen mit einem Ullrich-Turner-Syndrom (Karyotyp 45,X) haben häufig eine primäre Ovarialinsuffizienz. Auch andere Syndrome, wie beispielsweise das Noonan-Syndrom, können mit einem hypergonadotropen Hypogonadismus einhergehen, der häufig durch einen Hodenhochstand bedingt ist. Die Ursache für einen hypergonadotropen Hypogonadismus kann auch bei einer Störung auf der Ebene der Hormonsynthese oder der Rezeptoren liegen. Dazu zählen partiell inaktivierende Mutationen des Gens für den LH-Rezeptor oder partielle Defekte der Testosteronbiosynthese bei erhaltenem männlichem Phänotyp, genauso wie komplette Defekte der Testosteronbiosynthese oder eine vollständig inaktivierende Mutation des LH-Rezeptor-Gens bei Mädchen mit dem

Karyotyp 46,XY, sowie partielle Defekte der Estradiolbiosynthese oder Aromatasemangel bei Mädchen. (Hauffa BP, 2010)

### **1.2.2 Cortisol**

Cortisol ist ein lebenswichtiges Hormon, das in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde über mehrere Zwischenschritte aus Cholesterin synthetisiert wird. Zu den Wirkungen von Cortisol gehört die Stimulation der Glukoneogenese und der Proteinsynthese in der Leber bei gleichzeitiger eiweiß- und fettkataboler Wirkung in der Peripherie und eine Steigerung der Kalzium-, Phosphat- und Kaliumausscheidung, während Natrium vermehrt retiniert wird. Zudem hat Cortisol vor allem in pharmakologischen Dosen eine hemmende Wirkung auf Immun- und Entzündungsreaktionen sowie auf die Skelettreifung, das Längenwachstum und die Pubertätsentwicklung.

Die Synthese von Cortisol in der Nebenniere wird durch das Hormon ACTH stimuliert, welches im Vorderlappen der Hypophyse gebildet wird. Die ACTH-Freisetzung wird wiederum durch das Corticotropin-Releasing Hormon (CRH) aus dem Hypothalamus stimuliert.

Sowohl ein Überschuss, als auch ein Mangel an Cortisol haben schwerwiegende Folgen für den Organismus. Die Messung des Cortisolspiegels und die Bewertung anhand von geeigneten Referenzwerten sind daher bei Kindern, bei denen der Verdacht auf einen Mangel oder einen Überschuss an Cortisol besteht, unerlässlich.

Ein Mangel führt zu Müdigkeit, Apathie, einer verminderten Stresstoleranz, erniedrigten Blutzuckerspiegeln, arterieller Hypotonie und einer erhöhten Infektanfälligkeit. Vor allem die Hypoglykämieeigung kann bei Kindern mit einem Cortisolmangel zu sehr kritischen Verläufen führen.

Der Überschuss an Cortisol führt zu dem so genannten Cushing-Syndrom, das mit Stammfettsucht, Stiernacken, Vollmondgesicht, dünner Haut, arterieller Hypertonie, Muskelschwäche, Akne, Striae distensae, diabetischer Stoffwechsellage, Osteoporose, Infektanfälligkeit, psychischen Auffälligkeiten und Stimmungsschwankungen einhergehen kann. Hinzu kommen bei einem

Cushing-Syndrom im Kindesalter eine Wachstums- und Pubertätsstörung. (Riepe FG, 2010)

In den folgenden Abschnitten werden einige mögliche Ursachen eines Mangels bzw. eines Überschusses an Cortisol im Kindesalter kurz erläutert.

### **1.2.2.1 Hypocortisolismus**

Bei einem Hypocortisolismus durch eine primäre Nebenniereninsuffizienz liegt die Störung auf der Ebene der Nebenniere selbst und führt zu einer verminderten Cortisolbildung. Ursachen dafür können beispielsweise eine isolierte oder im Rahmen weiterer Fehlbildungen auftretende Nebennierenhypoplasie oder eine autoimmunologisch bedingte Zerstörung der Nebennierenrinde beim M. Addison sein. Auch Infektionskrankheiten wie die Tuberkulose oder Blutungen in den Nebennieren – beispielsweise bei einem Waterhouse-Friderichsen-Syndrom – können zu einer primären Nebenniereninsuffizienz führen. Das AGS, bei dem eine Störung der Biosynthese der Steroidhormone vorliegt, wurde bereits auf S. 5 f. kurz erläutert.

Von einer sekundären Nebenniereninsuffizienz spricht man, wenn es eine Funktionsstörung auf der Ebene der Hypophyse gibt, die zu einer verminderten ACTH-Bildung führt. Sie ist allerdings nur eine sehr seltene Ursache für einen Hypocortisolismus.

Etwas häufiger kommt die tertiäre Form vor, bei der eine Störung auf der Ebene des Hypothalamus zu einer verminderten Bildung von CRH führt. Als Ursachen dafür kommen unter anderem verschiedene Fehlanlagen des Gehirns, ZNS-Tumoren oder deren Therapie in Form von Bestrahlung oder neurochirurgischen Eingriffen in Frage (Dörr HG, 1999). Unter der Therapie mit Glukokortikoiden kommt es in Abhängigkeit der Therapiedauer und der Dosierung zu einer Suppression der endogenen Glukokortikoidproduktion mit erniedrigten Spiegeln von CRH und ACTH. Ein abruptes Absetzen kann aufgrund dieser Suppression zu einer akuten und bedrohlichen Nebennierenrindeninsuffizienz führen (Dörr HG, 1999).



### **1.2.2.2 Hypercortisolismus**

Die häufigste Ursache für einen erhöhten Cortisolspiegel ist die Therapie mit Kortikosteroiden z. B. bei der Therapie von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises oder von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Eine weitere Ursache für einen Hypercortisolismus ist der Morbus Cushing. Darunter versteht man eine inadäquat erhöhte Produktion von ACTH beispielsweise aufgrund eines Mikroadenoms der Hypophyse, die zu einer bilateralen Hyperplasie der Nebennierenrinden und einer gesteigerten Glukokortikoidproduktion führt. Selten ist der ACTH-Spiegel bei Kindern aufgrund einer ectopen Produktion erhöht.

Benigne makro- oder mikronoduläre Veränderungen der Nebennierenrinde und maligne adrenale Tumoren können durch die erhöhte Glukokortikoidbiosynthese Ursache eines Cushing-Syndroms sein. Diese Veränderungen können isoliert, in Zusammenhang mit einem Syndrom oder multiplen endokrinen Neoplasien auftreten. Bei den malignen Tumoren handelt es sich außerdem häufig um Mischtumoren, sodass nicht nur die Biosynthese der Glukokortikoide, sondern auch die der Sexualhormone gesteigert ist, was das Bild einer Pseudopubertas praecox verursacht. (Riepe FG, 2010)

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Präanalytik

Den Patienten wird in der Regel mit Hilfe einer Flügelkanüle venöses Blut aus einer peripheren Vene abgenommen. Bei kleinen Kindern oder schwierig zu punktierenden Venen wird stattdessen das venöse Blut direkt aus der Kanüle in die Proberöhrchen abgetropft.

Für die Konzentrationsbestimmung der oben genannten Hormone wird Vollblut in Abnahmeröhrchen ohne Zusätze, also ohne Antikoagulantien, verwendet. Dazu werden die Proberöhrchen, die das geronnene Blut enthalten, bei 2.500 x g für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Serum mit einer Pipette mit Einmal-Spitzen abpipettiert, aliquotiert und bis zur Messung bei -20 °C eingefroren.

Die Hormone können teilweise auch aus Plasma bestimmt werden. Dazu werden Röhrchen mit Ethylendiamintetraessigsäure- (EDTA-) oder Heparin-Zusatz verwendet. Nach der Abnahme müssen diese gemischt werden. Es folgt die Zentrifugation bei 2.500 x g für fünf Minuten. Das Plasma wird anschließend mit einer Pipette mit Einmal-Spitzen abpipettiert, wie das Serum aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

Für die Bestimmungen von Estradiol, Testosteron und Cortisol werden die Serum- oder Plasmaproben unverdünnt eingesetzt. Die Mindestmenge beträgt 150 µl pro Bestimmung. Da vor allem Cortisol, aber auch die Sexualhormone eine circadiane Rhythmik haben, wird stets die Abnahmezeit vermerkt. Für die Bestimmung der Estradiolkonzentration kann laut Hersteller des verwendeten Assays sowohl Serum als auch EDTA-, Heparin- oder Natriumzitat-Plasma genutzt werden. Laut Hersteller des verwendeten Assays für Testosteron kann außer Serum ebenfalls Heparin-Plasma benutzt werden. EDTA-Plasma liefert Ergebnisse, die etwa 10 % niedriger sind. Die Bestimmung der Cortisolkonzentration wird vom Hersteller der verwendeten Messmethode nur aus Serum empfohlen.

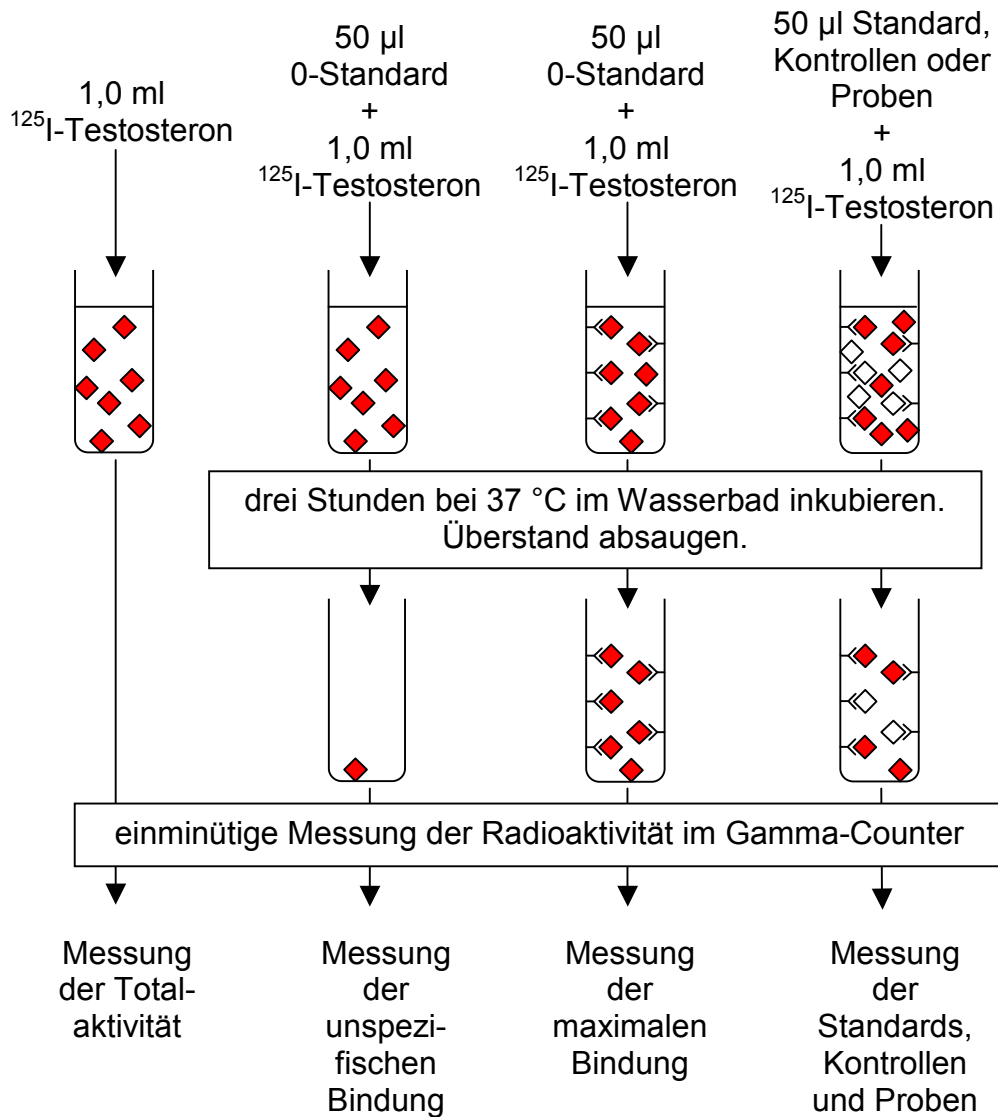
## 2.2 Assays

### 2.2.1 Testosteron-Assay





Der quantitative Nachweis von Testosteron erfolgte im endokrinologischen Labor der Kinderklinik Tübingen mit Hilfe eines spezifischen kompetitiven Festphasen-Radioimmunoassays, dem Coat-A-Count, Total Testosterone, Siemens Health Care Diagnostics. Der Messbereich erstreckt sich von 4 ng/dl bis 1600 ng/dl. Die Inter-Assay-Varianz beträgt 9,3 % und die Intra-Assay-Varianz 6,4 %. Das Testprinzip wird schematisch in Abb. 1 dargestellt und im Folgenden kurz erläutert.

Für die Messung der Totalaktivität und der unspezifischen Bindung wurden jeweils unbeschichtete Polypropylen-Röhrchen verwendet, ansonsten handelte es sich immer um Polypropylen-Röhrchen, die innen mit Antikörpern gegen Testosteron beschichtet waren. In die unbeschichteten Röhrchen zur Messung der unpezifischen Bindung und die beschichteten Röhrchen für die Messung der maximalen Bindung wurden 50 µl 0-Standard pipettiert. In alle anderen Röhrchen wurden 50 µl der Standards, Kontrollen oder Proben hineinpipettiert. In sämtliche Röhrchen wurden zusätzlich 1,0 ml  $^{125}\text{I}$ -Testosteron gegeben, auch in ein unbeschichtetes Röhrchen für die Bestimmung der Totalaktivität, welches bis zur Messung der Radioaktivität im Gamma-Counter zur Seite gestellt wurde. Die Röhrchen wurden bei 37 °C für drei Stunden im Wasserbad inkubiert. In dieser Zeit konkurrierte das Testosteron der Proben, Kontrollen oder Standards mit dem radioaktiv markierten Testosteron um die Antikörperbindungsstellen in den Röhrchen. Anschließend wurde in den Röhrchen der Überstand abgesaugt. Es folgte die einminütige Messung der Radioaktivität im Gamma-Counter. In dem Röhrchen, in dem sich die 1,0 ml  $^{125}\text{I}$ -Testosteron befanden, die nicht abgesaugt wurden, wurde die Totalaktivität gemessen, also wieviele Counts per Minute unabhängig von der Bindung bei 1,0 ml  $^{125}\text{I}$ -Testosteron im Gamma-Counter gezählt wurden. In dem anderen unbeschichteten Röhrchen befand sich nach dem Absaugen nur noch soviel  $^{125}\text{I}$ -Testosteron, wie unspezifisch an die Röhrchenwand gebunden war. Die gemessenen Counts per Minute mussten anschließend von den Ergebnissen der Proben, Kontrollen und Standards abgezogen werden. In den beschichteten Röhrchen, in denen sich

außer 1,0 ml  $^{125}\text{I}$ -Testosteron nur 0-Standard befand, wurde die maximale Bindung gemessen, denn in diesen Röhrchen gab es kein weiteres Testosteron außer dem radioaktiv markierten, das um die Bindungsstellen konkurrieren konnte. Dieser Wert war wichtig, da die Ergebnisse in Prozent der Maximalbindung bestimmt wurden. In den Röhrchen der Proben, Kontrollen und Standards waren umso weniger Bindungsstellen mit radioaktivem Testosteron besetzt, je mehr weiteres unmarkiertes Testosteron sich in ihnen befand. Je höher die Testosteronkonzentration in den Proben, Standards und Kontrollen also war, desto weniger Counts per Minute wurden im Gamma-Counter gezählt. Anhand der Standards erstellte das Programm des Gamma-Counters automatisch eine Standardkurve, anhand derer die Ergebnisse der Kontrollen und Patientenproben berechnet wurden.



Legende:

-  unbeschichtetes 12 x 75 mm Polypropylen-Röhrchen
-  mit Antikörpern gegen Testosteron beschichtete 12 x 75 mm Polypropylen-Röhrchen
-   $^{125}\text{I}$ -markiertes Testosteron
-  unmarkiertes Testosteron aus den Patientenproben, Standards oder Kontrollen

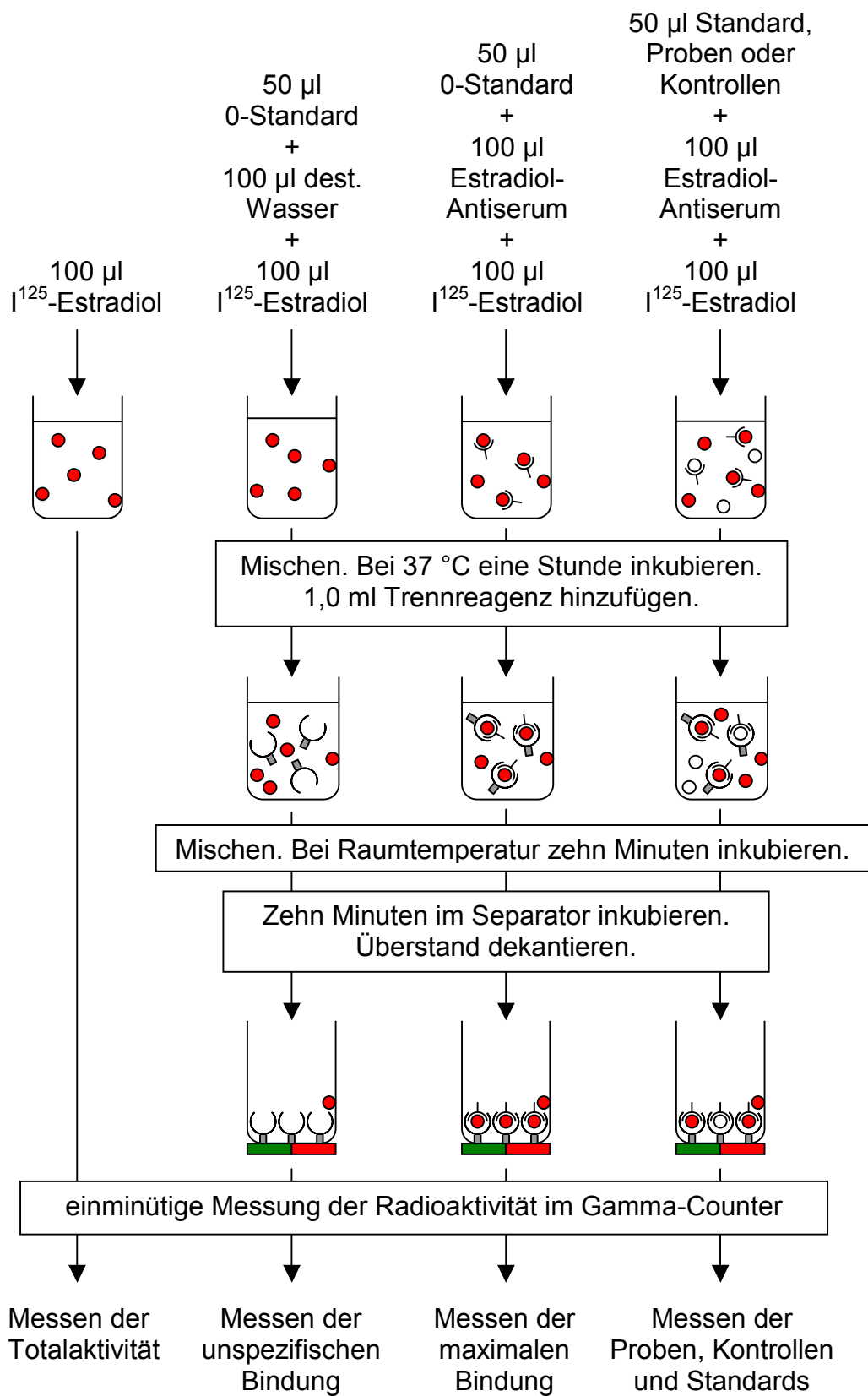
**Abb. 1:** Schematische Darstellung des Messprinzips des Testosteron-Assays Coat-A-Count mit der dazugehörigen Legende.

### 2.2.2 Estradiol-Assay

Die quantitative Bestimmung von 17 $\beta$ -Estradiol erfolgt mit Hilfe des kompetitiven Radioimmunoassays Estradiol Maia der Firma Radim. Der Messbereich erstreckt sich von 5 pg/ml bis 5000 pg/ml. Die Inter-Assay-Varianz beträgt 9,8 % und die Intra-Assay-Varianz 9,3 %.

In Abb. 2 wird das Testprinzip schematisch dargestellt. In die Röhren zur Messung der unspezifischen Bindung wurden 100  $\mu$ l destilliertes Wasser pipettiert, sowie 50  $\mu$ l 0-Standard. Die maximale Bindung wurde in Röhren gemessen, in die zunächst 50  $\mu$ l 0-Standard und 100  $\mu$ l Estradiol-Antiserum pipettiert wurden. In alle anderen Röhren wurden 50  $\mu$ l der Standards, Proben oder Kontrollen pipettiert und ebenfalls 100  $\mu$ l des Antiserums hinzugefügt. In alle Röhren wurden anschließend 100  $\mu$ l <sup>125</sup>I-markiertes Estradiol gefüllt, auch in ein Röhren für die Messung der Totalaktivität, welches bis zur Messung zur Seite gestellt wurde. Nach dem Mischen wurden die Röhren bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Das radioaktiv markierte Estradiol und das normale Estradiol konkurrierten dabei um die Antikörperbindungsstellen des Antiserums. Anschließend wurden in die Röhren jeweils 1,0 ml Trennreagenz hinzugegeben. Dabei handelt es sich um Antikörper gegen Estradiol-Antikörper-Komplexe, die kovalent an magnetisierbare Partikel gebunden sind. Nach erneuter Inkubation für zehn Minuten bei Raumtemperatur kamen die Röhren für ebenfalls zehn Minuten in einen Separator und der Überstand wurde dekantiert. Die magnetische Platte des Separators sorgte dafür, dass die Antikörper des Trennreagenz aufgrund ihrer magnetisierbaren Eigenschaft mit allem, was an sie gebunden hat, in den Röhren gehalten wurden. Danach folgte die einminütige Messung der Radioaktivität im Gamma-Counter. Die unspezifische Bindung wurde in den Röhren gemessen, in die kein Estradiol-Antiserum hinzugefügt wurde. Die gemessene Anzahl von Counts per Minute musste von den anderen Ergebnissen abgezogen werden. In den Röhren, in denen außer dem radioaktiv markierten Estradiol kein weiteres Estradiol war, sodass alle Antikörperbindungsstellen des Antiserums mit radioaktivem Estradiol besetzt werden konnten, wurde die maximale Bindung gemessen. In den Proben, Kontrollen und Standards wurden umso

weniger Counts per Minute im Gamma-Counter gemessen, je höher die Estradiolkonzentrationen in ihnen war. Mit den Standards wurde vom Programm des Gamma-Counters automatisch eine Kurve erstellt, anhand derer die Konzentrationen der Proben und Kontrollen berechnet wurden.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung des Messprinzips des Estradiol-Assays Maia.



Legende:



Teströhrchen 10 x 70 mm



$I^{125}$ -markiertes Estradiolderivat



unmarkiertes Estradiol aus den Patientenproben, Standards oder Kontrollen



Antikörper gegen Estradiol



Antikörper gegen Estradiol-Antikörper-Komplexe, der kovalent an einen magnetisierbaren Partikel gebunden ist



Magnetplatte, die als Separator dient

**Fortsetzung Abb. 2:** Legende zur schematischen Darstellung des Messprinzips des Estradiol-Assays Maia.

### 2.2.3 Cortisol-Assay

In der Universitätskinderklinik Tübingen erfolgt die quantitative Bestimmung von Cortisol durch einen Chemilumineszenz-Immunoassay mit dem Messautomat Immulite der Firma Siemens Health Care Diagnostics. Der Messautomat führt das Pipettieren der Reagenzien, die Einhaltung der Inkubationszeiten, die Waschungen, das Zentrifugieren und die Messungen automatisch durch. Der Messbereich erstreckt sich von 1 µg/dl bis 50 µg/dl. Die Inter-Assay-Varianz beträgt 9,4 % und die Intra-Assay-Varianz liegt bei 5,4 %.

In Abb. 3 wird das Testprinzip des Assays schematisch dargestellt. Auf eine Darstellung der Kalibrierung wurde bei dieser Skizze verzichtet. Eine Kalibrierung wird alle zwei Wochen durchgeführt. Bei jeder Messung werden Kontrollen mitbestimmt. Da der Test vollautomatisch durchgeführt wird, werden im Folgenden keine Mengenangaben der zu pipettierenden Reagenzien angegeben.

Das Serum wurde für die Cortisolbestimmung unverdünnt eingesetzt, es wurden 10 µl Serum pipettiert. Dabei musste jedoch berücksichtigt werden, dass bei der automatisierten Probenentnahme zusätzlich ein Totvolumen von 100 µl benötigt wurde.

Im Test wurden Kunststoffkugeln verwendet, die mit polyklonalen Antikörpern von Kaninchen gegen Cortisol beschichtet waren. Diese Antikörper haben an das Cortisol aus dem Patientenserum, bzw. den Kontrollen oder Kalibratoren gebunden. Den Proberöhrchen wurde eine definierte Menge an mit Alkalischer Phosphatase konjugiertem Cortisol hinzugefügt. Dieses und das unkonjugierte Cortisol aus den Proben, Kontrollen oder Kalibratoren konkurrierten während der Inkubationszeit um die Antikörper-Bindungsstellen auf der Kunststoffkugel im Proberöhrchen. Durch Zentrifugieren und Waschen wurden alle Bestandteile aus den Teströhrchen gelöst, die nicht an die Kunststoffkugel gebunden waren. Anschließend wurde ein lumineszierendes Substrat in definierter Menge den Teströhrchen hinzugefügt. Je nachdem, wie viel Alkalische Phosphatase sich in den Teströhrchen befand, wurde Licht von dem Reagenz emittiert, das mit einem Photomultiplier quantifiziert wurde. Je mehr Cortisol sich in der Patientenprobe, dem Standard oder der Kontrolle befand, desto weniger Antikörper-Bindungsstellen auf der Kugel wurden mit dem Cortisol besetzt, das an die

Alkalische Phosphatase gebunden ist, und desto weniger Licht wurde von dem lumineszierenden Substrat emittiert und vom Photomultiplier gemessen. Der Immulite Messautomat ermittelte automatisch aus den Messergebnissen des Photomultipliers anhand der Kalibrierung die Cortisolkonzentrationen in den Proben und Kontrollen.

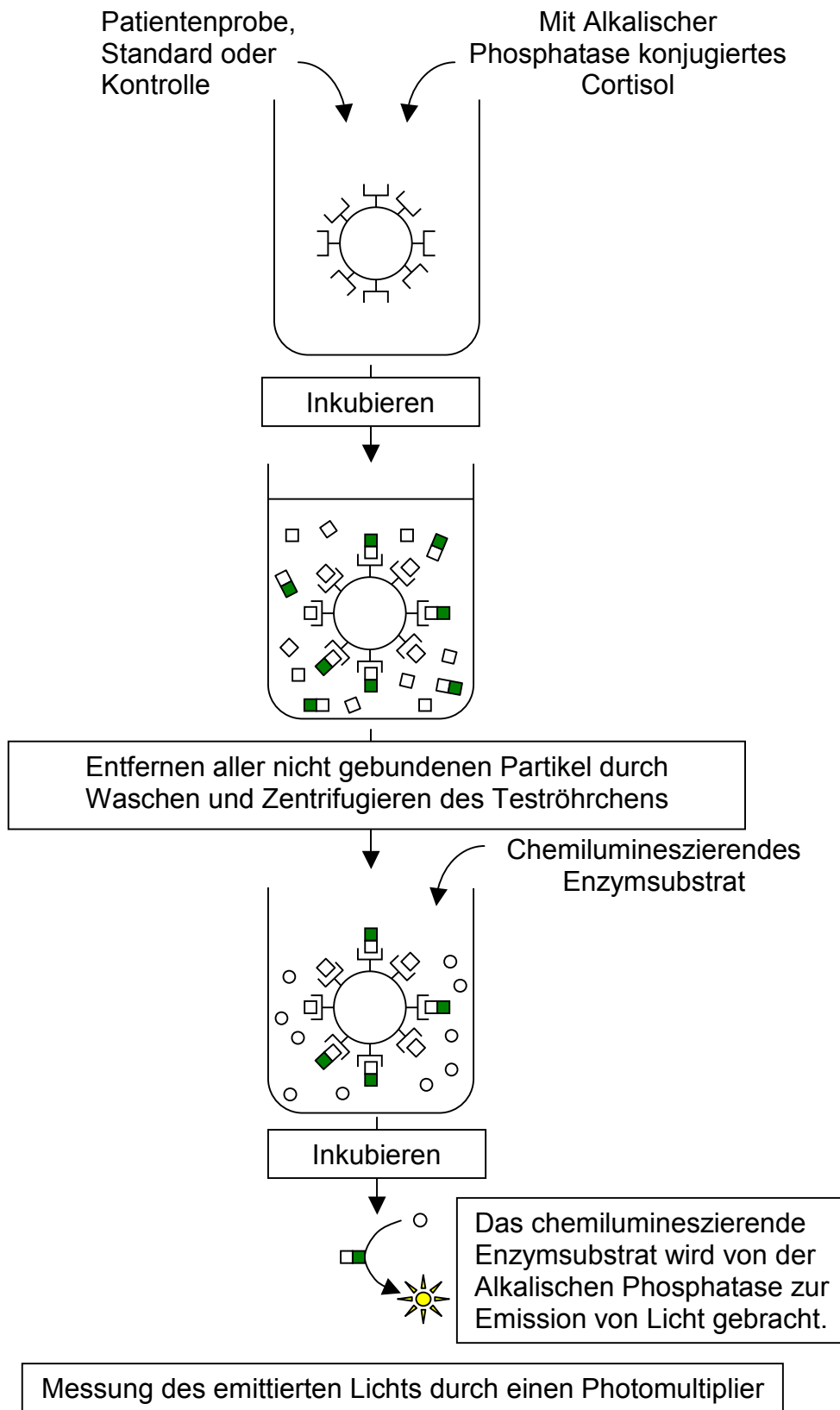
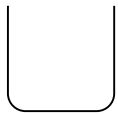


Abb. 3: Schematische Darstellung des Messprinzips des Cortisol-Assays Immulite.

Legende:



Teströhrchen



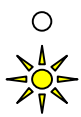
mit Antikörpern gegen Cortisol beschichtete Kunststoffkugel



Cortisol aus den Patientenproben, Kontrollen oder Standards



mit alkalischer Phosphatase konjugiertes Cortisol



chemilumineszierendes Enzymsubstrat der Alkalischen Phosphatase, das durch diese zur Emission von Licht gebracht werden kann

**Fortsetzung Abb. 3:** Legende zur schematischen Darstellung des Messprinzips des Cortisol-Assays Immulite.

### **2.3 Statistische Methoden**

Die statistische Aufarbeitung der Daten erfolgte mit Hilfe der Statistik-Software JMP des Herstellers SAS.

Zur Angabe von Referenzwerten gibt es verschiedene Möglichkeiten. Bei Daten mit einer Gauß'schen Normalverteilung bietet es sich an, den Mittelwert und die Standardabweichung anzugeben. Da in dieser Studie die Daten meist nicht normalverteilt waren, war diese Methode nicht möglich. Stattdessen wurden die Referenzwerte mit Medianwerten und Perzentilen angegeben. Unter dem Medianwert versteht man den Wert, bei dem die Hälfte der übrigen Werte unterhalb und die andere Hälfte oberhalb liegt. Die 5. und die 95. Perzentile wurden hier als Rahmen für die Referenzwerte verwendet. Das bedeutet, dass 5 % der Werte unterhalb der 5. Perzentile liegen und 5 % oberhalb der 95. Perzentile.

### **2.4 Kohorten**

Die Konzentration der Sexualhormone im Serum steigt deutlich in der Pubertät. Daher wurden die Referenzbereiche in Abhängigkeit vom Pubertätsstadium berechnet. Für die Einteilung in das jeweilige Pubertätsstadium wurde für die Jungen das Hodenvolumen und für Mädchen die Brustentwicklung nach Marshall WA und Tanner JM (1969) verwendet.

Die Konzentration des Hormons Cortisol unterliegt einem circadianen Rhythmus, sodass die Kohorte je nach Abnahmeuhrzeit in fünf Untergruppen eingeteilt wurde.

Aufgrund der bereits in Abschnitt 1.1 (S. 1 f.) beschriebenen Problematik bei der Gewinnung von einer ausreichend großen Anzahl von Messwerten von gesunden Kindern wurden hier die Messwerte von im Krankenhaus vorgestellten Kindern für die Referenzwertermittlung verwendet. Hierbei stößt man aber auf das nächste Problem: Kranke Kinder sind nun einmal krank und können nicht uneingeschränkt als Maßstab für gesunde Kinder eingesetzt werden. Um trotzdem zuverlässige Referenzwerte zu erhalten, wurden diejenigen Patienten aus den Kohorten ausgeschlossen, bei denen damit gerechnet werden musste, dass ihre Erkrankung oder Medikamenteneinnahme

einen Einfluss auf die Hormonkonzentrationen haben könnte. Die in der Kohorte verbliebenen Patienten sind somit zwar nicht eine gesunde Gruppe, aber es ist davon auszugehen, dass die bei ihnen gemessenen Hormonspiegel nicht durch ihre Erkrankungen verändert sind und sie sich daher als Referenzgruppe eignen.

Im Folgenden wird beschrieben, wie die drei Kohorten zustande gekommen sind.

#### **2.4.1 Ein- und Ausschlusskriterien der Testosteron-Kohorte**

Es wurden die Daten der männlichen Patienten verwendet, bei denen zwischen dem 01.01.2011 und dem 20.03.2012 der Testosteronspiegel im Hormonlabor der Universitätskinderklinik Tübingen bestimmt wurde. Wenn von einem Patienten in dem genannten Zeitraum mehrmals der Testosteronspiegel gemessen wurde, flossen seine Daten auch mehrfach in die Statistik mit ein. Es wurden nur die Patienten für die Statistik verwendet, über die vollständige Daten vorlagen. Dazu zählten außer dem Testosteronspiegel die Diagnose und eventuell weitere Nebendiagnosen, das Hodenvolumen, das Alter, die medikamentöse Therapie und der LH-Spiegel zum gleichen Zeitpunkt.

Waren bei einem Patienten die Hoden unterschiedlich groß, wurde der Mittelwert gebildet. Betrug allerdings der Volumenunterschied zwischen den Hoden mehr als 2 ml, wurden die Patienten aus der Kohorte ausgeschlossen, zum einen, weil sie sich nicht eindeutig einem Pubertätsstadium zuordnen ließen, zum anderen, weil für die Referenzwertermittlung nur Patienten verwendet werden sollten, bei denen die Pubertät normal abläuft, also nicht mit übermäßig verschiedenem Hodenwachstum.

Patienten mit einer Störung der Pubertät wurden aus der Statistik ausgeschlossen. Dazu zählten Diagnosen wie Pubertas tarda, Pubertas praecox, prämatüre Pubarche oder Hypogonadismus. Gleiches galt für Patienten mit einem intersexuellen Genitale oder einem Mikropenis, bei denen nicht ein normaler Ablauf der Pubertät erwartet werden konnte. Patienten, die mit Sexualhormonen, z. B. Testoviron, oder einer pubertätsbremsenden Therapie z. B. mit Enantone behandelt wurden, mussten ebenfalls ausgeschlossen werden. Gleiches galt für

eine Therapie mit Cortisol oder einen diagnostizierten Hypercortisolismus, denn der Cortisolspiegel beeinflusst den Testosteronspiegel (Juniewicz PE et al., 1987; Arnaldi G et al., 2010). Eine Gynäkomastie kann durch einen gestörten Haushalt der Sexualhormone bedingt sein, was einen Ausschluss aus der Statistik erforderte (Biro FM et al., 1990). Verschiedene Syndrome wurden auch als Ausschlusskriterium eingestuft. Dazu gehörte das Klinefelter-Syndrom, bei dem häufig erniedrigte Testosteronkonzentrationen auftreten (Wikström AM und Dunkel L, 2008), das Noonan-Syndrom, das mit einem Kryptorchismus und bzw. oder einem verzögerten Pubertätsverlauf einhergehen kann (Theintz G und Savage MO 1982; Ankarberg-Lindgren C et al., 2011), das Silver-Russell-Syndrom, bei welchem eine prämaturne Adrenarche gehäuft auftritt (Binder G et al., 2017) und das Prader-Willi-Syndrom, bei dem eine Dysregulation der LH-Sekretion und beeinträchtigte Pubertätsentwicklung vorkommen kann (Siemensma EPC et al., 2012). Patienten mit einer gestörten Hormonproduktion oder -ausschüttung, z. B. aufgrund eines Hypopituitarismus oder eines AGS, wurden von der Statistik ausgeschlossen. Adipositas geht bei Jungen mit signifikant erniedrigten Testosteronspiegeln und bei Mädchen mit signifikant höheren Estradiolspiegeln einher, weshalb sie ebenfalls ausgeschlossen wurden (Lou X et al., 2006; Zhai L et al., 2015).

Eine KEV wurde nicht als Ausschlussgrund gewertet, da man bei dieser Diagnose von einem zwar verspäteten, aber ansonsten spontanen und normalen Ablauf der Pubertät ausgeht. Die Diagnose einer KEV ist allerdings, wie G. Binder beschreibt, „eine Verdachtsdiagnose bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Pubertät spontan einsetzt.“ (Binder G, 2010: Störungen des Wachstums. In: Hiort O, Danne T, Wabitsch M (Hg.): Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie, S. 265). Da die Referenzwerte nicht in Abhängigkeit des Alters, sondern in Abhängigkeit der Pubertätsstadien eingeteilt wurden, war es nicht entscheidend, in welchem Alter genau die Kinder bzw. Jugendlichen in die Pubertät eintraten. Es musste aber gewährleistet sein, dass die Pubertät spontan und normal ablief. War dies nicht der Fall, war nicht mehr eine KEV, sondern ein Hypogonadismus die zutreffende Diagnose. Patienten mit dieser Diagnose waren wiederum für die Referenzwertermittlung ungeeignet. Daher



wurden in die Kohorte nur die Kinder integriert, bei denen nicht mehr die Differentialdiagnose eines Hypogonadismus im Raum stand, also bei denen bereits bekannt war, dass sie spontan in die Pubertät gekommen sind. War das der Fall, konnten auch ihre Vorwerte in die Statistik mit einfließen, obwohl zum Zeitpunkt der damaligen Abnahmen noch die Differentialdiagnose des Hypogonadismus im Raum stand.

#### **2.4.2 Ein- und Ausschlusskriterien der Estradiol-Kohorte**

Es wurden die Daten der weiblichen Patienten verwendet, bei denen zwischen dem 01.01.2011 und dem 19.09.2012 der Estradiolspiegel im Hormonlabor der Universitätskinderklinik Tübingen bestimmt wurde. Wenn von einer Patientin in dem genannten Zeitraum mehrmals der Estradiolspiegel gemessen worden ist, sind ihre Daten auch mehrfach in die Statistik mit eingeflossen. Es wurden nur die Patientinnen für die Statistik verwendet, über die vollständige Daten vorlagen. Dazu zählten außer dem Estradiolspiegel die Diagnose und eventuell weitere Nebendiagnosen, das Alter, die medikamentöse Therapie und das Bruststadium nach Marshall WA und Tanner JM (1969) zum Abnahmezeitpunkt. Mädchen mit den Diagnosen Hypopituitarismus, Adipositas, AGS, Hypercortisolismus, prämatüre Pubarche, Pubertas praecox, Pubertas tarda, Hypogonadismus, intersexuelles Genitale, Noonan-Syndrom, Silver-Russell-Syndrom oder Prader-Willi-Syndrom wurden aus den bereits oben (Kapitel 2.4.1, S. 24 f.) genannten Gründe von der Kohorte ausgeschlossen.

Ein McCune-Albright-Syndrom kann mit einer Pseudopubertas praecox einhergehen (Collins MT et al., 2012), bei einer prämaturen Thelarche haben die Mädchen einen signifikant höheren Estradiolspiegel als gleich alte Mädchen einer Kontrollgruppe (Klein KO et al., 1999), bei einem Ullrich-Turner-Syndrom haben die Mädchen schon präpubertär signifikant niedrigere Estradiolspiegel als gesunde präpubertäre Mädchen und werden im Verlauf meist mit Estrogenen behandelt (Wilson CA et al., 2003) und einem Hirsutismus kann ein veränderter Haushalt der Sexualhormone zugrunde liegen (Kristesashvili J und Chanukvadze D, 2011), sodass alle Mädchen mit diesen genannten Diagnosen von der Kohorte ausgeschlossen wurden. Aufgrund des Einflusses auf den

Hormonhaushalt und die häufige Verbindung mit einer Amenorrhoe wurden Mädchen mit Essstörungen, wie z. B. Anorexia nervosa, ebenfalls aus der Kohorte ausgeschlossen (Arimura C et al., 2010).

Mit Patientinnen mit einer KEV bzw. der Differentialdiagnose Hypogonadismus wurde ebenso verfahren, wie es bereits in Kapitel 2.4.1 (S. 25 f.) beschrieben wurde.

Die Mädchen durften weder mit einer pubertätsbremsenden Therapie, z. B. mit Enantone oder ähnlichem, noch mit Sexualhormonen, oralen Kontrazeptiva oder Cortisol behandelt worden sein.

Im Normalfall wurde die Einnahme von oralen Kontrazeptiva anamnestisch abgeklärt und in den Patientenunterlagen dokumentiert. Bei einigen Mädchen im Pubertätsstadium B5 sind aber sehr geringe Estradiolwerte aufgefallen, obwohl bei ihnen keine Pilleneinnahme dokumentiert war. Wiesen diese Mädchen in vorherigen Blutabnahmen deutlich höhere Estradiolwerte auf, verstärkte das den Verdacht, dass sie orale Kontrazeptiva einnahmen. Die Mädchen, bei denen das zutraf, wurden aus der Kohorte ausgeschlossen. Da es sehr schwierig ist, eine objektive Grenze festzulegen, ab welchen aktuellen Estradiolwerten und den dazugehörigen Vorwerten man von einer Therapie mit oralen Kontrazeptiva ausgehen kann, werden im Anhang (Kapitel 6.1, S. 79 f.) die Fälle einzeln aufgeführt, bei denen wir uns für einen Ausschluss aus der Kohorte entschieden haben.

### **2.4.3 Ein- und Ausschlusskriterien der Cortisol-Kohorte**

Es wurden die Daten der Patientinnen und Patienten verwendet, bei denen zwischen dem 01.01.2011 und dem 30.04.2012 der Cortisolspiegel im Hormonlabor der Universitätskinderklinik Tübingen bestimmt wurde. Wenn bei einer Patientin oder einem Patienten in dem genannten Zeitraum mehrmals der Cortisolspiegel gemessen worden ist, sind ihre oder seine Daten auch mehrfach in die Statistik mit eingeflossen. Es wurden nur die Patientinnen und Patienten für die Statistik verwendet, über die vollständige Daten vorlagen. Dazu gehörten außer dem Cortisolspiegel die Diagnose und eventuell weitere Nebendiagno-

sen, das Alter, die medikamentöse Therapie zum Abnahmezeitpunkt und die Abnahmeuhrzeit.

Kinder mit einer eingeschränkten Hypophysenfunktion konnten nicht in die Referenzwertbestimmung mit einbezogen werden. Dazu gehören Kinder, die an einem Hypopituitarismus litten, eine hypophysäre Fehlbildung hatten, oder Kinder, die aufgrund einer vorangegangenen Chemotherapie, Bestrahlung oder Operationen im Hypophysenbereich möglicherweise eine nicht normale Hypophysenfunktion aufwiesen. Auch Kinder mit einer vorangegangenen Knochenmarkstransplantation oder Störungen des Immunsystems wurden nicht in die Kohorte eingeschlossen. Kinder mit einem bekannten Hypo- oder Hypercortisolismus wurden natürlich ebenfalls aus der Kohorte ausgeschlossen. Gleiches galt auch für Patientinnen oder Patienten, die mit Cortisol behandelt wurden, z. B. als Therapie einer rheumatoiden Arthritis. Adipöse Kinder wurden aus der Kohorte ausgeschlossen, weil diese veränderte Morgen-Cortisolspiegel aufweisen können (Hill EE et al., 2011). Weitere Ausschlussgründe waren das AGS oder andere Funktionsstörungen der Nebennierenrinde. Da ein McCune-Albright-Syndrom mit einem Cushing-Syndrom einhergehen kann, wurden Kinder mit dieser Diagnose ebenfalls aus der Kohorte ausgeschlossen (Collins MT et al., 2012).

Da die Konzentration von Cortisol bei Stress deutlich höher ist, wurden die Kinder, bei denen eine starke psychische Belastungssituation oder Depression anamnestisch bekannt war, nicht in die Kohorte mit einbezogen.

Cortisol steigert die Glukoneogenese in der Leber und hat somit Einfluss auf die Blutglukosekonzentration. Ein gestörter Glukose-Stoffwechsel, ob nun in Form eines Diabetes mellitus oder eines Hyperinsulinismus, wurde aufgrund dieses Zusammenhangs als Ausschlusskriterium eingestuft.

Kinder mit einem Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Syndrom können eine Störung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse mit erniedrigten Cortisolwerten und einer gestörten circadianen Rhythmik aufweisen und wurden daher nicht in die Kohorte eingeschlossen (Budziszewska B et al., 2010).

Kinder, die komplexe Krankheiten oder Syndrome hatten oder die mehrere Medikamente einnahmen und deren Einfluss auf den Hormonhaushalt unklar war, wurden sicherheitshalber ebenfalls von der Kohorte ausgeschlossen.

## 2.5 Einteilung der Kohorten in Untergruppen

### 2.5.1 Hodenvolumen und LH-Spiegel

Für die Referenzwertermittlung der Testosteronkonzentration wurden die Jungen der Kohorte je nach ihrem Pubertätsstadium in Untergruppen eingeteilt. Die Einteilungskriterien sind in Tab. 1 zusammengefasst. Als Maß für das Pubertätsstadium wurde das Hodenvolumen verwendet, das bei jeder Vorstellung der Jungen beim Endokrinologen mit Hilfe eines Prader Orchidometers (Prader A, 1966) gemessen und vermerkt wurde. Bei dem Prader Orchidometer handelt es sich um zwölf auf einer Schnur aufgefädelte ellipsoide Modelle mit einem Volumen von 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 20 und 25 ml. Diese werden im Vergleich zu den Hoden des zu untersuchenden Jungen palpiert und so deren Volumina abgeschätzt. Diese Messmethode ist objektiv (Karaman MI et al., 2005) und eignet sich daher gut als Einteilungskriterium für die Untergruppen. Bei einem Hodenvolumen unter 4 ml geht man noch von einem präpubertären Stadium und bei einem Hodenvolumen größer oder gleich 4 ml von einem Pubertätsbeginn aus.

Um die Abgrenzung zwischen einem präpubertären und einem pubertären Stadium noch sicherer zu definieren, wurde zusätzlich zum Hodenvolumen der LH-Spiegel der Patienten als Kriterium für die Einteilung mit einbezogen. Die

**Tab. 1:** Einteilungskriterien in die fünf Pubertätsstadien anhand des Hodenvolumens und des LH-Spiegels.

| Pubertätsstadium | Hodenvolumen          | LH-Spiegel |
|------------------|-----------------------|------------|
| 1                | unter 4 ml            | < 0,5 U/L  |
| 2                | 4 ml bis unter 7 ml   | ≥ 0,5 U/L  |
| 3                | 7 ml bis unter 10 ml  | ≥ 0,5 U/L  |
| 4                | 10 ml bis unter 15 ml | ≥ 0,5 U/L  |
| 5                | ab 15 ml              | ≥ 0,5 U/L  |

Grenze zwischen einem präpubertären und einem pubertären Stadium wurde hierfür bei einem LH-Spiegel von 0,5 U/l definiert. Für die Gruppe der Jungen im präpubertären Stadium, also mit einem Hodenvolumen unter 4 ml, galt also zusätzlich, dass sie einen LH-Spiegel unter 0,5 U/l haben mussten. Die Jungen in allen anderen Stadien mussten wiederum einen LH-Spiegel von 0,5 U/l und mehr aufweisen.

### 2.5.2 Brustentwicklungsstadium und Alter

Für die Referenzwertermittlung der Estradiolkonzentration in Abhängigkeit des Pubertätsstadiums wurden die Mädchen anhand der Stadien der Brustentwicklung nach Marshall WA und Tanner JM (1969) zum Abnahmezeitpunkt in Untergruppen eingeteilt. In Tab. 2 werden die Einteilungskriterien ausführlich aufgelistet und die einzelnen Brustentwicklungsstadien definiert. Außerdem wurde das Alter in die Einteilung mit einbezogen. So durften im Stadium 2, das

**Tab. 2:** Einteilungskriterien in die fünf Pubertätsstadien nach dem Bruststadium (Albers N, 2010: Klinische Untersuchung. In: Hiort O, Danne T, Wabitsch M (Hg.): Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie, Abb. 4.7, S. 60) und nach dem Alter.

| Pubertätsstadium | Bruststadium und Definition   | Alter     |
|------------------|---|-----------|
| 1                | B1: kein palpabler Drüsenkörper, nur die Brustwarze ist prominent   |           |
| 2                | B2: Brustknospe: leichte Vorwölbung der Drüse im Bereich des Warzenhofs. Vergrößerung des Areolendurchmessers gegenüber B1. | ≥ 8 Jahre |
| 3                | B3: Brustdrüse und Areola weiter vergrößert. Drüsen jetzt größer als der Warzenhof. Dieser ist jedoch ohne eigene Kontur.   | ≥ 9 Jahre |
| 4                | B4: Knospenbrust: Areolen und Warzen heben sich gesondert von der übrigen Drüse ab.   | ≥ 9 Jahre |
| 5                | B5: Vollentwickelte Brust: die Warzenvorhofvorwölbung hebt sich von der allgemeinen Brustkontur nicht mehr ab.              | ≥ 9 Jahre |

dem Beginn der Pubertät entspricht, nicht Mädchen sein, die unter acht Jahre alt waren, denn das ist bereits als eine Pubertas praecox definiert (Hauffa BP, 2010). Im Stadium 3 mussten die Mädchen mindestens ein Alter von neun Jahren erreicht haben.

### 2.5.3 Abnahmeuhrzeit

Die Cortisolkonzentration im Serum unterliegt einer circadianen Rhythmik. Zur Ermittlung von Referenzwerten für die Cortisolkonzentration wurden die Kinder der Kohorte nach der Abnahmeuhrzeit in Untergruppen eingeteilt, wie in Tab. 3 zu sehen ist. Bei der Festlegung von sinnvollen Zeitfenstern haben wir uns an den Sprechzeiten der endokrinologischen Ambulanz der Tübinger Universitätsklinik orientiert. In den Abnahmezeiträumen 1 und 5 sind aufgrund geringer Datenmengen keine aussagekräftigen Referenzbereiche zu ermitteln. Diese sind aber wegen deren Lage außerhalb der Sprechzeiten der kinderendokrinologischen Ambulanz für den dortigen Klinikalltag ohnehin nur von zweitrangiger Bedeutung.

**Tab. 3:** Definition der Abnahmezeiträume, nach denen die Messwerte der Cortisolspiegel in Untergruppen eingeteilt wurden.

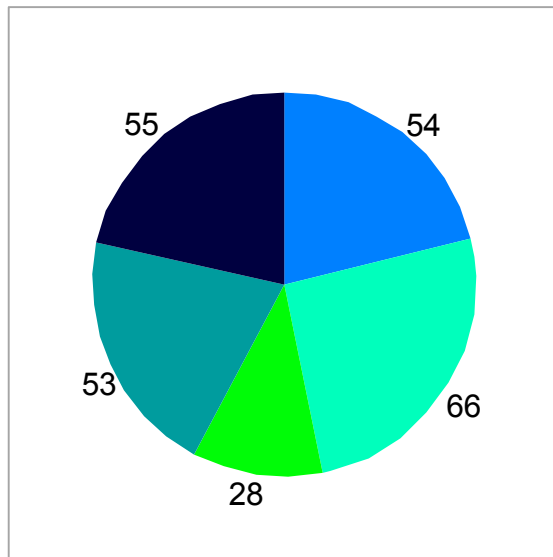
| <b>Abnahmezeitraum</b> | <b>Abnahmezeitpunkt</b> |
|------------------------|-------------------------|
| 1                      | vor 8.30 Uhr            |
| 2                      | 8.30 Uhr - 10.29 Uhr    |
| 3                      | 10.30 Uhr - 12.29 Uhr   |
| 4                      | 12.30 Uhr - 15.59 Uhr   |
| 5                      | ab 16.00 Uhr            |

## 2.6 Deskriptive Statistik

### 2.6.1 Testosteron-Kohorte

#### 2.6.1.1 Gruppengröße

Insgesamt bestand die Kohorte für die Referenzwertbestimmung von Testosteron aus 177 Jungen, von denen 256 Messwerte stammen. Die Verteilung der Messwerte auf die fünf Pubertätsstadien ist in Abb. 4 dargestellt.



Pubertätsstadium      ■ 1    ■ 2    ■ 3    ■ 4    ■ 5

**Abb. 4:** Absolute Anzahl der Messwerte in den einzelnen Pubertätsstadien der Testosteronkohorte

#### 2.6.1.2 Altersverteilung

Das Alter der Jungen ist in den fünf Pubertätsstadien normalverteilt. In Tab. 4 sind das geringste und das höchste Alter sowie das Durchschnittsalter und die Standardabweichung des Alters in den einzelnen Pubertätsstadien aufgelistet.

**Tab. 4:** Altersverteilung in den fünf Pubertätsstadien der Testosteron-Kohorte.

| Pubertätsstadium | N  | Alter in Jahren |      |      |     |
|------------------|----|-----------------|------|------|-----|
|                  |    | Min.            | Max. | MW   | SD  |
| 1                | 54 | 7               | 13   | 11,1 | 1,3 |
| 2                | 66 | 10              | 15   | 13,2 | 1,2 |
| 3                | 28 | 11              | 16   | 13,8 | 1,2 |
| 4                | 53 | 12              | 19   | 14,4 | 1,5 |
| 5                | 55 | 13              | 19   | 15,7 | 1,3 |

Abb. 5 stellt die Altersverteilung in den verschiedenen Pubertätsstadien grafisch dar.

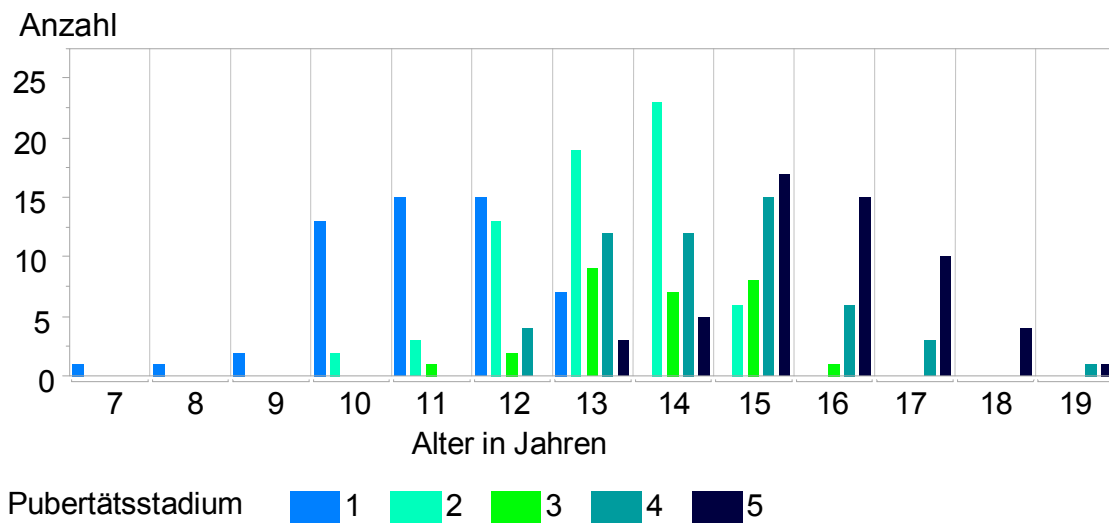


Abb. 5: Altersverteilung in den fünf Pubertätsstadien der Testosteron-Kohorte.

### 2.6.1.3 Diagnosen

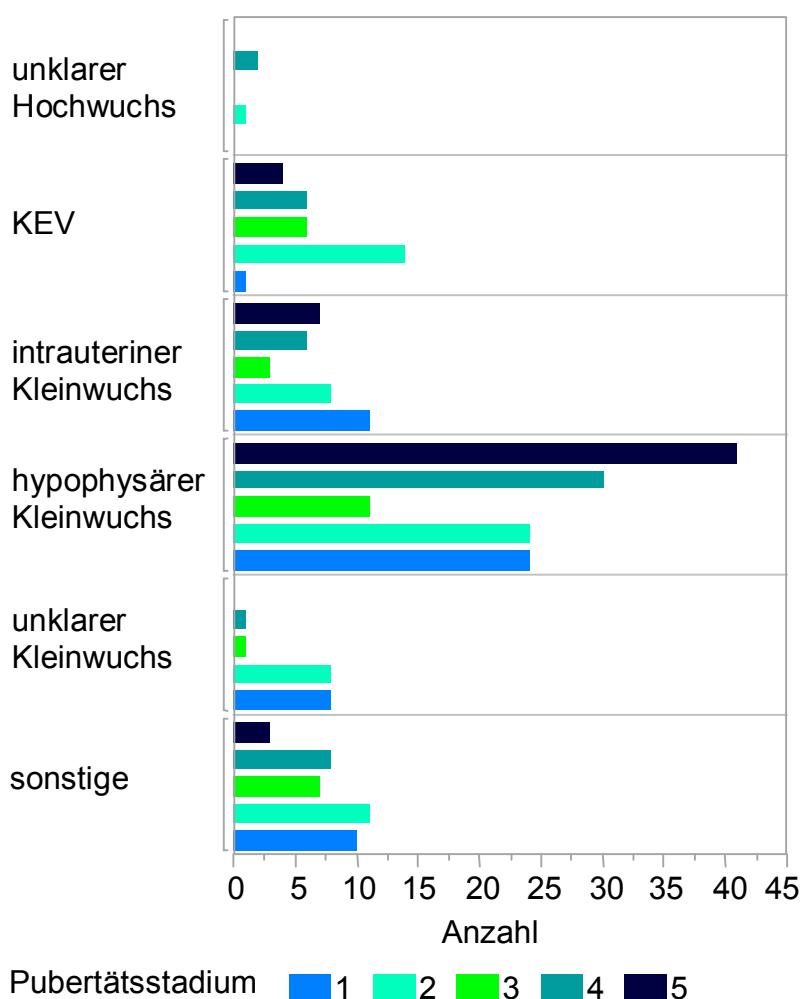
Die Messwerte stammen alle von Patienten, bei denen in der endokrino-logischen Ambulanz Blut abgenommen wurde. Bei ihnen lagen somit endokri-nologische Erkrankungen oder Verdachtsdiagnosen vor. In Tab. 5 ist auf-

Tab. 5: Verteilung der Diagnosen der Testosteronkohorte in absoluten und relativen Zahlen in den einzelnen Pubertätsstadien.

| Diagnose                 | Pubertätsstadium |    |            |    |            |    |            |    |            |    |
|--------------------------|------------------|----|------------|----|------------|----|------------|----|------------|----|
|                          | 1                |    | 2          |    | 3          |    | 4          |    | 5          |    |
|                          | Anteil [%]       | N  | Anteil [%] | N  | Anteil [%] | N  | Anteil [%] | N  | Anteil [%] | N  |
| unklarer Kleinwuchs      | 14,8             | 8  | 12,1       | 8  | 3,6        | 1  | 1,9        | 1  | 0,0        | 0  |
| hypophysärer Kleinwuchs  | 44,4             | 24 | 36,4       | 24 | 39,3       | 11 | 56,6       | 30 | 74,6       | 41 |
| intrauteriner Kleinwuchs | 20,4             | 11 | 12,1       | 8  | 10,7       | 3  | 11,3       | 6  | 12,7       | 7  |
| KEV                      | 1,9              | 1  | 21,2       | 14 | 21,4       | 6  | 11,3       | 6  | 7,3        | 4  |
| unklarer Hochwuchs       | 0,0              | 0  | 1,5        | 1  | 0,0        | 0  | 3,8        | 2  | 0,0        | 0  |
| sonstige                 | 18,5             | 10 | 16,7       | 11 | 25,0       | 7  | 15,1       | 8  | 5,5        | 3  |



geführt, um welche Krankheiten es sich hierbei handelt und wieviele Messwerte von Kindern mit diesen Erkrankungen in den einzelnen Pubertätsstadien stammen, bzw. wie die prozentuale Verteilung aussieht. Mit zwischen 36,4 % und 74,6 % ist der Anteil an Messwerten von Kindern mit einem hypophysären Kleinwuchs in allen Pubertätsstadien am größten. Einige Messwerte stammten von Patienten, die eine Erkrankung hatten, die sich nicht einer der Diagnosen aus Tab. 5 zuordnen ließ, oder bei denen weitere Nebendiagnosen vorlagen. Diese Patienten sind in der Tabelle unter „sonstige“ aufgeführt. Im Anhang (Kapitel 6.2.1, S. 80 ff.) befindet sich eine ausführliche Auflistung, um was für Erkrankungen es sich hierbei handelte. Eine grafische Darstellung der Verteilung der Diagnosen ist in Abb. 6 zu sehen.

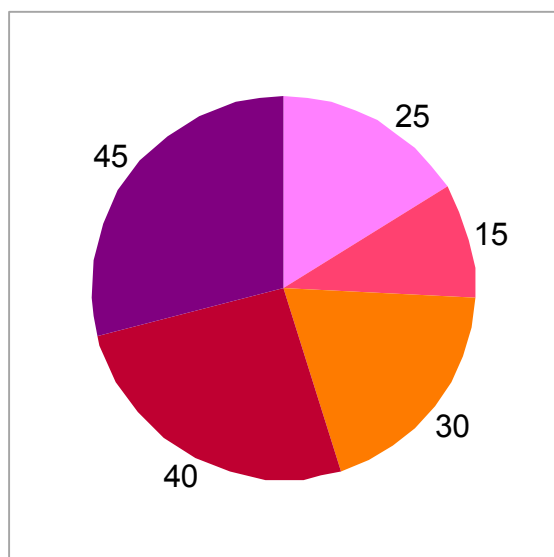


**Abb. 6:** Verteilung der verschiedenen Diagnosen in den fünf Pubertätsstadien der Testosteron-Kohorte.

## 2.6.2 Estradiol-Kohorte

### 2.6.2.1 Gruppengröße

Für die Referenzwertbestimmung von Estradiol lagen 155 Messwerte vor, die von 85 Mädchen stammen. Die Verteilung der Messwerte auf die fünf Pubertätsstadien ist in Abb. 7 zu sehen.



Pubertätsstadium    ■ 1   ■ 2   ■ 3   ■ 4   ■ 5

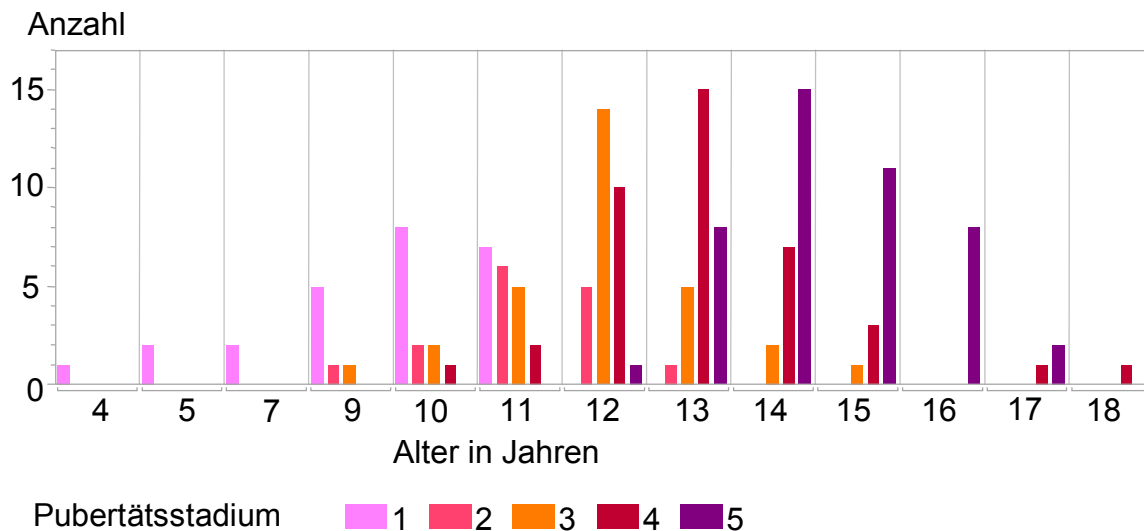
**Abb. 7:** Absolute Anzahl der Messwerte in den einzelnen Pubertätsstadien.

### 2.6.2.2 Altersverteilung

Die Altersverteilung in den verschiedenen Pubertätsstadien wird in Tab. 6 dargestellt. In allen Pubertätsstadien außer dem Stadium 2 ist das Alter der Mädchen, von denen die Messwerte stammen, normalverteilt. Im Stadium 2 liegt der Medianwert des Alters bei elf Jahren. In Abb. 8 ist die Altersverteilung grafisch dargestellt.

**Tab. 6:** Altersverteilung in den fünf Pubertätsstadien der Estradiol-Kohorte.

| Pubertätsstadium | N  | Alter in Jahren |      |      |     |
|------------------|----|-----------------|------|------|-----|
|                  |    | Min.            | Max. | MW   | SD  |
| 1                | 25 | 4               | 11   | 9,2  | 2,0 |
| 2                | 15 | 9               | 13   | 11,2 | 1,0 |
| 3                | 30 | 9               | 15   | 12,0 | 1,2 |
| 4                | 40 | 10              | 18   | 13,1 | 1,5 |
| 5                | 45 | 12              | 17   | 14,5 | 1,2 |



**Abb. 8:** Altersverteilung in den fünf Pubertätsstadien der Estradiol-Kohorte.

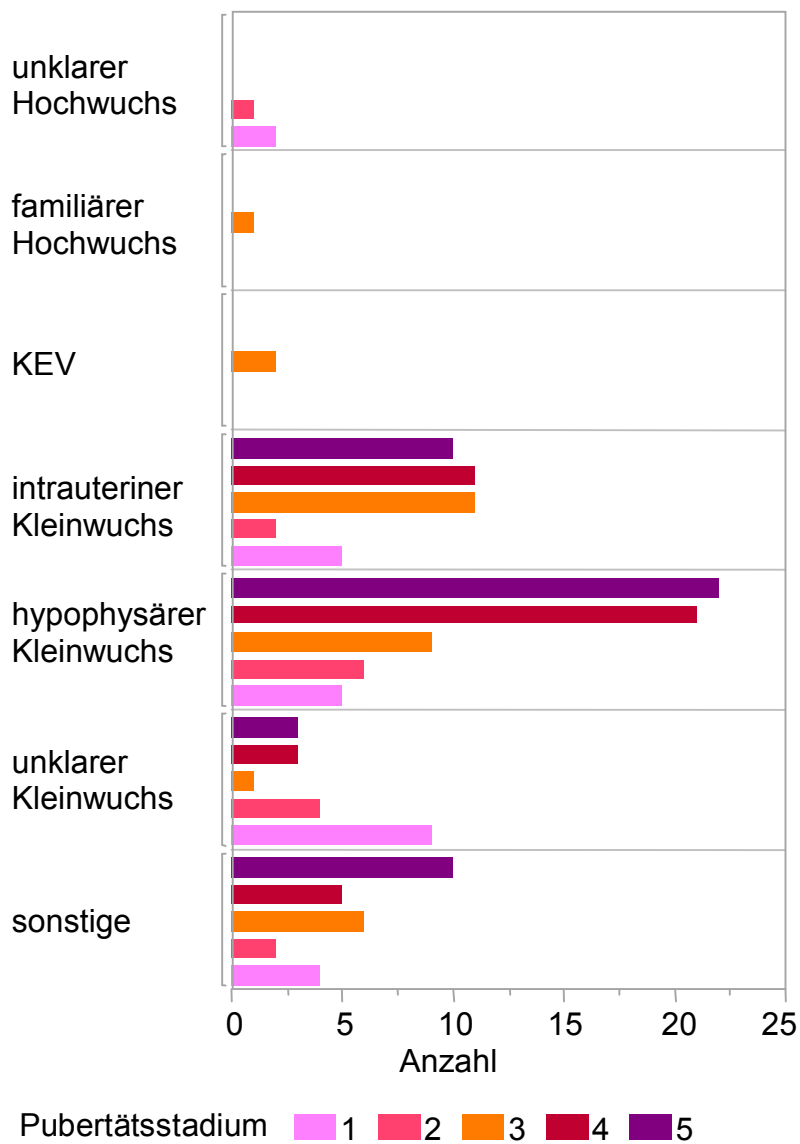
### 2.6.2.3 Diagnosen

Die Estradiolmesswerte, die zur Ermittlung der Referenzbereiche dienen, stammen von Mädchen, die sich in der kinderendokrिनologischen Ambulanz in Tübingen vorgestellt haben. Die Mädchen litten an verschiedenen endokrिनologischen Erkrankungen oder stellten sich aufgrund einer Verdachtsdiagnose in der Ambulanz vor. Tab. 7 führt die Diagnosen mit der absoluten Anzahl und der relativen Verteilung in den fünf Pubertätsstadien auf. Abb. 9 stellt die Verteilung

**Tab. 7:** Verteilung der Diagnosen in absoluten und relativen Zahlen in den einzelnen Pubertätsstadien in der Estradiol-Kohorte.

| Diagnose                 | Pubertätsstadium |   |            |   |            |    |            |    |            |    |
|--------------------------|------------------|---|------------|---|------------|----|------------|----|------------|----|
|                          | 1                |   | 2          |   | 3          |    | 4          |    | 5          |    |
|                          | Anteil [%]       | N | Anteil [%] | N | Anteil [%] | N  | Anteil [%] | N  | Anteil [%] | N  |
| unklarer Kleinwuchs      | 36,0             | 9 | 26,7       | 4 | 3,3        | 1  | 7,5        | 3  | 6,7        | 3  |
| hypophysärer Kleinwuchs  | 20,0             | 5 | 40,0       | 6 | 30,0       | 9  | 52,5       | 21 | 48,9       | 22 |
| intrauteriner Kleinwuchs | 20,0             | 5 | 13,3       | 2 | 36,7       | 11 | 27,5       | 11 | 22,2       | 10 |
| KEV                      | 0,0              | 0 | 0,0        | 0 | 6,7        | 2  | 0,0        | 0  | 0,0        | 0  |
| unklarer Hochwuchs       | 0,0              | 0 | 0,0        | 0 | 3,3        | 1  | 0,0        | 0  | 0,0        | 0  |
| familiärer Hochwuchs     | 8,0              | 2 | 6,7        | 1 | 0,0        | 0  | 0,0        | 0  | 0,0        | 0  |
| sonstige                 | 16,0             | 4 | 13,3       | 2 | 20,0       | 6  | 12,5       | 5  | 22,2       | 10 |

grafisch dar. Messwerte, die von Mädchen stammten, die andere Diagnosen hatten, als in der Tabelle und der Abbildung aufgelistet sind, oder bei denen mehrere Erkrankungen oder Verdachtsdiagnosen vorlagen, sind unter „sonstige“ zusammengefasst. Im Anhang (Kapitel 6.2.2, S. 82 f.) ist einzeln aufgeführt, um welche Diagnosen, Verdachts- oder Nebendiagnosen es sich bei den Patientinnen handelte.

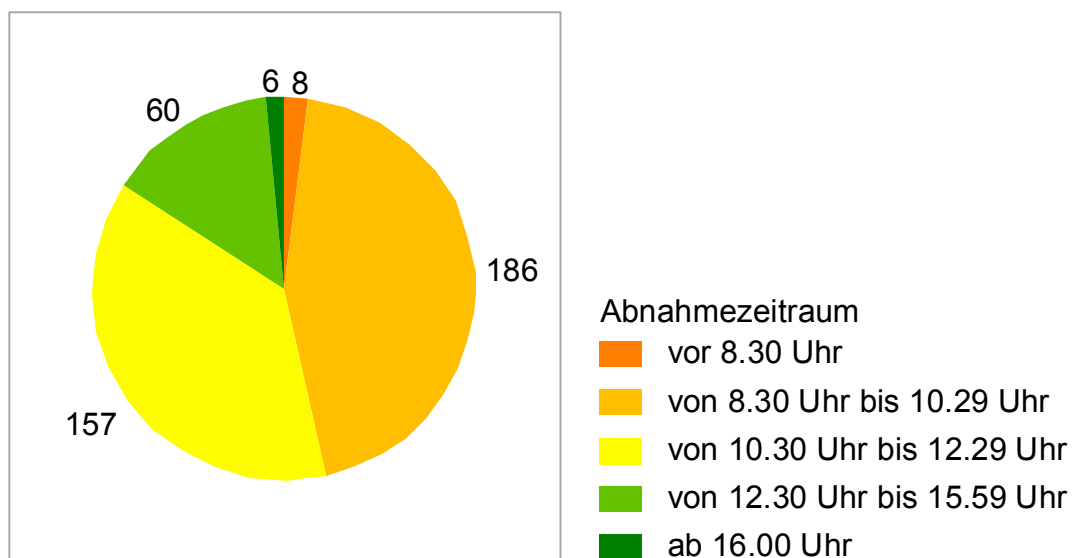


**Abb. 9:** Verteilung der Diagnosen in den einzelnen Pubertätsstadien der Estradiol-Kohorte.

### 2.6.3 Cortisol-Kohorte

#### 2.6.3.1 Gruppengröße

Insgesamt standen 417 Cortisolmesswerte von 323 Kindern, davon 200 Jungen und 123 Mädchen, zur Berechnung von Referenzbereichen zur Verfügung. Die Messwerte stammen von Kindern, die sich in der endokrinologischen Ambulanz vorstellten. In den beiden Zeiträumen vor 8.30 Uhr und ab 16.00 Uhr standen nur sehr wenige Messwerte zur Verfügung, da diese Zeiträume außerhalb der Sprechzeiten der Ambulanz lagen und daher nur sehr selten Blutentnahmen zu diesen Zeiten stattfanden. Abb. 10 zeigt die absolute Anzahl der Messwerte in den verschiedenen Zeiträumen.



**Abb. 10:** Absolute Anzahl der Messwerte in den fünf Abnahmezeiträumen der Cortisol-Kohorte.

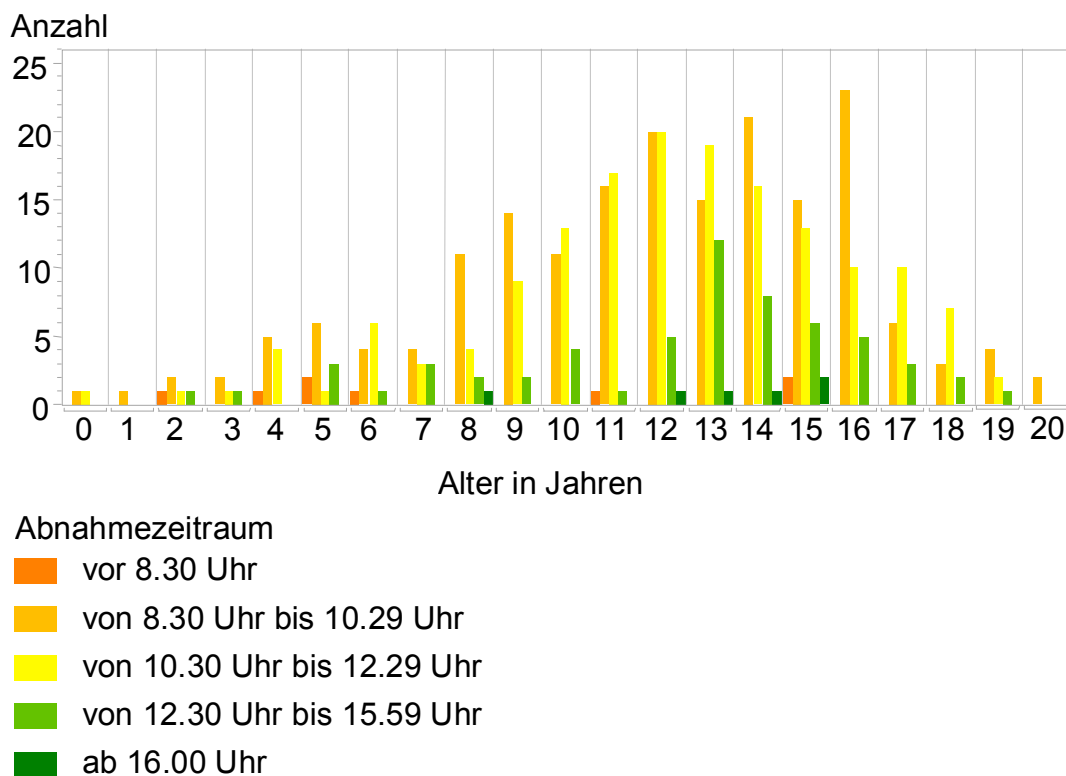
#### 2.6.3.2 Altersverteilung

Die Altersverteilung sollte sich möglichst wenig in den verschiedenen Abnahmezeiträumen unterscheiden. Tab. 8 zeigt das geringste, das höchste und das durchschnittliche Alter der Kinder, von denen die Messwerte in den einzelnen Abnahmezeiträumen stammen, sowie die Standardabweichung. Im frühesten und im spätesten Abnahmezeitraum ist das Alter der Kinder nicht normalverteilt. Im Abnahmezeitraum vor 8.30 Uhr liegt das mediane Alter der Kinder bei 5,5 Jahren und ist folglich geringer als in den anderen Abnahmezeiträumen, in

denen das durchschnittliche Alter zwischen 11,9 und 12,8 Jahren liegt. Im Zeitraum ab 16.00 Uhr liegt das mediane Alter bei 13,5 Jahren. Abb. 11 zeigt die Altersverteilung grafisch.

**Tab. 8:** Altersverteilung in den fünf Abnahmezeiträumen der Cortisol-Kohorte.

| Abnahmezeitraum   | N   | Alter in Jahren |      |      |     |
|-------------------|-----|-----------------|------|------|-----|
|                   |     | Min.            | Max. | MW   | SD  |
| vor 8.30 Uhr      | 8   | 2               | 15   | 7,9  | 5,1 |
| 8.30 - 10.29 Uhr  | 186 | 0               | 20   | 11,9 | 4,0 |
| 10.30 - 12.29 Uhr | 157 | 0               | 19   | 12,2 | 3,7 |
| 12.30 - 15.59 Uhr | 60  | 2               | 19   | 12,3 | 3,9 |
| ab 16.00 Uhr      | 6   | 8               | 15   | 12,8 | 2,6 |



**Abb. 11:** Altersverteilung in den fünf Abnahmezeiträumen der Cortisol-Kohorte.

### 2.6.3.3 Geschlechterverteilung

Tab. 9 zeigt die Verteilung von Jungen und Mädchen in den verschiedenen Abnahmezeiträumen in Prozentzahlen und absoluten Zahlen.

**Tab.9:** Verteilung der Geschlechter in absoluten und relativen Zahlen in den fünf Abnahmezeiträumen der Cortisol-Kohorte.

| Abnahmezeitraum          | männlich |     | weiblich |    |
|--------------------------|----------|-----|----------|----|
|                          | Anteil   | N   | Anteil   | N  |
| <b>vor 8.30 Uhr</b>      | 87,5 %   | 7   | 12,5 %   | 1  |
| <b>8.30 - 10.29 Uhr</b>  | 66,7 %   | 124 | 33,3 %   | 62 |
| <b>10.30 - 12.29 Uhr</b> | 62,4 %   | 98  | 37,6 %   | 59 |
| <b>12.30 - 15.59 Uhr</b> | 60,0 %   | 36  | 40,0 %   | 24 |
| <b>ab 16.00 Uhr</b>      | 50,0 %   | 3   | 50,0 %   | 3  |

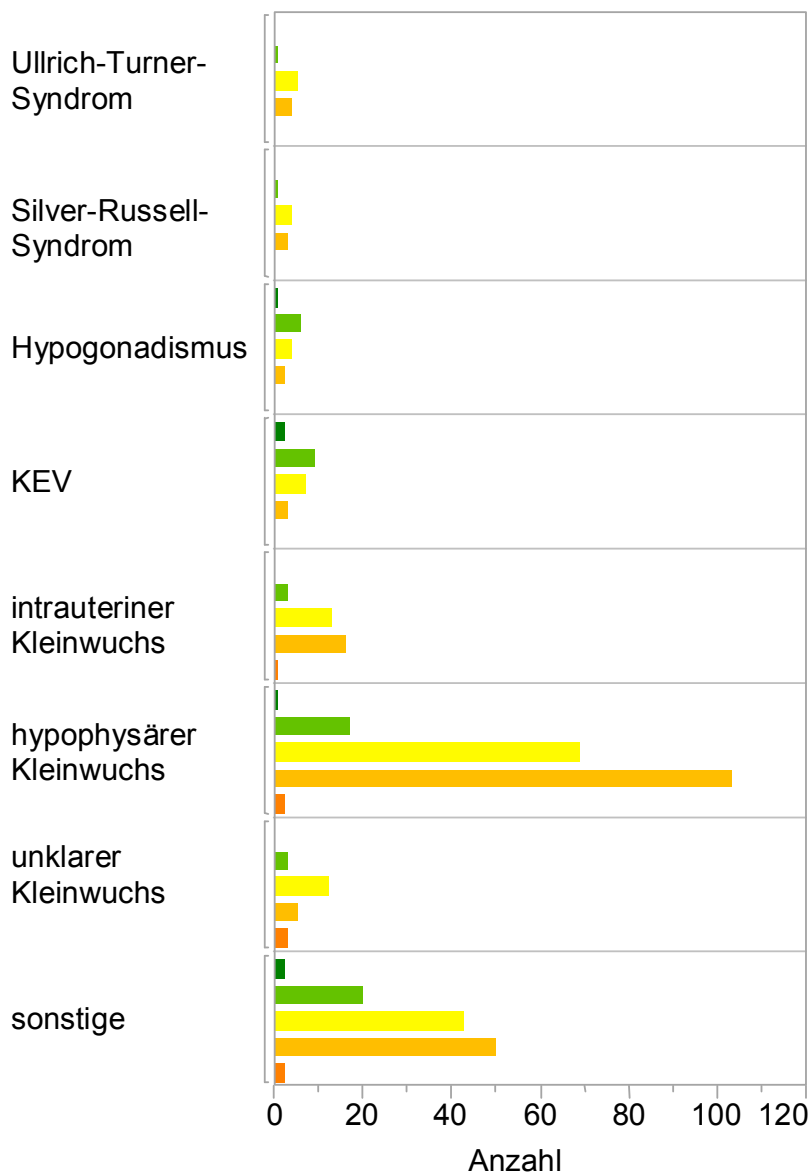
### 2.6.3.4 Diagnosen

Die Cortisolmesswerte, aus denen die Referenzbereiche ermittelt wurden, stammen von Mädchen und Jungen, die sich aufgrund einer endokrinologischen Erkrankung oder Verdachtsdiagnose in der endokrinologischen Ambulanz vorgestellt haben. In Tab. 10 wird in absoluten und relativen Zahlen aufgeführt, um welche Diagnosen es sich dabei handelt bzw. wie sich die Verteilung in den fünf Abnahmezeiträumen unterscheidet. In Abb. 12 ist die Verteilung grafisch dargestellt. Messwerte, die von Kindern stammen, deren Diagnose sich nicht den in der Tabelle bzw. der Abbildung einzeln aufgeführten Diagnosen zuordnen ließ oder bei denen Nebendiagnosen vorlagen, sind unter „sonstige“ zusammengefasst. Im Anhang (Kapitel 6.2.3, S. 83 ff.) befindet sich eine Auflistung, um welche Diagnosen, Verdachts- oder Nebendiagnosen es sich handelt. Für eine bessere Übersichtlichkeit sind in der Abb. 12 im Gegensatz zur Darstellung in der Tab. 10 auch die Diagnosen unklarer oder familiärer Hochwuchs, Pubertas tarda oder praecox, prämatüre Thelarche oder Pubarche sowie das Prader-Willi- oder das Noonan-Syndrom zusammen mit den anderen nicht einzeln aufgelisteten Diagnosen unter „sonstige“ zusammengefasst.

**Tab. 10:** Verteilung der Diagnosen in absoluten und relativen Zahlen in den fünf Abnahmezeiträumen der Cortisol-Kohorte.

| Diagnose                 | Abnahmezeitraum |   |                    |     |                     |    |                     |    |              |   |
|--------------------------|-----------------|---|--------------------|-----|---------------------|----|---------------------|----|--------------|---|
|                          | vor 8.30 Uhr    |   | 8.30 bis 10.29 Uhr |     | 10.30 bis 12.29 Uhr |    | 12.30 bis 15.59 Uhr |    | ab 16.00 Uhr |   |
|                          | Anteil [%]      | N | Anteil [%]         | N   | Anteil [%]          | N  | Anteil [%]          | N  | Anteil [%]   | N |
| unklarer Kleinwuchs      | 37,5            | 3 | 2,7                | 5   | 7,6                 | 12 | 5,0                 | 3  | 0,0          | 0 |
| hypophysärer Kleinwuchs  | 25,0            | 2 | 55,4               | 103 | 44,0                | 69 | 28,3                | 17 | 16,7         | 1 |
| intrauteriner Kleinwuchs | 12,5            | 1 | 8,6                | 16  | 8,3                 | 13 | 5,0                 | 3  | 0,0          | 0 |
| KEV                      | 0,0             | 0 | 1,6                | 3   | 4,5                 | 7  | 15,0                | 9  | 33,3         | 2 |
| familiärer Hochwuchs     | 0,0             | 0 | 0,5                | 1   | 0,0                 | 0  | 1,7                 | 1  | 0,0          | 0 |
| unklarer Hochwuchs       | 0,0             | 0 | 0,0                | 0   | 0,0                 | 0  | 1,7                 | 1  | 0,0          | 0 |
| Hypogonadismus           | 0,0             | 0 | 1,1                | 2   | 2,6                 | 4  | 10,0                | 6  | 16,7         | 1 |
| Pubertas tarda           | 0,0             | 0 | 0,0                | 0   | 0,0                 | 0  | 5,0                 | 3  | 0,0          | 0 |
| Pubertas praecox         | 0,0             | 0 | 0,0                | 0   | 1,3                 | 2  | 1,7                 | 1  | 16,7         | 1 |
| prämatüre Thelarche      | 0,0             | 0 | 0,0                | 0   | 0,6                 | 1  | 1,7                 | 1  | 0,0          | 0 |
| prämatüre Pubarche       | 0,0             | 0 | 0,5                | 1   | 1,3                 | 2  | 0,0                 | 0  | 0,0          | 0 |
| Prader-Willi-Syndrom     | 0,0             | 0 | 0,0                | 0   | 0,6                 | 1  | 0,0                 | 0  | 0,0          | 0 |
| Silver-Russell-Syndrom   | 0,0             | 0 | 1,6                | 3   | 2,6                 | 4  | 1,7                 | 1  | 0,0          | 0 |
| Ullrich-Turner-Syndrom   | 0,0             | 0 | 2,2                | 4   | 3,2                 | 5  | 1,7                 | 1  | 0,0          | 0 |
| Noonan-Syndrom           | 0,00            | 0 | 1,6                | 3   | 1,3                 | 2  | 1,7                 | 1  | 0,0          | 0 |
| sonstige                 | 25,0            | 2 | 24,2               | 45  | 22,3                | 35 | 20,0                | 12 | 16,7         | 1 |





Abnahmezeitraum

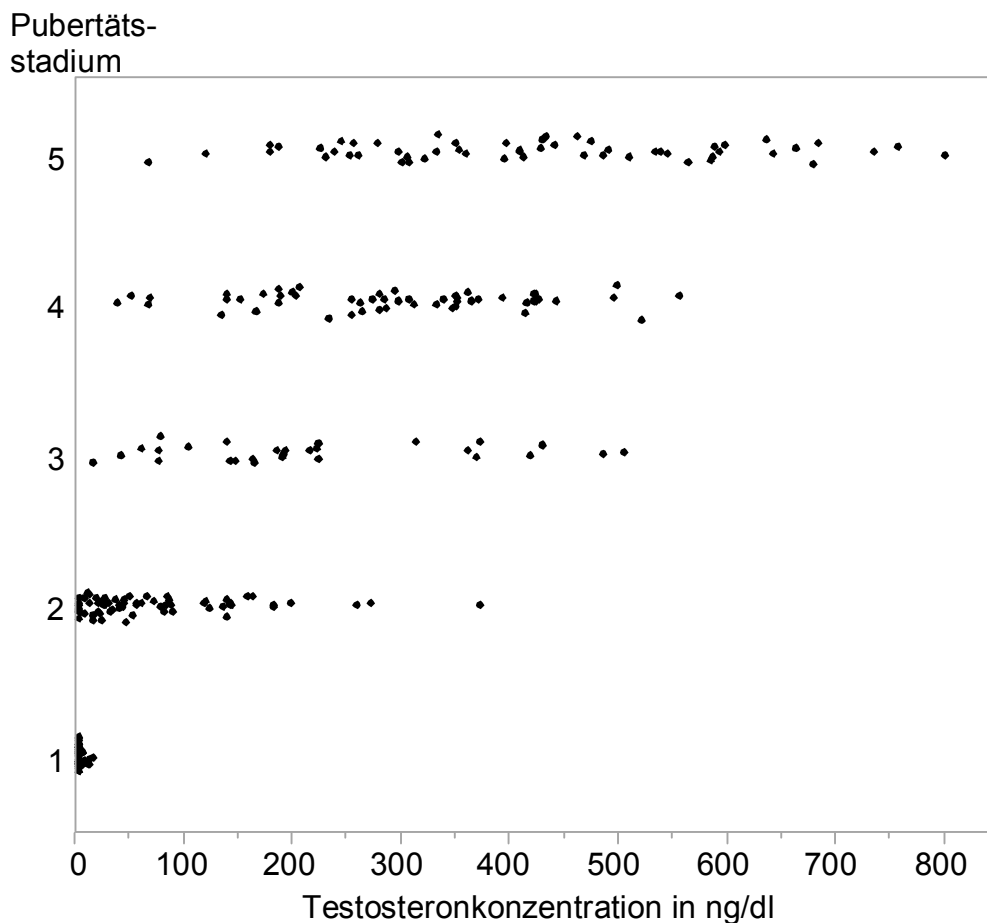
- vor 8.30 Uhr
- von 8.30 Uhr bis 10.29 Uhr
- von 10.30 Uhr bis 12.29 Uhr
- von 12.30 Uhr bis 15.59 Uhr
- ab 16.00 Uhr

**Abb. 12:** Verteilung der Diagnosen in den fünf Abnahmezeiträumen der Cortisol-Kohorte.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Referenzbereiche für die Testosteronkonzentration bei Jungen

Abb. 13 zeigt die Verteilung der Testosteronwerte in den fünf Pubertätsstadien entsprechend der Einteilung, die in Tab. 11 definiert ist. Es ist zu beachten, dass die Nachweisgrenze von Testosteron mit dem verwendeten Messverfahren bei 4 ng/dl liegt. Daher sind unterhalb dieses Wertes keine Punkte im Schaubild. Die Punkte, die im Schaubild bei 4 ng/dl eingetragen sind, enthalten auch die Werte, die unterhalb des Messbereiches liegen. Die 5. Perzentilen der Testosteronkonzentration in den Pubertätsstadien 1 und 2 liegen daher nicht bei 4 ng/dl, sondern bei < 4 ng/dl.



**Abb. 13:** Verteilung der einzelnen Messwerte der Testosteronkonzentration in den fünf Pubertätsstadien. Jeder Punkt entspricht einem Messwert.

Tab. 11 zeigt die berechneten Referenzbereiche der Testosteronkonzentration in den fünf Pubertätsstadien entsprechend dem Hodenvolumen. Einem gemessenen Testosteronwert kann man, wie Tab. 12 zeigt, ein oder mehrere Pubertätsstadien zuordnen.

**Tab. 11:** Minimale, maximale und mediane Testosteronkonzentrationen sowie die 5. und die 95. Perzentile in den fünf Pubertätsstadien.

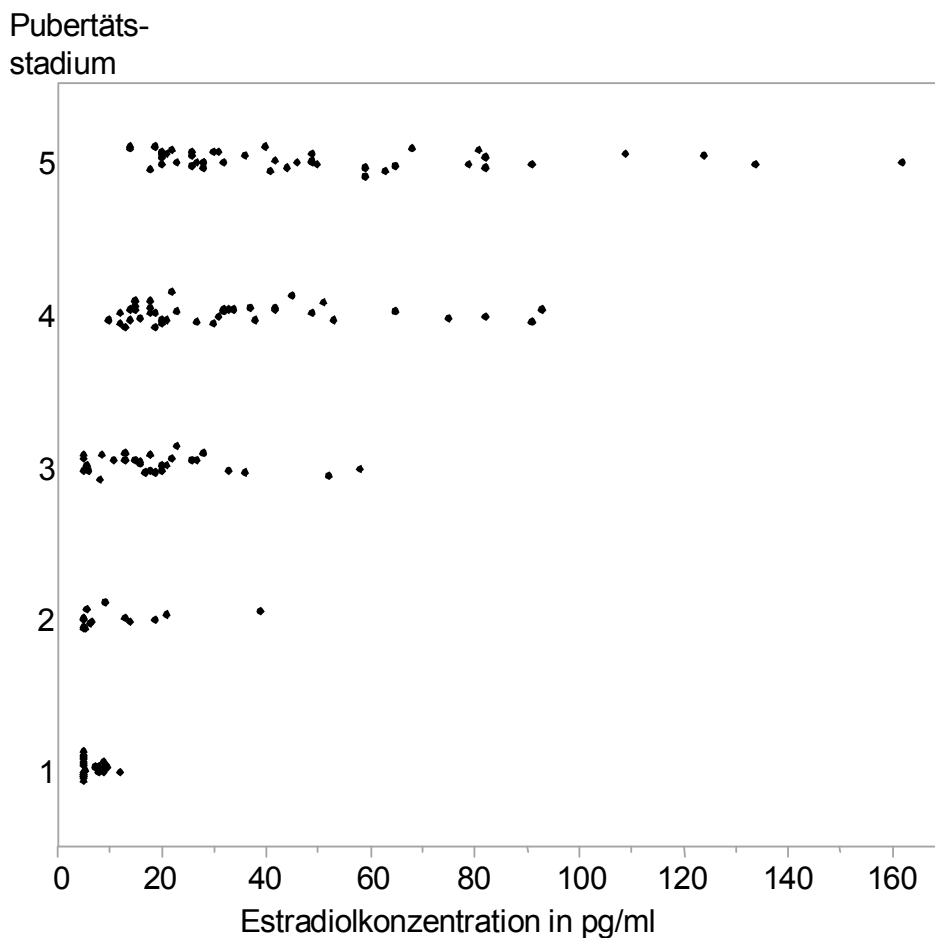
| Pubertäts-Stadium (HV) | N  | Min. [ng/dl] | Max. [ng/dl] | 5. Perzentile [ng/dl] | Median [ng/dl] | 95. Perzentile [ng/dl] |
|------------------------|----|--------------|--------------|-----------------------|----------------|------------------------|
| 1<br>( < 4 ml)         | 54 | < 4          | 18           | < 4                   | < 4            | 14,3                   |
| 2<br>(4 ml - < 7 ml)   | 66 | < 4          | 374          | < 4                   | 47             | 239,3                  |
| 3<br>(7 ml - < 10ml)   | 28 | 17           | 506          | 28,7                  | 192,5          | 497,5                  |
| 4<br>(10 ml - < 15 ml) | 53 | 40           | 558          | 63,9                  | 295            | 506,9                  |
| 5<br>(≥ 15 ml)         | 55 | 68           | 802          | 168,2                 | 414            | 741,4                  |

**Tab. 12:** Testosteronspiegel und die Pubertätsstadien, die ihnen zugeordnet werden können.

| Testosteronspiegel [ng/dl] | Entsprechendes Pubertätsstadium |
|----------------------------|---------------------------------|
| 0,0 - 14,3                 | 1 - 2                           |
| 14,4 - 28,6                | 2                               |
| 28,7 - 63,8                | 2 - 3                           |
| 63,9 - 168,1               | 2 - 4                           |
| 168,2 - 239,3              | 2 - 5                           |
| 239,4 - 497,5              | 3 - 5                           |
| 497,6 - 506,9              | 4 - 5                           |
| 507,0 - 741,4              | 5                               |

### 3.2 Referenzbereiche für die Estradiolkonzentration bei Mädchen

In Abb. 14 wird die Verteilung der Estradiolkonzentrationen bei den Mädchen in den verschiedenen Pubertätsstadien dargestellt. Vor allem im Stadium 5 ist die Streuung der Werte erheblich. Der Messbereich des verwendeten Assays erstreckt sich von 5 pg/ml bis 5000 pg/ml. Daher liegen die Werte, die in der Abbildung bei 5 pg/ml als Punkt markiert sind, in Wirklichkeit zwischen 0 pg/ml und 5 pg/ml.



**Abb. 14:** Verteilung der einzelnen Messwerte der Estradiolkonzentration in den fünf Pubertätsstadien. Jeder Punkt entspricht einem Messwert.

Die berechneten 5. und 95. Perzentilen der Estradiolkonzentration in den verschiedenen Pubertätsstadien, die den unteren und oberen Grenzen der Referenzbereiche entsprechen, werden in Tab. 13 aufgelistet. Einem gemessenen Estradiolwert kann man, wie Tab. 14 zeigt, ein oder mehrere Pubertätsstadien zuordnen.

**Tab. 13:** Minimale, maximale und mediane Estradiolkonzentrationen sowie die 5. und die 95. Perzentile in den fünf Pubertätsstadien.

| Pubertätsstadium | N  | Min. [pg/ml] | Max. [pg/ml] | 5. Perzentile [pg/ml] | Median [pg/ml] | 95. Perzentile [pg/ml] |
|------------------|----|--------------|--------------|-----------------------|----------------|------------------------|
| 1                | 25 | < 5          | 12           | < 5                   | 5,2            | 11,3                   |
| 2                | 15 | < 5          | 39           | < 5                   | 6,3            | 39,0                   |
| 3                | 30 | < 5          | 58           | < 5                   | 18,0           | 54,7                   |
| 4                | 40 | 10           | 93           | 12,0                  | 25,0           | 90,6                   |
| 5                | 45 | 14           | 162          | 15,2                  | 40,0           | 131,0                  |

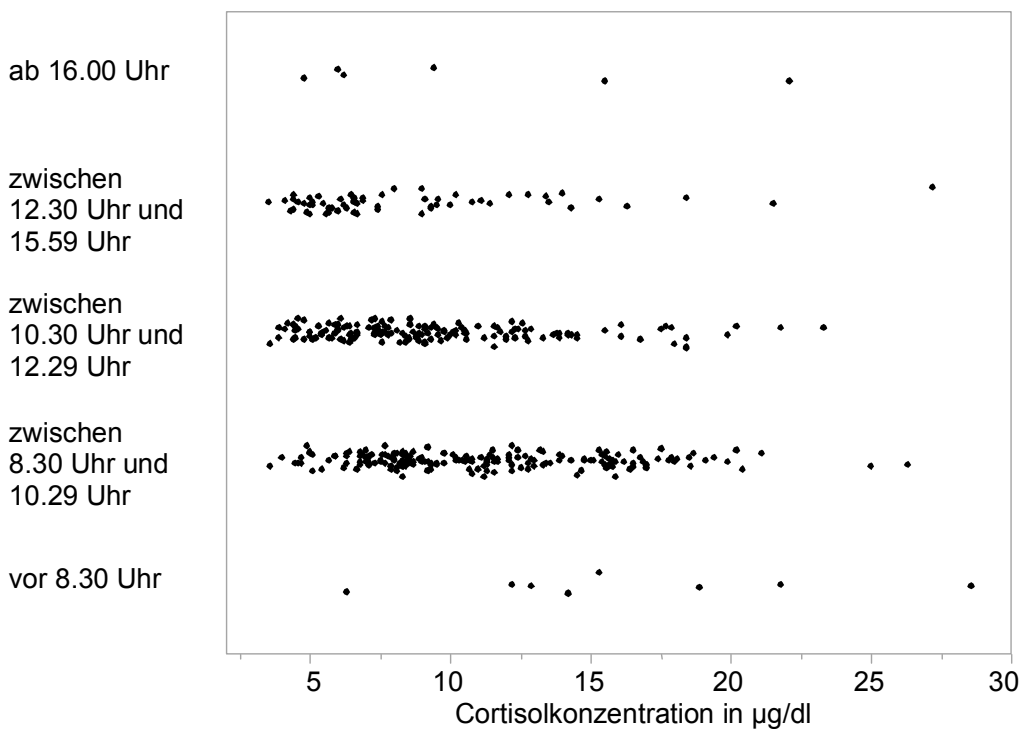
**Tab. 14:** Estradiolspiegel und die Pubertätsstadien, die ihnen zugeordnet werden können.

| Estradiolspiegel [pg/ml] | Entsprechendes Pubertätsstadium |
|--------------------------|---------------------------------|
| 0,0 - 11,3               | 1 - 3                           |
| 11,4 - 11,9              | 2 - 3                           |
| 12,0 - 15,1              | 2 - 4                           |
| 15,2 - 39,0              | 2 - 5                           |
| 39,1 - 54,7              | 3 - 5                           |
| 54,8 - 90,6              | 4 - 5                           |
| 90,7 - 131,0             | 5                               |

### 3.3 Referenzbereiche für die Cortisolkonzentration bei Kindern

Abb. 15 zeigt die Verteilung der gemessenen Cortisolkonzentrationen in den verschiedenen Abnahmezeiträumen. Die berechneten 5. und 95. Perzentilen als Referenzbereiche sind der Tab. 15 zu entnehmen.

Abnahmezeitraum



**Abb. 15:** Verteilung der einzelnen Messwerte der Cortisolkonzentration in den fünf Abnahmezeiträumen. Jeder Punkt entspricht einem Messwert.

**Tab. 15:** Minimale, maximale und mediane Cortisolkonzentrationen sowie die 5. und die 95. Perzentile in den fünf Abnahmezeiträumen.

| Abnahmezeitraum | N   | Min. [µg/dl] | Max. [µg/dl] | 5. Perzentile [µg/dl] | Median [µg/dl] | 95. Perzentile [µg/dl] |
|-----------------|-----|--------------|--------------|-----------------------|----------------|------------------------|
| vor 8.30 Uhr    | 8   | 6,3          | 28,6         | 6,3                   | 14,8           | 28,6                   |
| 8.30-10.29 Uhr  | 186 | 3,6          | 26,3         | 5,0                   | 10,6           | 18,7                   |
| 10.30-12.29 Uhr | 157 | 3,6          | 23,3         | 4,5                   | 8,7            | 18,0                   |
| 12.30-15.59 Uhr | 60  | 3,5          | 27,2         | 4,3                   | 6,7            | 18,3                   |
| ab 16.00 Uhr    | 6   | 4,8          | 22,1         | 4,8                   | 7,8            | 22,1                   |

## 4. DISKUSSION

Die ermittelten Referenzwerte sollen, wie bereits in der Einleitung beschrieben, dazu dienen, dass die in Zukunft bei Kindern gemessenen Spiegel dieser Hormone verglichen und bewertet werden können. Werden bei einem Kind Werte gemessen, die außerhalb der ermittelten Referenzbereiche liegen, wäre es allerdings eine vorschnelle Schlussfolgerung, es alleine aufgrund dessen als „krank“ zu bezeichnen. Es ist selbstverständlich klar, dass zur Findung einer Diagnose oder allgemein zur Unterscheidung zwischen „krank“ und „gesund“ nicht Laborwerte alleine reichen. So müssen alle gemessenen Hormonkonzentrationen, ob außerhalb oder innerhalb der Referenzbereiche, stets im Kontext des gesamten klinischen Bildes des Kindes betrachtet werden.

### **4.1 Referenzwertermittlung aus Messwerten von kranken Kindern**

Die Kinder der Kohorten sind nicht alle gesund. Es gibt mathematische Verfahren, wie das Hoffmann-Verfahren (Hoffmann RG, 1963), die angewendet werden können, um Referenzwerte aus einer nicht gesunden Kohorte zu berechnen. Bei dem Hoffmann-Verfahren werden jeweils die oberen und unteren 10 - 20 % der Daten abgeschnitten, unabhängig von der Diagnose dieser Patienten. Anhand der übrigen Daten wird anschließend der Referenzbereich wie üblich angegeben, entweder als Perzentilen, oder, falls es sich um eine Normalverteilung handelt, als Mittelwert und Standardabweichung. Diese Methode weist jedoch Schwachpunkte auf (Roberts WL et al., 2010). Bei diesem Verfahren wird nämlich davon ausgegangen, dass Patienten etwa gleichermaßen krankheitsbedingt zu hohe wie zu niedrige Messwerte aufweisen. Das kann in der Realität allerdings ganz anders sein.

Im Fall der vorliegenden Arbeit ist die Anwendung des Hoffmann-Vorgehens nicht geeignet, um aus den Daten der kranken Kinder aussagekräftige Referenzbereiche zu ermitteln. Das erklärt sich vor allem, wenn man bedenkt, woher diese Daten stammen: aus der endokrinologischen Ambulanz. Viele der Kinder, bei denen der Testosteron-, Estradiol- oder Cortisolspiegel gemessen wurde, leiden an Erkrankungen, die zu pathologischen Veränderungen dieser

Spiegel führen. Es gibt sowohl Störungen, die zu niedrigeren Spiegeln führen, als auch solche, die erhöhte Hormonkonzentrationen mit sich bringen. Prozentual überwiegen allerdings die mit verringerten Hormonwerten. Es hätte also in diesem Fall nicht zu sinnvollen Ergebnissen geführt, hätte man alle Kinder, deren Hormonkonzentrationen bestimmt wurden, unabhängig von ihrer Erkrankung in die Kohorte eingeschlossen und gleichermaßen einen prozentualen Anteil von ihnen mit den höchsten und mit den niedrigsten Messwerten ausgeschlossen.

Um auch ohne das Hoffmann-Verfahren zuverlässige Referenzwerte zu ermitteln, wurden alle Kinder, deren Erkrankungen, Nebendiagnosen oder Medikamenteneinnahme Einfluss auf die zu bestimmenden Hormone haben, sorgsam aus der Kohorte ausgeschlossen. Die Kohorten sind dadurch deutlich kleiner geworden und bestanden zwar nicht aus gesunden Kindern, aber man konnte nun davon ausgehen, dass die eingeschlossenen Kinder dennoch normale Hormonspiegel aufwiesen. Bei schwierigen Einzelfällen fand diese Entscheidung in Rücksprache mit dem behandelnden Endokrinologen Prof. Dr. med. G. Binder statt. Dennoch muss einem bewusst sein, dass bei der Entscheidung, ob ein Patient für die Referenzwertermittlung geeignet ist oder nicht, eine hundertprozentige Objektivität nicht gewährleistet werden kann.

Da es sich um eine retrospektive Studie handelt, ist die Zuverlässigkeit der Entscheidungen, ob ein Kind in die Kohorte eingeschlossen werden durfte oder nicht, vor allem von der Vollständigkeit und Richtigkeit der Dokumentation in den Patientenakten abhängig.

#### **4.2 Unterschiedliche Definitionen der Referenzbereiche**

Meist werden Referenzbereiche als der Bereich definiert, in dem 95 % der gemessenen Werte liegen. Laut Definition ist also bei jedem zwanzigsten gesunden Menschen der Messwert außerhalb des Referenzbereiches. Sind die Messwerte, aus denen der Referenzbereich ermittelt werden soll, normalverteilt, kann man den Referenzbereich als Mittelwert  $\pm 2$  Standardabweichungen angeben. Die Messwerte, aus denen in dieser Studie Referenzbereiche ermittelt wurden, waren allerdings oft nicht normalverteilt. Daher wurden Perzentilen und



der Median angegeben. Im Fall dieser Studie war es sinnvoller, den Referenzbereich nicht als den Bereich zu definieren, in dem sich 95 %, sondern in dem sich 90 % der gemessenen Werte befinden. In einigen Untergruppen standen in dieser Studie weniger als 40 Einzelmesswerte zur Verfügung. Die obersten und untersten 2,5 % wären in diesen Fällen jeweils weniger als ein einzelner Messwert gewesen. Somit hätte die 2,5. Perzentile dem Minimum und die 97,5. Perzentile dem Maximum entsprochen, ungeachtet der Möglichkeit, ob es sich dabei nur um Ausreißer handeln könnte. Daher wurden in dieser Arbeit die 5. und die 95. Perzentile als unterer und oberer Wert der Referenzbereiche festgelegt. Ausreißer konnten dadurch besser ausgeschlossen werden. Andererseits ergibt sich aus dieser Definition der Referenzbereiche, dass nicht jedes zwanzigste, sondern jedes zehnte gesunde Kind Hormonspiegel außerhalb dieser Bereiche haben kann. Im Stadium 2 bei den Referenzbereichen für Estradiol war die Anzahl von nur 15 Messwerten so gering, dass der berechnete Referenzbereich der Spannweite entspricht, was bei der Interpretation dieser Werte beachtet werden muss. Bei der Referenzwertermittlung für Cortisol standen im frühesten und spätesten Abnahmezeitraum kaum Messwerte zur Verfügung. Auch in diesem Fall entsprechen die angegebenen Perzentilen dem Minimum und dem Maximum. Diese Werte sind der Vollständigkeit halber zwar angegeben, allerdings wegen der sehr geringen Anzahl an Einzelwerten und aufgrund ihres Zeitraumes außerhalb der Sprechzeiten in der endokrinologischen Ambulanz ohnehin nur von geringer Bedeutung.

#### **4.3 Einflüsse auf die Hormonspiegel, die in dieser Studie nicht berücksichtigt wurden**

Die Konzentrationen der Sexualhormone sind nicht nur abhängig vom Pubertätsstadium, sondern unterliegen wie die Konzentration von Cortisol ebenfalls tageszeitlichen Schwankungen. Der Estradiolspiegel ist bei Mädchen tagsüber höher als nachts (Norjavaara E et al., 1996; Boyar RM et al., 1976; Goji K, 1993). Der Testosteronspiegel ist bei Jungen nachts und am frühen Morgen höher (Ankarberg-Lindgren C und Norjavaara E, 2004; Albertsson-Wikland K et

al., 1997, Boyar RM et al., 1974; Goji K und Tanikaze S, 1993; Judd HL et al., 1974; Mitamura R et al., 1999, Parker DC et al., 1975). Eine zusätzliche Unterteilung der Testosteron-Kohorte und Estradiol-Kohorte anhand der Abnahmezeit wäre in dieser Studie allerdings nicht sinnvoll gewesen, weil dadurch die Anzahl der Messwerte pro Pubertätsstadium und pro Abnahmezeitraum deutlich abgenommen hätte und man keine aussagekräftigen Referenzwerte hätte ermitteln können.

Nach der Menarche, die meist in der fortgeschrittenen Pubertät bei Mädchen einsetzt, ist der Estradiolspiegel außerdem zyklusabhängig. In welcher Phase des Zyklus sich die Mädchen zum Zeitpunkt der Blutentnahme befanden, wurde im Normalfall nicht dokumentiert und konnte daher nicht berücksichtigt werden. Die große Spannweite der Estradiolmesswerte in den fortgeschrittenen Pubertätsstadien mag dadurch bedingt sein, dass sich die Mädchen in verschiedenen Zyklusphasen befanden.

Der Cortisolspiegel ist nicht nur von der Tageszeit abhängig, sondern unterliegt weiteren Einflussfaktoren, die nicht in diese Studie mit einbezogen werden konnten. So gibt es Unterschiede der Cortisolspiegel je nachdem, wie alt die Kinder sind. Dabei kamen verschiedene Studien allerdings zu unterschiedlichen Ergebnissen. Einige werden im Folgenden kurz erläutert.

In der Studie von Elmlinger MW et al. (2002) kam man zu dem Ergebnis, dass der Cortisolspiegel in den ersten 15 Lebenstagen höher sei und danach abfalle. In der Pubertät komme es dann nicht nur zu einem Anstieg der Sexualhormone, sondern auch der Cortisolspiegel steige wieder an, wenn auch nur in geringem Ausmaß. Einen ähnlichen altersabhängigen Verlauf beschrieben auch Bailey D et al. (2013). Barra CB et al. (2015) beobachteten einen altersabhängigen Anstieg des morgendlichen Cortisolspiegels bei Kindern und Jugendlichen zwischen vier und 19 Jahren und Jonetz-Mentzel L und Wiedemann G (1993) bei Kindern vom fünften Lebenstag bis ins Alter von 18 Jahren. Dagegen kamen Soldin SJ et al. (1999) zu dem Ergebnis, dass der obere Wert der ermittelten Referenzbereiche im Alter von null bis 18 Jahren abnehme. Knutsson U et al. (1997) und Soldin OP et al. (2005) beschrieben gleichbleibende Cortisolkonzentrationen bei zunehmendem Alter der Kinder. Auch in der Studie von Chrousos

GP et al. (2007) wurden keine altersabhängigen Unterschiede im Medianwert der basalen Cortisolkonzentration bei Kindern im Alter zwischen fünf Monaten und unter sechs Jahren festgestellt. Die Kinder, die unter zwölf Monate alt waren, wiesen allerdings eine weitere Spannweite an Messwerten der basalen Cortisolkonzentration auf. Kerrigan JR et al. (1993) stellten keine unterschiedlichen Cortisolspiegel bei Jungen zu Beginn der Pubertät im Vergleich zu Jungen am Ende der pubertären Entwicklung fest. Der Einfluss des Alters der Kinder auf den Cortisolspiegel bleibt folglich unklar.

Die Referenzbereiche der vorliegenden Studie sind nur in Abhängigkeit von der Abnahmezeit und nicht altersabhängig berechnet. Es stehen somit die circadianen und nicht die altersabhängigen Schwankungen im Vordergrund. Es gibt verschiedene Ergebnisse für die Frage, ab welchem Alter der circadiane Rhythmus der Cortisolkonzentration bei Kindern überhaupt entwickelt ist. Zum Beispiel kamen de Weerth C et al. (2003) zu dem Ergebnis, dass sich der circadiane Rhythmus innerhalb des ersten Lebensjahres entwickelt. Andererseits etablierte sich der circadiane Rhythmus der Sekretion von ACTH, welches wiederum die Cortisolproduktion in der Nebenniere stimuliert, laut Riepe FG (2010) erst im Alter von sechs Monaten bis drei Jahren. In der Kohorte der vorliegenden Studie befinden sich zwei Kinder, die ihr erstes Lebensjahr noch nicht vollendet haben, das jüngste ist drei Monate alt. Die gemessenen Cortisolspiegel fallen allerdings nicht als Ausreißer auf. Ein Messwert stammt von einem Kind, das knapp zwei Jahre alt ist, und auch dieser Wert unterscheidet sich nicht von den Messwerten älterer Kinder in demselben Abnahmezeitraum. Fünf Kinder haben ihr drittes Lebensjahr noch nicht vollendet. Ihre Messwerte fallen jedoch bis auf einen Wert nicht als Ausreißer auf. Der einzige auffallende Wert stammt von einem Mädchen im Alter von zweieinhalb Jahren und ist mit  $6,3 \mu\text{g}/\text{dl}$  der niedrigste Messwert im Abnahmezeitraum vor 8.30 Uhr. Aufgrund der sehr geringen Datenmenge in diesem Zeitraum hat dieser einzelne Wert einen erheblichen Einfluss auf den ermittelten Referenzbereich, der in diesem Fall der Spannweite entspricht. Bei einer geringen Anzahl von Einzelwerten ist es schwierig, zu beurteilen, ob es sich bei einem einzelnen Wert um einen Ausreißer handelt. Hätten wir für den Einschluss in die Kohorte ein Mindestalter von

drei Jahren vorausgesetzt, um sicher zu gehen, dass der circadiane Rhythmus vollständig ausgeprägt ist, hätten sich die Referenzwerte bis auf den des frühesten Abnahmezeitraums nicht wesentlich von den ermittelten Werten ohne Mindestalter unterscheiden. Wie bereits beschrieben, sollte der Referenzbereich in dem frühesten Abnahmezeitraum jedoch wegen der geringen Anzahl an Einzelwerten ohnehin kritisch betrachtet werden.

In der vorliegenden Studie wurden gemeinsame Referenzwerte für Jungen und Mädchen berechnet. Es gibt einige Studien mit unterschiedlichen Ergebnissen, hinsichtlich der Frage, ob Jungen und Mädchen signifikant andere Cortisolspiegel aufweisen. Barra CB et al. (2015) und Bailey D et al. (2013) stellten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Cortisolspiegeln von Mädchen und Jungen fest. Dagegen beschrieben Chan MK et al. (2009) eine höhere Cortisolkonzentration bei Mädchen als bei Jungen im Alter zwischen 15 und 20 Jahren, während für jüngere Altersgruppen keine geschlechtsabhängige Unterteilung der Referenzwerte erforderlich war. Jonetz-Mentzel L und Wiedemann G (1993) stellten lediglich in der Altersstufe von 14 bis 15 Jahren signifikant höhere Cortisolspiegel bei Mädchen fest. Knutsson U et al. (1997) beschrieben keine signifikant unterschiedlichen Cortisolkonzentrationen oder Unterschiede im circadianen Rhythmus bei Jungen und Mädchen im Alter zwischen 2,2 und 18,5 Jahren fest, bis auf leicht höhere Werte bei Mädchen im Pubertätsstadium 2 (Tanner JM und Whitehouse RH, 1976). Der Einfluss des Geschlechts auf die Cortisolkonzentration bleibt insgesamt also unklar.

Bei Cortisol handelt es sich um ein sogenanntes „Stresshormon“. Der Spiegel kann durch Stress erhöht sein, sei es durch psychischen Stress oder Stress für den Körper beispielsweise aufgrund einer Erkrankung. Ein Arztbesuch und eine Blutabnahme stellen für Kinder individuell sehr variable Stressfaktoren dar. In vielen anderen Studien zur Referenzwertermittlung von Cortisol wurde der Stressfaktor beispielsweise dadurch umgangen, dass den Kindern vorzeitig ein peripher venöser Zugang gelegt wurde, über den anschließend schmerzfrei und stressärmer Blut abgenommen werden konnte. In unserer Studie wurde den Kindern dagegen direkt über eine peripher venöse Punktion Blut abgenommen, sodass sie zusätzlich zum Stress des Arztbesuches auch dem Stress der

Blutentnahme ausgesetzt waren. Selbstverständlich war man stets bemüht, für eine angenehme Atmosphäre im Untersuchungszimmer zu sorgen und den Arztbesuch möglichst stressfrei für die Kinder zu gestalten. Bei einigen mag es aber trotzdem zu stressbedingt erhöhten Cortisolspiegeln gekommen sein. Dies mindert aber keinesfalls die Aussagekraft der bestimmten Referenzwerte. Ganz im Gegenteil: Die Referenzwerte dienen dazu, die in Zukunft bei Kindern gemessenen Cortisolspiegel zu beurteilen, die genau demselben Stress ausgesetzt sind. Der Vergleich mit anderen Studien wird durch diese unterschiedlichen Ausgangsbedingungen bei der Probengewinnung und deren Einfluss auf den Cortisolspiegel allerdings erschwert.

#### **4.4 Diskussion der Ergebnisse der Testosteronreferenzbereiche**

Die Referenzwerte für Testosteron im Serum, die sich für die verschiedenen Pubertätsstadien ergeben haben, zeigen eine Zunahme der Testosteronkonzentration im Pubertätsverlauf.

Im präpubertären Stadium liegt der in dieser Studie ermittelte Referenzbereich für die Testosteronkonzentration bei  $< 4$  ng/dl bis 14,3 ng/dl. Aber auch Jungen mit einem Hodenvolumen von 4 ml bis unter 7 ml, welches für einen Beginn der Pubertät spricht, können noch eine Testosteronkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze von 4 ng/dl im Serum aufwiesen. Eine niedrige Testosteronkonzentration alleine scheint folglich nicht einen Beginn der Pubertät auszuschließen. Dagegen sprechen Testosteronkonzentrationen über 14,3 ng/dl nach den Berechnungen der vorliegenden Arbeit für einen Pubertätsbeginn. Für Jungen mit einem Hodenvolumen zwischen 7 ml und unter 10 ml ist der ermittelte Referenzbereich für die Testosteronkonzentration von 28,7 ng/dl bis zu 497,5 ng/dl recht weit und überschneidet sich außerdem zu einem großen Maß mit dem Referenzbereich für Jungen mit einem Hodenvolumen zwischen 10 ml und unter 15 ml, welcher sich von 63,9 ng/dl bis 506,9 ng/dl erstreckt. Bei Jungen mit einem Hodenvolumen von 15 ml und mehr liegt der Referenzbereich für die Testosteronkonzentrationen bei 168,2 ng/dl bis 741,4 ng/dl.

#### **4.4.1 Vergleich verschiedener Einteilungskriterien der Pubertätsstadien**

Der Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit denen anderer Studien wird dadurch erschwert, dass in diesen häufig andere Einteilungskriterien für die Pubertätsstadien angewandt wurden. Daher soll in diesem Abschnitt zunächst erläutert werden, inwieweit die Stadien aufeinander übertragbar sind, bevor Vergleiche vorgenommen werden.

In der vorliegenden Studie wurden Jungen anhand ihrer Hodenvolumina in Pubertätsstadien eingeteilt, weil dieses einfach und objektiv (Karaman MI et al., 2005) mit dem Orchidometer (Prader A, 1966) messbar ist. Marshall WA und Tanner JM (1970) haben aber auch für die Genitalentwicklung und die Pubesbehaarung Pubertätsstadien definiert. In der Einteilung nach der Genitalentwicklung ist das Wachstum der Hoden auch mit einbezogen, allerdings nicht mit strikten Grenzwerten für die einzelnen Stadien. Für die Einteilung nach der Pubesbehaarung gibt es teilweise eine ganz gute Übereinstimmung mit der Einteilung nach dem Hodenvolumen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. So kamen Zachmann M et al. (1974) in einer longitudinalen Studie an 30 Jungen, die von ihrem zehnten bis zu ihrem 18. Lebensjahr beobachtet wurden, zu dem Ergebnis, dass der Mittelwert  $\pm$  der Standardabweichung des Hodenvolumens im Pubesbehaarungsstadium 1 bei  $2,5 \pm 1,7$  ml, im Stadium 2 bei  $3,4 \pm 2,3$  ml, im Stadium 3 bei  $9,1 \pm 5,3$  ml, im Stadium 4 bei  $11,8 \pm 5,8$  ml und im Stadium 5 bei  $14,0 \pm 4,6$  ml liegt. Diese mittleren Hodenvolumina liegen etwas unterhalb der mittleren Hodenvolumina in den einzelnen Stadien nach der Einteilung dieser Studie. Bei den Jungen wurde das Hodenvolumen immer dann gemessen, wenn sie das nächste Pubesbehaarungsstadium erreicht haben, und daraus die eben genannten Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Somit wurden nur die Hodenvolumina erfasst, die die Jungen zu Beginn des Pubesbehaarungsstadiums hatten. Man kann davon ausgehen, dass sie zu einem späteren Zeitpunkt, wenn sie sich immer noch in dem selben Pubesbehaarungsstadium befanden, ein größeres Hodenvolumen gehabt hätten und die daraus berechneten Mittelwerte noch besser mit der Einteilung der vorliegenden Arbeit übereingestimmt hätten. Zachmann M et al. (1974) haben ebenfalls eine Querschnittstudie durchgeführt, in der anhand von

2113 Jungen im Alter von 12,5 bis 17 Jahren und 1743 jungen Männern im Alter zwischen 19 und 20 Jahren Mittelwerte  $\pm$  die Standardabweichung des Hodenvolumens für die jeweiligen Pubesbehaarungsstadien berechnet wurden. Da es sich in diesem Fall um eine Querschnittsstudie handelte, wurden auch die Hodenvolumina in die Berechnung mit einbezogen, die bei Jungen gemessen wurden, die sich in der Mitte oder am Ende eines Pubesbehaarungsstadiums befanden. Die Mittelwerte liegen oberhalb der bereits genannten Werte aus der Longitudinalstudie. Für das Pubesbehaarungsstadium 1 lag das mittlere Hodenvolumen  $\pm$  der Standardabweichung bei  $6,0 \pm 2,6$  ml, im Stadium 2 bei  $6,8 \pm 3,6$  ml, im Stadium 3 bei  $9,3 \pm 3,8$  ml, im Stadium 4 bei  $12,6 \pm 4,2$  ml und im Stadium 5 bei  $16,3 \pm 4,6$  ml. Bis auf das Stadium 1, in welchem das mittlere Hodenvolumen nach Zachmann M et al. (1974) über der in dieser Studie festgelegten Grenze für das präpubertäre Stadium von  $< 4$  ml lag, stimmen die Mittelwerte gut mit der Einteilung in der vorliegenden Arbeit überein. Für die Unterschiede im präpubertären Stadium mag das unterschiedliche Alter in den Kohorten verantwortlich sein. Während in diesem Stadium in dieser Studie die Jungen zwischen 7 und 13 Jahre alt waren, waren in der Studie von Zachmann M et al. (1974) die jüngsten Jungen bereits 12,5 Jahre alt und hatten wahrscheinlich allein aus diesem Grund bereits ein größeres Hodenvolumen.

Allerdings sind trotz der Tatsache, dass in den Pubesbehaarungsstadien 2 bis 5 die mittleren Hodenvolumina in den Bereichen nach der Einteilung in dieser Arbeit liegen, die beiden Einteilungen nicht einfach gleichzusetzen. Zum einen liegen bei den Hodenvolumina in den verschiedenen Pubesbehaarungsstadien große Streuungen vor, sodass zwar das mittlere Volumen mit der Einteilung übereinstimmen mag, es aber auch einige Jungen in den einzelnen Stadien gibt, die nach ihrem Hodenvolumen zu einem anderen Stadium gehört hätten. Außerdem gibt es verschiedene Studien, die belegen, dass es eine zeitliche Versetzung zwischen der Genitalentwicklung und der Pubesbehaarungsentwicklung gibt, welche bei Jungen etwas später eintritt (Marshall WA und Tanner JM, 1970; Tanner JM und Whitehouse RH, 1976; Largo RH und Prader A, 1983). Das wird auch in dem bereits erwähnten Unterschied im präpubertären

bzw. frühpubertären Stadium deutlich, in welchem viele Jungen trotz fehlender Pubesbehaarung bereits ein Hodenvolumen von  $> 4$  ml aufwiesen. Referenzwerte für die Testosteronkonzentrationen in den verschiedenen Pubertätsstadien können miteinander verglichen werden, auch wenn sie einmal nach den Pubesbehaarungsstadien und einmal nach den Hodenvolumina eingeteilt sind. In den früheren und mittleren Pubertätsstadien sollte man jedoch in den Vergleich mit einbeziehen, dass die Referenzwerte nach der Einteilung anhand der Pubesbehaarungsstadien aufgrund der zeitlichen Versetzung tendenziell höher liegen als die anhand der Hodenvolumina. In den fortgeschritteneren Stadien ist die zeitliche Versetzung geringer.

Referenzwerte für Testosteron, die in Abhängigkeit vom Alter ermittelt wurden, sind schwieriger mit den in dieser Studie ermittelten Referenzwerten zu vergleichen. Der zeitliche Ablauf der Pubertät ist sehr variabel. Jungen des selben Alters können sich deutlich in ihrer pubertären Entwicklung unterscheiden. Wie Abb. 5 (S. 33) zeigt, befinden sich in dieser Studie in allen Pubertätsstadien Jungen im Alter von über zehn bis  $\leq 15$  Jahren. Und auch im Alter von  $> 15$  bis  $\leq 20$  Jahren sind die Jungen dieser Studie in zahlreichen verschiedenen Entwicklungsstadien. Bei der Berechnung von Referenzwerten für verschiedene Altersgruppen wären die Spannweiten daher deutlich größer. Gleiches gilt für Referenzbereiche für Estradiol bei Mädchen. Daher ist die Ermittlung von Referenzbereichen in Abhängigkeit von den Pubertätsentwicklungsstadien deutlich sinnvoller als in Abhängigkeit vom Alter. In einigen Pubertätsstadien stammen in der vorliegenden Studie über 20 % der Messwerte von Kindern mit einer KEV. In Bezug auf ihre pubertäre Entwicklung weisen sie zwar normale Testosteronwerte auf, in Bezug auf das Alter sind ihre Werte jedoch verringert. Das muss bei einem Vergleich mit anderen Studien, die Referenzbereiche in Abhängigkeit des Alters berechnet haben, beachtet werden.

#### **4.4.2 Die Ergebnisse dieser Studie im Kontext anderer Studien**

Es wurden bei den Recherchen für diese Arbeit keine Publikationen über pädiatrische Referenzwerte für die Testosteronmessung mit dem spezifischen kompetitiven Festphasen-Radioimmunoassay Coat-A-Count, Total Testos-



terone, Siemens Health Care Diagnostics gefunden. Daher stehen zum Vergleich nur die Referenzwerte für andere Immunoassays zur Verfügung. Da es allerdings erhebliche Unterschiede zwischen den Messergebnissen der einzelnen Immunoassays geben kann (Taieb J et al., 2003), ist es empfohlen, dass für jeden Immunoassay eigene Referenzwerte ermittelt werden.

Eine kanadische Studie berichtete über pädiatrische Referenzwerte unter anderem für Testosteron für den Chemilumineszenz Immunoassay Abbott Architect i2000SR (Konforte D et al., 2013) im Rahmen der CALIPER-Datenbank-Initiative (Canadian Laboratory Initiative on Pediatric Reference Intervals). Es wurden Referenzwerte für Testosteron in Abhängigkeit von den Tannerstadien entsprechend der Entwicklung der Pubesbehaarung und der Genitalentwicklung (Marshall WA und Tanner JM, 1970) ermittelt. Allerdings beruhte in deren Studie die Einteilung in das jeweilige Pubertätsstadium auf einer Selbsteinschätzung und nicht, wie in dieser Studie, auf der Beurteilung durch einen Pädiater. Pro Stadium standen zwischen 17 und 52 Messwerte zur Verfügung. In den ersten drei Pubertätsstadien liegen die von Konforte D et al. (2013) ermittelten unteren Grenzen der Referenzbereiche unterhalb der Nachweisgrenze von 0,86 ng/dl des Immunoassays. Im zweiten Pubertätsstadium fällt auf, dass die obere Grenze von Konforte D et al. (2013) mit 24,50 ng/dl deutlich unter der in dieser Studie ermittelten von 239,3 ng/dl liegt. Die Ursache dafür kann an der Einbeziehung des LH-Wertes in die Einteilung liegen. Jungen, die zwar schon gemessen an ihrem Hodenvolumen einen Pubertätsbeginn zeigten, deren LH-Spiegel sich jedoch noch im präpubertären Bereich befanden, wurden aus dieser Studie ausgeschlossen. So kann die niedrige obere Grenze im Tannerstadium 2 in der Studie von Konforte D et al. (2013) dadurch bedingt sein, dass einige niedrige Messwerte von Jungen stammen, die zwar schon Anzeichen eines Pubertätsbeginnes zeigten, deren LH-Spiegel und Testosteronspiegel jedoch noch im präpubertären Bereich lagen. Möglicherweise liegt der Grund auch in der unterschiedlichen Beurteilung der Pubertätsentwicklung. Häufig kommt es bereits etwa drei Monate vor der Zunahme des Hodenvolumens auf 3 ml und mehr zu einem Wachstum des Penis (Hauffa BP, 2010). Da die Einteilung in Pubertätsstadien bei Konforte D et al. (2013) nicht anhand des

Hodenvolumens, sondern anhand der selbst eingeschätzten Entwicklung des Genitale und der Pubesbehaarung erfolgte, kann es gut sein, dass sich einige Jungen in der Studie von Konforte D et al. (2013) bereits in das zweite Pubertätsstadium eingeordnet haben, die nach der Definition in dieser Studie noch im ersten gewesen wären. Die Referenzbereiche von Konforte D et al. (2013) in allen anderen Stadien zeigen eine große Überschneidung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Die unteren Grenzen der Referenzbereiche liegen in allen Stadien unterhalb und die oberen Grenzen bis auf das Stadium 2 oberhalb der Ergebnisse dieser Studie.

Die Studie von Konforte D et al. (2013) stößt allerdings an ihre Grenzen. Die Anzahl der Messwerte pro Stadium war geringer als in der vorliegenden Studie. Auch wurde wie in dieser Arbeit die circadiane Schwankung des Testosteronspiegels nicht mit berücksichtigt. Zudem ist eine Validierung für andere Populationen und andere Immunoassays empfohlen (Konforte D et al., 2013). Die Selbsteinschätzung zur Einteilung in ein Pubertätsstadium ist ebenfalls ein Schwachpunkt der Studie, im Gegensatz zu der Einteilung anhand des Hodenvolumens, das von einem Pädiater mit dem Orchidometer gemessen wurde (Prader A, 1966) und eine objektivere Beurteilung ermöglicht (Karaman MI et al., 2005).

Drei Jahre vor der Veröffentlichung der Studie von Konforte D et al. (2013) wurde eine ebenfalls kanadische Studie im Rahmen der CALIPER-Datenbank-Initiative mit pädiatrischen Referenzwerten publiziert (Kulasingam V et al., 2010). Die Messung der Testosteronkonzentration erfolgte dort mit dem kompetitiven Immunoassay Roche cobas® 6000. Die Referenzwerte wurden allerdings nur in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht berechnet, sodass aus den bereits erwähnten Gründen (S. 57) ein Vergleich mit den Werten dieser Studie in Abhängigkeit von der Pubertätsentwicklung schwierig ist. Die Referenzbereiche entsprechen dem Bereich zwischen der 2,5. und der 97,5. Perzentile. Im Alter von über fünf bis einschließlich zehn Jahren, in dem man davon ausgehen kann, dass zumindest die meisten Kinder noch nicht in die Pubertät gekommen sind, lag die untere Grenze des Referenzbereiches von Kulasingam V et al. (2010) unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Assays von 1,99 ng/dl

und die obere bei 23,62 ng/dl. Diese Werte wurden anhand von 96 Messwerten von Jungen und Mädchen berechnet. Laut Konforte D et al. (2013) unterscheiden sich die Testosteronkonzentrationen zwischen Jungen und Mädchen nur im Säuglingsalter und ab dem Pubertätsbeginn. Der in der vorliegenden Arbeit ermittelte Referenzbereich im Pubertätsstadium 1 liegt innerhalb dieses Bereiches. Die von Kulasingam V et al. (2010) ermittelten Referenzbereiche für Jungen im Alter ab zehn bis unter 15 Jahren und im Alter von 15 bis unter 20 Jahren sind mit  $< 1,99$  ng/dl bis 829,35 ng/dl und 102,15 ng/dl bis 1010,16 ng/dl sehr weit.

Auch in einer anderen kanadischen Studie im Rahmen der CALIPER-Datenbank-Initiative wurden Referenzwerte für Testosteron bei Jungen in Abhängigkeit vom Alter berechnet (Chan MK et al., 2009). Gemessen wurde mit dem Immunoassay Abbott Architect ci8200. Als Referenzbereich wurde der Bereich zwischen der 2,5. und der 97,5. Perzentile definiert. Dem Pubertätsstadium 1 nach der Einteilung in dieser Studie entspricht dabei am ehesten die Altersgruppe von sechs bis zehn Jahren, für die Chan MK et al. (2009) einen Referenzbereich von 11,25 ng/dl bis 57,98 ng/dl ermittelt haben, welcher höher liegt als der dieser Arbeit. Es ist möglich, dass in dieser Altersgruppe bereits bei einigen Jungen die Pubertät begonnen hat und dass deren erhöhte Testosteronwerte das Ergebnis beeinflusst haben. Die Referenzwerte der Altersgruppen von elf bis 14 Jahren und von 15 bis 20 Jahren sind mit 13,84 ng/dl bis 636 ng/dl und 104,12 ng/dl bis 1932,51 ng/dl ähnlich weit wie in der Studie von Kulasingam V et al. (2010). Wie bereits auf S. 57 erläutert, mag die große Spannweite der Ergebnisse von Kulasingam V et al. (2010) und Chan MK et al. (2009) dadurch verursacht sein, dass die Jungen in einer Altersstufe deutliche Unterschiede in ihrer pubertären Entwicklung und in den Testosteronspiegeln aufgewiesen haben. Auffallend an den Ergebnissen von Kulasingam V et al. (2010) ist, dass die oberen Grenzen der beiden zuletzt genannten Referenzbereiche über der höchsten Testosteronkonzentration von 802 ng/dl liegen, die in dieser Studie insgesamt in der Kohorte gemessen wurde. Auch Chan MK et al. (2009) haben mit dem Referenzbereich bis 1932,5 ng/dl in der Altersgruppe von 15- bis 20-Jährigen deutlich höhere Werte, als sie in dieser

Kohorte vorkommen. Möglicherweise liegen diese Differenzen an den unterschiedlichen Messmethoden.

Für den präpubertären Testosteronspiegel bei Jungen wurden in einer kroatischen Studie von Zec I et al. (2012) Referenzwerte für den kompetitiven Chemilumineszenz Immunoassay Roche cobas e 411 berechnet. Ihnen standen mit 265 Messwerten in der jüngeren und 121 in der älteren Gruppe deutlich mehr Messwerte zur Verfügung als in der vorliegenden Studie. Deren Referenzbereiche sind definiert als der Bereich zwischen der 2,5. und der 97,5. Perzentile und liegen bei Jungen im Alter von einem Jahr bis unter sieben Jahren bei  $< 2,51$  ng/dl bis  $11,54$  ng/dl und im Alter von sieben Jahren bis unter elf Jahren bei  $< 2,51$  ng/dl bis  $21,63$  ng/dl. Diese Werte stimmen größtenteils mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein.

In einer spanischen Studie wurden Referenzwerte für Testosteron für junge Männer ermittelt (González-Sánchez V et al., 2015). Für die Messung der Testosteronkonzentration wurde der Chemilumineszenz Immunassay UniCell DXI 800 verwendet. Die Proben stammten von 121 Männern aus dem Mittelmeerraum im Alter von 18 bis 30 Jahren. Die Jungen der vorliegenden Studie mit abgeschlossener Pubertätsentwicklung waren im Alter zwischen 13 und 19 Jahren. Die von González-Sánchez V et al. (2015) berechneten Referenzwerte liegen über den hier ermittelten Referenzbereichen. Die 5. und 95. Perzentile sowie der Median lagen bei González-Sánchez V et al. (2015) zwischen  $90$  ng/dl und  $140$  ng/dl über denen dieser Studie.

In einer deutschen Studie (Gässler N et al., 2000) wurden unter anderem pädiatrische Referenzwerte für Testosteron bei Jungen in Abhängigkeit vom Alter ermittelt. Als Messgerät wurde dabei der Elektrochemilumineszenz Immunoassay (Elecsys 2010, Roche Diagnostics) verwendet. In der Studie wurden, wie auch in dieser Studie, die 5. und die 95. Perzentile als untere und obere Grenze der Referenzbereiche festgelegt. In den Altersgruppen von vier bis sechs Jahren lag der von Gässler N et al. (2000) ermittelte Referenzbereich bei  $0,7$  ng/dl bis  $4,5$  ng/dl und in der Gruppe der Sieben- bis Neunjährigen bei  $0,8$  ng/dl bis  $8,3$  ng/dl. Bei Zeichen eines Pubertätsbeginnes bei Jungen vor dem neunten Lebensjahr spricht man von einer vorzeitigen Geschlechtsreife

(Hauffa BP, 2010). In der erstgenannten Altersgruppe sind alle Jungen präpubertär und in der zweiten kann man davon ausgehen, dass die meisten ebenfalls noch nicht mit der pubertären Entwicklung begonnen haben, sodass die Werte gut mit denen des Pubertätsstadiums 1 nach der Einteilung in dieser Arbeit vergleichbar sind. In der Altersgruppe von 16 bis 20 Jahren lag der von Gässler N et al. (2000) ermittelte Referenzbereich bei 58,8 ng/dl bis 545,1 ng/dl. Zu diesem Zeitpunkt ist bei den meisten, aber möglicherweise nicht bei allen, die pubertäre Entwicklung abgeschlossen und die Werte lassen sich am ehesten mit denen im Pubertätsstadium 5 vergleichen. In den Altersgruppen der Zehn- bis Zwölfjährigen und der 13- bis 15-Jährigen lagen die Referenzwerte nach Gässler N et al. (2000) bei 3,4 ng/dl bis 49,3 ng/dl und 9,5 ng/dl bis 377,9 ng/dl. Wie bereits beschrieben (S. 57), können sich in diesem Alter die Jungen hinsichtlich ihrer Pubertätsstadien deutlich unterscheiden, was dazu beigetragen haben kann, dass die Referenzbereiche so weit sind. Insgesamt fällt auf, dass die oberen und unteren Grenzen der Referenzbereiche von Gässler N et al. (2000) jeweils unterhalb der Grenzen dieser Studie liegen. Deren Studie hat einige Schwachpunkte, wie die Tatsache, dass pro Altersgruppe nur eine Anzahl von acht bis 31 Probanden zur Verfügung standen. Zudem ist die Ermittlung von Referenzwerten entsprechend der Pubertätsstadien aus bereits erwähnten Gründen (S. 57) sinnvoller als entsprechend des Alters.

In einer britischen Studie (Khairullah A et al., 2014) wurden anhand von eigenen Messwerten von Testosteron bei Jungen und den Daten mehrerer anderer Studien (Elmlinger MW et al., 2005; Hero M, 2005; von Schnakenburg K et al., 1980; Lee PA et al., 1974; Stárka L et al., 2008) altersabhängige Referenzwerte zusammengefasst. Die eigenen Messungen wurden mit dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (EIA-1559; DRG International; Springfield, New Jersey, USA) vorgenommen. Durch den Zusammenschluss mit den anderen Studien standen pro Altersgruppe zwischen 123 und 1406 Einzelwerte zur Verfügung. Die im Folgenden als Referenzwerte von Khairullah A et al. (2014) angegebenen Bereiche entsprechen den Mittelwerten  $\pm 2$  Standardabweichungen aus den eigenen Messungen von Khairullah A et al. (2014)

kombiniert mit den Daten der oben genannten Studien. Im Alter von sechs bis sieben Jahren bzw. acht bis neun Jahren, wenn man noch von einem präpubertären Stadium ausgehen kann, haben Khairullah A et al. (2014) Referenzbereiche von 12,7 ng/dl bis 30,0 ng/dl bzw. 17,9 ng/dl bis 27,1 ng/dl berechnet. Sowohl die unteren als auch die oberen Werte liegen dabei über den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit im präpubertären Stadium. Im Alter zwischen 16 und 17 Jahren bzw. zwischen 18 und 19 Jahren, bei dem man davon ausgehen kann, dass die meisten Jungen ihre pubertäre Entwicklung abgeschlossen haben, lagen die Referenzbereiche von Khairullah A et al. (2014) bei 385,4 ng/dl bis 579,2 ng/dl bzw. 372,1 ng/dl bis 599,4 ng/dl. Verglichen mit den Ergebnissen dieser Studie im Pubertätsstadium 5 liegen die unteren Grenzen von Khairullah A et al. (2014) höher, die oberen jedoch niedriger. Die Referenzbereiche von Khairullah A et al. (2014), die für die Altersgruppen dazwischen berechnet wurden, sind aus bereits beschriebenen Gründen (S. 57) nur schwer mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbar.

In einer relativ alten Studie aus der Schweiz wurden unter anderem die Testosteronkonzentrationen von Jungen in Abhängigkeit vom Hodenvolumen oder der Pubesbehaarung im Verlauf der Pubertät beschrieben (Sizonenko PC und Paunier L, 1975). Der Radioimmunoassay, mit dem die Testosteronkonzentrationen gemessen wurden, wurde von Forest MG et al. (1973) beschrieben. Das Hodenvolumen wurde nicht mit dem Orchidometer (Prader A, 1966) gemessen, sondern es wurde der Hodenvolumenindex berechnet. Dieser ergibt sich, indem die Länge und die Breite des einen Hodens miteinander multipliziert werden und zu dem Produkt aus der Länge und der Breite des anderen Hodens addiert werden und das Ergebnis anschließend durch zwei dividiert wird (Burr IM et al., 1970). Der Hodenvolumenindex kann nicht mit dem Volumen, das mit Hilfe des Orchidometers (Prader A, 1966) bestimmt wurde, gleichgesetzt werden. Durch Messung der Länge und der Breite der einzelnen Ellipsoide des Orchidometers konnte abgeschätzt werden, welchem Hodenvolumenindex diese Volumina entsprechen. Im Pubertätsstadium 1 nach der Einteilung in der vorliegenden Studie beträgt der Hodenvolumenindex etwa 1,9 bis 4,0. Für den Hodenvolumenindex zwischen 2 und 3 bzw. zwischen 3 und 4

haben Sizonenko PC und Paunier L (1975) ein 95%-Konfidenzintervall der Testosteronkonzentration von 3,5 ng/dl bis 16,6 ng/dl bzw. von 1,5 ng/dl bis 20,4 ng/dl berechnet. Im Pubesbehaarungsstadium 1 bei einem Hodenvolumenindex unter 4 haben sie ein 95%-Konfidenzintervall der Testosteronkonzentration von 3,4 ng/dl bis 17,2 ng/dl berechnet. Diese Werte zeigen eine große Überschneidung mit den hier ermittelten Referenzwerten im Pubertätsstadium 1. Die Ergebnisse der Studie in den fortgeschritteneren Pubertätsstadien sollen hier nicht näher aufgezählt und mit den Ergebnissen dieser Studie verglichen werden, weil Sizonenko PC und Paunier L (1975) in diesen Gruppen nur zwischen vier und elf Jungen zur Verfügung standen und die Aussagekraft der Ergebnisse daher durchaus kritisch zu betrachten ist.

#### **4.5 Diskussion der Ergebnisse der Estradiolreferenzbereiche**

Die in dieser Studie ermittelten Referenzbereiche für Estradiol von Mädchen zeigen eine Zunahme der Estradiolkonzentration im Laufe der Pubertät. Niedrige Estradiolspiegel unterhalb der Nachweisgrenze von 5 pg/ml liegen auch noch bis ins fortgeschrittenen Pubertätsstadium mit der Brustentwicklung B3 nach Marshall WA und Tanner JM (1969) in dem ermittelten Referenzbereich. Werte über 11,3 ng/ml liegen erst ab dem Beginn der Pubertätsentwicklung entsprechend dem Brustentwicklungsstadium B2 nach Marshall WA und Tanner JM (1969) im Referenzbereich. Auffallend sind die großen Spannweiten der Referenzbereiche und die deutlichen Überlappungen in den verschiedenen Pubertätsstadien.

##### **4.5.1 Die Ergebnisse dieser Studie im Kontext anderer Studien**

Auch für die Estradiolmessung mit dem kompetitiven Radioimmunoassay Estradiol Maia der Firma Radim wurden bei den Recherchen für diese Arbeit keine Publikationen über pädiatrische Referenzwerte gefunden. Daher stehen zum Vergleich nur die Referenzwerte für andere Immunoassays zur Verfügung, wobei allerdings zu bedenken ist, dass es erhebliche Unterschiede zwischen den Messergebnissen der einzelnen Immunoassays geben kann (Taieb J et al., 2003).

In einer bereits erwähnten (S. 61) kroatischen Studie (Zec I et al., 2012) wurden unter anderem Referenzwerte für Estradiol von präpubertären Mädchen ermittelt. Im Alter von einem bis unter vier Jahren kamen Zec I et al. (2012) auf einen Referenzbereich von  $< 5$  ng/ml bis 21,93 ng/ml, im Alter zwischen vier und unter acht Jahren lag der von Zec I et al. (2012) ermittelte Referenzbereich bei  $< 5$  pg/ml bis 45,50 pg/ml und im Alter von acht bis unter elf Jahren bei  $< 5$  pg/ml bis 46,05 pg/ml. In den einzelnen Altersgruppen standen Zec I et al. (2012) zwischen 103 und 147 Messwerte zur Verfügung.

Chan MK et al. (2009) haben in einer oben (S. 53 und S. 60 f.) erwähnten Studie unter anderem altersabhängige Referenzwerte für Estradiol bei Mädchen bestimmt. Die Messungen wurden mit dem Architect ci8200 Immunoassay (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL) durchgeführt. Die Referenzwerte wurden anhand von zwischen 21 und 115 Messwerten von gesunden Mädchen je Altersgruppe ermittelt. Im Alter zwischen einem und fünf Jahren lag der Referenzbereich bei 8,6 pg/ml bis 26,6 pg/ml. Es ist davon auszugehen, dass in dieser Altersgruppe die Mädchen noch nicht mit einer pubertären Entwicklung begonnen haben. Der Referenzbereich ist somit gut mit dem Referenzbereich von  $< 5$  pg/ml bis 11,3 pg/ml im Stadium 1 dieser Studie zu vergleichen. Die Ergebnisse von Chan MK et al. (2009) für die darauffolgenden Altersgruppen sind nur schlecht mit den Referenzbereichen der vorliegenden Arbeit vergleichbar, da sich die Mädchen im Alter von sechs bis zehn Jahren und elf bis 14 Jahren in ihrer pubertären Entwicklung massiv unterscheiden können, wie bereits auf S. 57 erläutert wurde. Die Altersgruppe von 15 bis 20 Jahren lässt sich am ehesten mit den Ergebnissen dieser Studie für die Mädchen im Pubertätsentwicklungsstadium 5 vergleichen, da anzunehmen ist, dass im Alter zwischen 15 bis 20 Jahren zumindest die meisten Mädchen ihre pubertäre Entwicklung abgeschlossen haben. Chan MK et al. (2009) ermittelten einen Referenzbereich für diese Mädchen von 9,3 pg/ml bis 259,8 pg/ml. Die obere Grenze deren Referenzbereich liegt somit deutlich über dem dieser Studie. Wie auch in der vorliegenden Arbeit ist der Anstieg der unteren Grenzen der Referenzbereiche von Chan MK et al. (2009) mit zunehmendem Alter viel geringer ausgeprägt als der der oberen Grenzen. Insgesamt liegen die oberen



Grenzwerte von Chan MK et al. (2009) wie auch von Zec I et al. (2012) über den oberen Grenzwerten dieser Studie.

In einer bereits erwähnten (S. 58 ff.) kanadischen Studie (Konforte D et al., 2013) wurden unter anderem Referenzwerte für Estradiol in den verschiedenen Pubertätsstadien beschrieben. Dabei wurden die Mädchen entsprechend ihrer Selbsteinschätzung der Brustentwicklung und der Pubesbehaarung den fünf Stadien nach Marshall WA und Tanner JM (1969) zugeordnet. Pro Stadium standen Konforte D et al. (2013) zwischen 22 und 57 Messwerte zur Verfügung. Das verwendete Messgerät war der Chemilumineszenz Immunoassay Abbott Architect i2000SR. Bei Konforte D et al. (2013) waren wie bei den Ergebnissen dieser Studie die unteren Grenzen der Referenzbereiche für Estradiol in den Pubertätsstadien 1 bis 3 unterhalb der Nachweisgrenze von 5 pg/ml. Für die oberen Grenzen der Referenzbereiche der Stadien 1 bis 3 kamen Konforte D et al. (2013) auf 20 pg/ml, 26 pg/ml und 86 pg/ml. In den Stadien 4 und 5 lagen die von Konforte D et al. (2013) ermittelten Referenzbereiche bei 13 pg/ml bis 141 pg/ml und bei 19 pg/ml bis 208 pg/ml. Die Ergebnisse von Konforte D et al. (2013) zeigen große Übereinstimmungen mit denen dieser Studie. Im Stadium 2 liegt die obere Grenze des von Konforte D et al. (2013) ermittelten Referenzbereiches unterhalb des Wertes der vorliegenden Studie, während in allen anderen Stadien die Werte von Konforte D et al. (2013) höher liegen. Da in der Studie von Konforte D et al. (2013) die Einteilung in die Pubertätsstadien nicht nur anhand der Brustentwicklung, sondern auch in Abhängigkeit von der Pubesbehaarung erfolgte, ist es sehr wahrscheinlich, dass es dadurch zu dem niedrigeren Ergebnis im Pubertätsstadium 2 kam. Bei ca. 50 % der Mädchen geht dem Beginn der Brustentwicklung die erste Schambehaarung voraus (Hauffa BP, 2010). Folglich ist es wahrscheinlich, dass in der Studie von Konforte D et al. (2013) im Pubertätsstadium 2 auch Mädchen mit vermutlich eher niedrigen Estradiolspiegeln eingeschlossen waren, die nach der Einteilung der vorliegenden Arbeit noch in das Stadium 1 eingeordnet worden wären. Auf die Schwachpunkte der Studie wurde bereits oben eingegangen (S. 59).

In einer weiteren oben beschriebenen (S. 59 f.) kanadischen Studie (Kulasingham V et al. 2010) wurden unter anderem Referenzwerte für Estradiol in

Abhängigkeit vom Alter ermittelt. Das Messgerät war der kompetitive Immunoassay Roche cobas® 6000. Die Referenzbereiche wurden als der Bereich von der 2,5. bis zur 97,5. Perzentile definiert. In den verschiedenen Altersgruppen standen Kulasingam V et al. (2010) zwischen 37 und 130 Messwerte zur Verfügung. In der Gruppe von Jungen und Mädchen im Alter von einem Jahr bis unter fünf Jahren lag der von Kulasingam V et al. (2010) berechnete Referenzwert für Estradiol bei < 5 pg/ml bis 19,6 pg/ml und damit ähnlich wie in den Ergebnissen dieser Studie. Laut Konforte D et al. (2013) unterscheiden sich die Referenzbereiche von präpubertären Jungen und Mädchen nicht signifikant, sodass ein Vergleich zwischen der vorliegenden Studie und der von Kulasingam V et al. (2010) möglich wäre, dagegen kamen Janfaza M et al. (2006) und Klein KO et al. (1994) zu dem Ergebnis, dass auch schon bei präpubertären Mädchen die Estradiolspiegel höher sind als bei präpubertären Jungen. Für die Altersgruppe der über 15- bis 20-jährigen Mädchen, in der die meisten, aber vermutlich nicht alle Mädchen ihre Pubertätsentwicklung abgeschlossen haben, wurde von Kulasingam V et al. (2010) ein Referenzbereich von 6,1 pg/ml bis 55,9 pg/ml berechnet, der damit unter dem von uns ermittelten Referenzbereich im Pubertätsstadium 5 liegt. An den Ergebnissen von Kulasingam V et al. (2010) fällt ins Auge, dass der Referenzbereich für die Mädchen zwischen über zehn und 15 Jahren mit 6,5 pg/ml bis 233,4 pg/ml deutlich über dem der darauffolgenden Altersstufe lag. Wenn man genauer betrachtet, wie Kulasingam V et al. (2010) die Proben gewonnen haben, stößt man auf eine mögliche Ursache dafür und deckt gleichzeitig einen deutlichen Schwachpunkt der Studie auf. Für die Referenzwertermittlung wurden nämlich überschüssige Proben von ambulanten, metabolisch stabilen Patienten der Kinderklinik in Toronto verwendet. Die Daten wurden bis auf das Geschlecht und das Alter anonymisiert. Es wurde nirgends beschrieben, ob die Patienten und Patientinnen aufgrund bestimmter Medikamenteneinnahmen aus der Kohorte ausgeschlossen wurden. Daher muss man davon ausgehen, dass in der Kohorte auch Mädchen eingeschlossen waren, die orale Kontrazeptiva eingenommen haben. Möglicherweise waren in der Altersstufe zwischen über 15 Jahren und 20 Jahren einige Mädchen eingeschlossen, die aufgrund

einer Einnahme von oralen Kontrazeptiva niedrige Estradiolspiegel aufwiesen. Die Ergebnisse in dieser Altersstufe sind daher kritisch zu betrachten und eigentlich nicht mit denen dieser Studie vergleichbar. Die von Kulasingam V et al. (2010) berechneten Referenzwerte für die anderen Altersstufen sind ebenfalls nicht gut mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zu vergleichen, weil die Mädchen sich in derselben Altersstufe massiv in ihrer pubertären Entwicklung unterscheiden können (S. 57).

In einer Studie aus Tübingen wurden unter anderem Referenzbereiche für Estradiol bei Mädchen in den verschiedenen Pubertätsstadien berechnet (Elmlinger MW et al., 2002). Als Messgerät wurde das automatisierte Chemilumineszenz Assay System Immulite®, DPC Los Angeles, CA, USA verwendet. Die Referenzbereiche wurden als der Bereich zwischen der 2,5. und der 97,5. Perzentile definiert. Die Mädchen wurden entsprechend der Tannerstadien eingeteilt. In den verschiedenen Pubertätsstadien standen Elmlinger MW et al. (2002) zwischen 25 und 65 Mädchen zur Verfügung. Mit einem Referenzbereich von 8,3 pg/ml bis 36,9 pg/ml im Tannerstadium 1 lag der untere Wert überraschenderweise über der Nachweisgrenze des verwendeten Assays von 5,4 pg/ml. In den Tannerstadien 2 bzw. 3 reichten die Referenzbereiche nach Elmlinger MW et al. (2002) von Werten unterhalb der Nachweisgrenze bis 41,1 pg/ml bzw. 101,4 pg/ml. In den Tannerstadien 4 und 5 lagen die Referenzbereiche von Elmlinger MW et al. (2002) bei 9,0 pg/ml bis 178,6 pg/ml und 14,2 pg/ml bis 200,1 pg/ml. In allen Stadien sind die oberen Grenzen der Referenzbereiche nach Elmlinger MW et al. (2002) höher als in den Ergebnissen dieser Studie. Die Referenzbereiche von Elmlinger MW et al. (2002) weisen wie auch die Referenzbereiche der vorliegenden Arbeit große Spannweiten und Überlappungen in den verschiedenen Stadien auf.

#### **4.6 Diskussion der Ergebnisse der Cortisolreferenzbereiche**

Die in dieser Studie ermittelten Referenzbereiche für Cortisol bei Kindern zeigen, dass der Spiegel morgens höher ist und im Laufe des Tages abnimmt. Der Medianwert nimmt von 14,8 µg/dl vor 8.30 Uhr auf 6,7 µg/dl zwischen 12.30 Uhr und 15.59 Uhr ab. Die 5. Perzentile, welche der unteren Grenze der Referenzbereiche entspricht, ist mit 6,3 µg/dl im Zeitraum vor 8.30 Uhr am höchsten und liegt im Zeitraum zwischen 12.30 Uhr und 15.59 Uhr mit 4,3 µg/dl am niedrigsten. Die 95. Perzentile, welche der oberen Grenze der Referenzbereiche entspricht, liegt mit 28,6 µg/dl im Zeitraum vor 8.30 Uhr über denen in den drei Zeiträumen bis 15.59 Uhr, in welchen Werte zwischen 18,0 µg/dl und 18,7 µg/dl die obere Grenze markieren. Der späteste Zeitraum ab 16.00 Uhr zeigt im Vergleich zum vorangehenden Zeitraum eine höhere 5. und 95. Perzentile sowie einen höheren Medianwert. In diesem Zeitraum standen allerdings lediglich sechs Messwerte zur Verfügung, sodass die 5. und 95. Perzentile der Spannweite entsprechen. Gleiches gilt für den Zeitraum vor 8.30 Uhr, in welchem acht Messwerte zur Berechnung des Referenzbereiches dienten. Die Referenzbereiche dieser beiden Zeiträume sind daher in ihrer Aussagekraft eingeschränkt.

Insgesamt gibt es eine große Überlappung der Referenzbereiche der verschiedenen Zeiträume. Cortisolspiegel zwischen 6,3 µg/dl und 18,0 µg/dl liegen in allen fünf Zeiträumen innerhalb der in dieser Studie berechneten Referenzbereiche.

##### **4.6.1 Die Ergebnisse dieser Studie im Kontext anderer Studien**

Ein direkter Vergleich der Referenzbereiche dieser Arbeit mit denen, die in anderen Studien ermittelt wurden, ist aus verschiedenen Gründen erschwert. Es wurden in den verschiedenen Studien unterschiedliche Messmethoden verwendet, die nicht ohne weiteres miteinander vergleichbar sind. Zahlreiche Studien über die Cortisolkonzentration bei Kindern und die circadianen Schwankungen beziehen sich auf die Messung von Cortisol im Speichel. Aber auch bei Studien, die sich auf das Cortisol im Serum beziehen, ist ein Vergleich nicht uneingeschränkt möglich, weil sich die Studien oft in ihren Ausgangsbe-

dingungen der Probengewinnung unterscheiden. Zum Beispiel wurde der Stress, der bei einer Blutentnahme bei Kindern unter Umständen die Spiegel der „Stresshormone“ beeinflusst, dadurch umgangen, dass den Kindern unter stationären Bedingungen Blut aus einem peripher venösen Zugang nahezu schmerzfrei abgenommen wurde. Auch durch den Umstand, dass die Zeiträume, für die die einzelnen Cortisol-Referenzbereiche ermittelt wurden, in den verschiedenen Studien unterschiedlich festgelegt sind, ist ein direkter Vergleich der Ergebnisse schwierig.

In vielen Studien wurden zwar pädiatrische Referenzbereiche für Cortisol ermittelt, aber die circadianen Schwankungen wurden dabei gar nicht beachtet. So zum Beispiel in den bereits zitierten Studien von Soldin OP et al. (2005) (S. 51) oder der von Elmlinger MW et al. (2002) (S. 51 und S. 68). Die Messungen erfolgten in den beiden Studien mit dem Imulite 1000 bzw. dem Immulite, sodass ein Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie aufgrund der ähnlichen Messmethode interessant ist. Ein Vergleich der Ergebnisse ist allerdings nur begrenzt möglich, da Soldin OP et al. (2005) die Referenzwerte nur in Abhängigkeit vom Alter und Elmlinger MW et al. (2002) in Abhängigkeit vom Alter und der Pubertätsentwicklung, nicht aber in Abhängigkeit von der Abnahmeuhrzeit ermittelt haben. Die 2,5. Perzentile der Referenzwerte für Cortisol von Soldin OP et al. (2005) lag bei 2 µg/dl in der Altersgruppe der elf- bis unter 15-jährigen Jungen und Mädchen und in allen anderen Altersgruppen bei < 1 µg/dl. Die 97,5. Perzentile lag in deren Studie zwischen 25 µg/dl in der Altersgruppe der elf- bis unter 15-jährigen Jungen und Mädchen und 38 µg/dl in der Altersgruppe der sechs- bis unter elfjährigen Jungen und Mädchen. Die Referenzbereiche nach Soldin OP et al. (2005) sind somit weiter als in den Ergebnissen dieser Studie. Am ehesten ist dieser Umstand darauf zurückzuführen, dass in ihrer Studie Werte aller Tageszeiten in die Referenzwertberechnung eingeflossen sind. Pro Altersgruppe standen Soldin OP et al. (2005) zwischen 45 und 149 Messwerte von Patienten zur Verfügung. Durch die Anwendung des Hoffmann-Verfahrens (Hoffmann RG, 1963) wurde versucht, den Einfluss der Erkrankungen der Patienten auf die Referenzwerte zu verringern. In der Studie von Elmlinger MW et al. (2002) lagen die

2,5. Perzentilen der Referenzbereiche zwischen 3,6 µg/dl bei Jungen im Alter von neun bis zehn Jahren und 8,8 µg/dl bei Mädchen zwischen 17 und 19 Jahren. Die 97,5. Perzentilen lagen bei 17,6 µg/dl bei Jungen mit einem Alter zwischen 16 Tagen und drei Jahren und 34,8 µg/dl bei Jungen in den ersten sieben Lebenstagen. Hier zeigt sich eine große Überlappung mit den Ergebnissen dieser Arbeit. In einem Großteil der Altersgruppen liegen die 2,5. Perzentilen höher als in den Ergebnissen der vorliegenden Studie. Elmlinger MW et al. (2002) standen in den verschiedenen Altersgruppen je nach Einteilung zwischen acht und 127 Mädchen und zwölf und 131 Jungen zur Verfügung, in den meisten Altersgruppen, für die Referenzbereiche ermittelt wurden, lag die Anzahl der Jungen und Mädchen jeweils zwischen 20 und 40. In der bereits mehrfach (S. 53, S. 60 f. und S. 65 f.) erwähnten Studie von Chan MK et al. (2009) im Rahmen der CALIPER-Datenbank-Initiative sind die Referenzwerte in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht angegeben und unabhängig von der Abnahmeuhrzeit. Die Messungen erfolgten mit dem Abbott Architect ci8200. Pro Altersgruppe standen zur Referenzwertermittlung von Cortisol zwischen 90 und 164 Messwerte zur Verfügung. In der Altersgruppe der 15- bis 20-Jährigen mit 95 Jungen und 37 Mädchen erfolgte eine zusätzliche Unterteilung nach Geschlecht. Die 2,5. Perzentilen lagen zwischen 0,5 µg/dl bei den Kindern zwischen null und 12 Monaten und 2,5 µg/dl in der Gruppe der Jungen im Alter von 15 bis 20 Jahren. Die 97,5. Perzentile war in allen Gruppen zwischen 14,4 µg/dl und 15,9 µg/dl, bis auf die Gruppe der Jungen zwischen 15 und 20 Jahren, bei denen die 97,5. Perzentile mit 23,3 µg/dl etwas höher lag. Die unteren Grenzen der Referenzbereiche von Chan MK et al. (2009) und auch die obere Grenze in allen Gruppen bis auf die der Jungen zwischen 15 und 20 Jahren liegen unter den unteren bzw. oberen Grenzen der Referenzbereiche der vorliegenden Arbeit, möglicherweise durch die unterschiedlichen Messmethoden bedingt, oder dadurch, dass in die Berechnungen von Chan MK et al. (2009) vermutlich zahlreiche niedrige Cortisolspiegel von Abnahmen am Nachmittag oder Abend eingeflossen sind. In einer Studie von Bailey D et al. (2013) wurden durch Messungen der Cortisolkonzentrationen mit dem Immunoassay Abbott Architect i2000 bei 736

gesunden Jungen und 746 Mädchen im Alter von zwei Tagen bis 18 Jahren die bereits beschriebenen altersabhängigen (S. 51) und geschlechtsabhängigen (S. 53) sowie tageszeitabhängigen Unterschiede untersucht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kamen Bailey D et al. (2013) zu der Schlussfolgerung, dass es bei Kindern keine wesentlichen tageszeitabhängigen Schwankungen der Cortisolkonzentration gibt. Lediglich die Werte am Morgen zwischen 9.00 Uhr und 10.59 Uhr lagen etwa 10 % höher im Vergleich zu denen zwischen 15.00 Uhr und 22.00 Uhr. Der geringe Unterschied kann dadurch bedingt sein, dass der früheste Zeitraum mit 9.00 Uhr bis 10.45 Uhr im Vergleich zu anderen Studien relativ spät liegt und so keine Messwerte der vermutlich höheren Cortisolspiegel vor 9.00 Uhr erfasst wurden. Bailey D et al. (2013) selbst vermuten die Ursache für die nur geringe Ausprägung der circadianen Schwankung zum einen darin, dass möglicherweise der Stress der Blutabnahme am Nachmittag oder Abend einen verhältnismäßig höheren Anstieg des Cortisolspiegels verursacht hat als am Morgen und dass somit der Unterschied zwischen den Cortisolspiegeln am Morgen im Vergleich zum Nachmittag und Abend verringert wurde. Zum anderen gehen sie davon aus, dass die interindividuellen Unterschiede die circadianen intraindividuellen Unterschiede überdecken. Von beiden genannten Effekten könnten die Ergebnisse dieser Studie ebenfalls betroffen sein, sodass die circadiane Rhythmik gegebenenfalls stärker ausgeprägt ist, als sie deutlich wurde. Um die intraindividuellen Schwankungen darzustellen, müsste man viele einzelne Messwerte zu verschiedenen Abnahmezeiten von demselben Kind miteinander vergleichen, was im Rahmen dieser Studie nicht möglich war, da von den meisten Kindern nur ein einzelner Messwert und in Einzelfällen bis maximal vier Messwerte zur Verfügung standen.

Barra CB et al. (2015) haben die Cortisolspiegel bei 120 Jungen und Mädchen im Alter zwischen vier und 19 Jahren gemessen. Als Messgerät wurde der Chemilumineszenz Enzyme Immunoassay Vitros 5600 (MicrWell, Johnson & Johnson, High Wycombe, UK, 2009) verwendet. Da die Blutentnahmen zwischen 8.00 Uhr und 9.00 Uhr erfolgt sind, lassen sich die Ergebnisse am ehesten mit den Ergebnissen dieser Studie für die ersten beiden Abnahmezeiträume

vergleichen. Es zeigt sich eine große Überlappung der Referenzbereiche der beiden Studien. Barra CB et al. (2015) berechneten eine 2,5. Perzentile von 2,97 µg/dl und eine 97,5. Perzentile von 23,4 µg/ml. Der Median liegt mit 7,3 µg/dl unter dem dieser Studie von 10,6 µg/dl bzw. 14,8 µg/dl.

Jonetz-Mentzel L und Wiedemann G (1993) beschrieben pädiatrische Referenzwerte für Cortisol alters- und geschlechtsabhängig. Da die Blutentnahmen in ihrer Studie zwischen 8.00 Uhr und 10.00 Uhr vorgenommen wurden, sind deren Ergebnisse am ehesten mit den Referenzwerten der ersten beiden Zeiträume dieser Studie vergleichbar. Die Cortisolmessungen erfolgten mit dem Fluoreszenz-Polarisations Immunoassay TDx, Abbott Laboratories. Der Referenzbereich für die Kinder im Alter von fünf Tagen hat mit 0,6 µg/dl bis 19,8 µg/dl die niedrigsten Werte. In den anderen Altersgruppen lagen die 2,5. Perzentilen zwischen 2,4 µg/dl und 2,5 µg/dl und die 97,5. Perzentilen bei 22,9 µg/dl bis 28,6 µg/dl. Außer den Ergebnissen bei den Kindern am fünften Lebenstag liegen die 2,5. Perzentilen von Jonetz-Mentzel L und Wiedemann G (1993) unterhalb der unteren Grenzwerte in den ähnlichen Abnahmezeiträumen in der vorliegenden Arbeit. Die oberen Grenzen der Referenzwerte der Studie von Jonetz-Mentzel L und Wiedemann G (1993) stimmen gut mit den Ergebnissen dieser Studie überein.

In der bereits erwähnten (S. 59 f. und S. 66 ff.) Studie von Kulasingam V et al. (2010) im Rahmen der CALIPER-Initiative wurden unter anderem auch Referenzwerte für Cortisol ermittelt. Als Messgerät wurde der Immunoassay Roche cobas® 6000 analyzer verwendet. Die Referenzwerte wurden unabhängig von der Abnahmezeit berechnet. Die Proben stammten von ambulanten Patienten, bei denen nicht von einer endokrinen oder metabolischen Erkrankung auszugehen war. Die Referenzbereiche wurden als der Bereich zwischen der 2,5. und der 97,5. Perzentile definiert. Im Alter zwischen null und 15 Jahren haben Kulasingam V et al. (2010) einen Referenzbereich von 2,1 µg/dl bis 20,5 µg/dl anhand von 419 Messwerten berechnet. Im Alter zwischen über 15 bis einschließlich 20 Jahren wurde die Kohorte noch nach dem Geschlecht aufgeteilt. Der Referenzbereich für die Jungen lag bei 3,7 µg/dl bis 29,2 µg/dl und für die Mädchen bei 1,7 µg/dl bis



13,2 µg/dl. Es standen für diese Berechnungen 23 Messwerte von Jungen und 29 von Mädchen zur Verfügung. Dass die unteren Grenzen der Referenzbereiche unter den Ergebnissen der vorliegenden Studie liegen, kann an den unterschiedlichen Messmethoden oder, wie bereits oben (S. 71) beschrieben, an der Tatsache liegen, dass in die Berechnungen vermutlich zahlreiche niedrige Cortisolwerte von Abnahmen am Nachmittag oder Abend eingeflossen sind.

In der Studie von Soldin SJ et al. (1999), die bereits oben erwähnt wurde (S. 51) wurden pädiatrische Referenzwerte für Cortisol in Abhängigkeit von Alter und Tageszeit ermittelt. Die Messungen der Cortisolspiegel erfolgten mit dem Immuno I (Bayer Corporation, Tarrytown, NY, USA) aus Probenresten von Patienten im Alter von null bis 18 Jahren des Kinderkrankenhauses in Washington DC. Ausreißer wurden mit Hilfe des Chauvenet'schen Kriteriums (Chavenet W und Crymble GG, 1973) detektiert und aussortiert und das Hoffmannverfahren (Hoffmann RG, 1963) wurde verwendet, um den Einfluss von krankheitsbedingt zu hohen oder zu niedrigen Messwerten auf die Referenzwertermittlung zu minimieren. Die Referenzbereiche wurden als der Bereich zwischen der 2,5. und der 97,5. Perzentile definiert. Es wurden Referenzwerte für die Morgenstunden (5.00 Uhr bis 11.00 Uhr) und die Abendstunden (17.00 Uhr bis 23.00 Uhr) berechnet. Pro Abnahmezeitraum und Altersgruppe standen Soldin SJ et al. (1999) allerdings nur zwischen 19 und 33 Messwerte zur Verfügung. Die 2,5. Perzentile lag in jeder Altersgruppe der Referenzbereiche von Soldin SJ et al. (1999) bei 1 µg/dl. Der obere Wert der Referenzbereiche für den Zeitraum von 5.00 Uhr bis 11.00 Uhr lag je nach Alter zwischen 28 µg/dl und 34 µg/dl und für den Zeitraum von 17.00 Uhr bis 23.00 Uhr zwischen 22 µg/dl und 30 µg/dl. Die Referenzbereiche sind somit recht weit, weiter als in dieser Studie. Aber auch die Zeiträume sind in der Studie von Soldin SJ et al. (1999) deutlich größer als in der vorliegenden Arbeit, was einen Vergleich erschwert. Auffallend bei den Ergebnissen von Soldin SJ et al. (1999) ist, dass so niedrige Werte von 1 µg/dl zu beiden beschriebenen Abnahmezeiträumen stets innerhalb des Referenzbereiches liegen.

#### **4.7 Schlussfolgerung**

Es gibt zwar einige Studien, in denen Referenzbereiche für Hormone bei Kindern ermittelt wurden, jedoch sind meist die Referenzbereiche nur für verschiedene Altersgruppen berechnet. Eine alleinige altersabhängige Berechnung der Referenzbereiche ist nicht sinnvoll, da die Hormone Testosteron und Estradiol unmittelbar mit der pubertären Entwicklung der Kinder zusammenhängen und der zeitliche Ablauf der Pubertät sehr variabel ist. In dieser Arbeit ist es gelungen, für die objektiv über das Hodenvolumen bei Jungen und die Brustentwicklung bei Mädchen beurteilbaren Pubertätsstadien einzelne Referenzbereiche für die Sexualhormone zu berechnen.

Auch wurden bereits viele Studien über Referenzbereiche für Cortisol publiziert. In dem Großteil dieser Studien wurde dabei aber nicht auf die tageszeitabhängigen Schwankungen eingegangen. Die Referenzbereiche dieser Studie sind in Abhängigkeit von der Abnahmeuhrzeit berechnet und beziehen die circadianen Schwankungen des Cortisolspiegels mit ein.

Für die Ermittlung von Referenzbereichen wäre es optimal, eine größere Anzahl von Messwerten zu haben, als sie in dieser Studie zur Verfügung stand. In verschiedenen Publikationen (Reed AH et al., 1971 und Solberg HE, 2004) wird eine Mindestanzahl von 120 Messwerten zur Bestimmung von Referenzbereichen empfohlen. Insbesondere im Pubertätsstadium 2 der Mädchen bei den Estradiol-Referenzbereichen und in den Abnahmezeiträumen vor 8.30 Uhr und ab 16.00 Uhr bei den Cortisol-Referenzbereichen standen in dieser Studie nur wenige Messwerte zur Verfügung.

Auch sind Messwerte von gesunden Kindern zur Referenzwertermittlung besser geeignet als die von kranken Kindern. Der Einfluss der verschiedenen Krankheiten auf den Hormonhaushalt ist nicht immer ganz sicher und die Entscheidung, ob ein Kind aufgrund seiner Erkrankung oder Medikamenteneinnahme aus der Kohorte ausgeschlossen werden sollte, teilweise schwer objektiv zu treffen. Außerdem wäre es bei einer ausreichenden Datenmenge möglich, weitere Einflussfaktoren auf die Hormonkonzentrationen zu untersuchen, wie beispielsweise die Tageszeit auf die Sexualhormone, oder das Alter auf den Cortisolspiegel.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit befasste sich mit der Ermittlung von pädiatrischen Referenzbereichen für die Hormone Testosteron bei Jungen und Estradiol bei Mädchen für die einzelnen Pubertätsstadien sowie für Cortisol für verschiedene Abnahmezeiträume. Die Ermittlung von Referenzbereichen ist in der Pädiatrie wegen der zahlreichen Einflussfaktoren auf die Messwerte und insbesondere aufgrund des Mangels an Messwerten von gesunden Kindern schwierig.

Die Messwerte stammten von Patienten, denen in der endokrinologischen Ambulanz der Tübinger Universitätskinderklinik Blut abgenommen wurde. Es handelt sich somit nicht um eine gesunde Kohorte. Um dennoch zuverlässige Referenzbereiche ermitteln zu können, wurden in die einzelnen Kohorten nur Kinder eingeschlossen, bei denen man davon ausgehen konnte, dass ihre Erkrankung keinen Einfluss auf das jeweilige Hormon haben würde.

Die Testosteronkonzentrationen wurden mit dem spezifischen kompetitiven Festphasen-Radioimmunoassay Coat-A-Count, Total Testosterone, Siemens Health Care Diagnostics gemessen. Die Einteilung in die Pubertätsstadien erfolgte anhand des Hodenvolumens, welches mit dem Orchidometer (Prader A, 1966) gemessen wurde. Zusätzlich erfolgte durch Miteinbeziehung des LH-Spiegels eine genauere Unterscheidung zwischen dem präpubertären Stadium, in dem der LH-Wert unter 0,5 U/L liegen musste, und den pubertären Stadien, in denen der LH-Wert mindestens 0,5 U/L betragen musste. Pro Pubertätsstadium standen zur Berechnung der Referenzbereiche zwischen 28 und 66 Messwerte zur Verfügung. Es zeigte sich ein Anstieg der Testosteronkonzentration bei Jungen im Verlauf der Pubertät. Die Referenzbereiche der einzelnen Pubertätsstadien überschneiden sich zum Teil erheblich. Für Jungen mit einem Hodenvolumen unter 4 ml liegt der Referenzbereich zwischen  $< 4$  ng/dl und 14,3 ng/dl. Für Jungen im zweiten Pubertätsstadium mit einem Hodenvolumen zwischen 4 ml und unter 7 ml erstreckt sich der Referenzbereich von  $< 4$  ng/dl bis 239,3 ng/dl. Bei Jungen im Stadium 3 mit einem Hodenvolumen von 7 ml bis unter 10 ml liegt der Referenzbereich zwischen 28,7 ng/dl und 497,5 ng/dl. Jungen im Stadium 4 mit einem Hodenvolumen zwischen

10 ml und unter 15 ml haben einen Testosteronreferenzbereich von 63,9 ng/dl bis 506,9 ng/dl. Für Jungen mit vollendeter Pubertätsentwicklung und einem Hodenvolumen ab 15 ml liegt der Referenzbereich bei 168,2 ng/dl bis 741,4 ng/dl.

Für die Messung der Estradiolkonzentration diente der kompetitive Radioimmunoassay Estradiol Maia der Firma Radim. Die Einteilung der Mädchen in die Pubertätsstadien erfolgte anhand ihrer Brustentwicklung (Marshall WA und Tanner JM, 1969). Zusätzlich wurde ein Mindestalter von acht Jahren für den Pubertätsbeginn festgelegt und ein Mindestalter von neun Jahren ab dem Pubertätsstadium 3, um Mädchen mit einer Pubertas praecox sicherer auszuschließen. Die Berechnung der Referenzbereiche erfolgte anhand von 25 bis 45 Messwerten pro Pubertätsstadium, lediglich im Pubertätsstadium 2 waren es nur 15 Messwerte. Es zeigte sich ein Anstieg der Estradiolkonzentration im Laufe der Pubertät, allerdings ist auffällig, dass sogar bis ins Pubertätsstadium 3 Estradiolspiegel unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Assays von 5 pg/ml noch im Referenzbereich liegen. Es zeigten sich deutliche Überlappungen der Referenzbereiche in den verschiedenen Pubertätsstadien. Der Referenzbereich von Mädchen im Pubertätsstadium 1 erstreckt sich von < 5 pg/ml bis 11,3 pg/ml. Im Stadium 2 reicht der Referenzbereich von < 5 pg/ml bis 39 pg/ml, im Stadium 3 von < 5 pg/ml bis 54,7 pg/ml. Im Stadium 4 liegt der untere Wert des Referenzbereiches erstmals oberhalb der Nachweisgrenze des Assays. Der Referenzbereich reicht von 12 pg/ml bis 90,6 pg/ml. Bei vollendeter Pubertätsentwicklung erstreckt sich der Referenzbereich von 15,2 pg/ml bis 131 pg/ml.

Die Messung der Cortisolkonzentration erfolgte mit dem Chemilumineszenz-Immunoassay Messautomat Immulite der Firma Siemens Health Care Diagnostics. In drei Abnahmezeiträumen standen zur Berechnung der Referenzbereiche in dieser Studie zwischen 60 und 186 Messwerte zur Verfügung. In den Zeiträumen vor 8.30 Uhr bzw. ab 16.00 Uhr waren es dagegen nur acht bzw. sechs Messwerte, da diese Zeiten außerhalb der Sprechzeiten der endokrinologischen Ambulanz liegen und somit kaum Blutentnahmen zu diesen Zeiten stattfanden. Die ermittelten Referenzbereiche für diese beiden Zeiträume

sind aufgrund der geringen Anzahl an Messwerten in ihrer Aussagekraft eingeschränkt. Es zeigte sich ein Abfall der Cortisolkonzentration im Laufe des Tages. Die Referenzbereiche überschneiden sich deutlich. Vor 8.30 Uhr reicht der Referenzbereich von 6,3 µg/dl bis 28,6 µg/dl. Zwischen 8.30 Uhr und 10.29 Uhr erstreckt sich der Referenzbereich von 5,0 µg/dl bis 18,7 µg/dl. Von 10.30 Uhr bis 12.29 Uhr liegt der Referenzbereich bei 4,5 µg/dl bis 18,0 µg/dl. Zwischen 12.30 Uhr und 15.59 Uhr reicht der Referenzbereich von 4,3 µg/dl bis 18,3 µg/dl. Ab 16.00 Uhr liegt der Referenzbereich bei 4,8 µg/dl bis 22,1 µg/dl. Die geschlechts- und altersabhängigen Unterschiede der Cortisolkonzentration sowie die circadianen Schwankungen von Testosteron und Estradiol konnten in dieser Studie nicht mit einbezogen werden.

## 6. ANHANG

### 6.1 Mädchen mit vermuteter Einnahme von oralen Kontrazeptiva

Im Folgenden sind die Mädchen aufgelistet, die aufgrund einer sehr wahrscheinlichen, aber nicht dokumentierten Einnahme von oralen Kontrazeptiva aus der Kohorte ausgeschlossen wurden:

- Ein Mädchen, das aufgrund eines hypophysären Kleinwuchses mit Wachstumshormon therapiert wurde, bei dem bekannt war, dass es nur alle acht Wochen seine Periodenblutung bekommt, und dessen Estradiolwert mit 6,9 pg/ml am 04.07.2011 deutlich unter den drei Vorwerten lag, die im Zeitraum ab Oktober 2010 alle bei 30 pg/ml oder mehr gelegen haben. Zudem kann eine unregelmäßige Periodenblutung, wie sie bei diesem Mädchen vorlag, ein Grund sein, Hormonpräparate einzunehmen.
- Ein Mädchen, bei dem außer einem Wachstumshormonmangel, der mit Genotropin behandelt wurde, eine juvenile idiopathische Arthritis und eine Neurodermitis bekannt waren und dessen Estradiolwert am 29.03.2011 18 pg/ml betragen hat. Die vier Vorwerte lagen im Zeitraum ab Oktober 2007 zwischen 40 und 169 pg/ml. Ein weiterer Wert im März 2012 lag wiederum bei 103 pg/ml. Ob die Einnahme der oralen Kontrazeptiva zu diesem späteren Zeitpunkt wieder eingestellt wurde, oder wie dieser hohe Wert auf andere Weise zustande kommt, ist nicht dokumentiert. Die Tatsache, dass der einmalig so niedrige Wert von 18 pg/ml aber auf jeden Fall deutlich aus der Reihe fällt, zusammen mit den Nebendiagnosen der Patientin, über deren Aktivität zum Abnahmezeitpunkt auch nichts bekannt ist, wurde zum Anlass genommen, sie aus der Kohorte auszuschließen.
- Ein Mädchen mit einer Kolloidzyste der Hypophyse ohne Funktionseinschränkung, das am 07.02.2011 einen Estradiolwert von 12 pg/ml hatte, der im Vergleich zu dem Vorwert von 147 pg/ml im Februar des

Vorjahres deutlich niedriger war, was den Verdacht der Einnahme von oralen Kontrazeptiva nahegelegt hat.

- Ein Mädchen mit einem hypophysären Kleinwuchs, Epilepsie und einem ADHS, das am 12.04.2012 einen Estradiolspiegel von 5,5 pg/ml hatte, der somit nur knapp über der Nachweisgrenze lag und deutlich niedriger war als ein Vorwert von 134 pg/ml im April 2011, was sehr für eine Einnahme von oralen Kontrazeptiva sprach.

## 6.2 Patienten und Patientinnen mit nicht zugeordneten Diagnosen

In den folgenden Abschnitten sind die Patienten bzw. Patientinnen einzeln aufgelistet, die relevante Nebendiagnosen haben oder deren Hauptdiagnose sich nicht den in Tab. 5 (S. 33) aufgelisteten Diagnosen in der Testosteron-Kohorte bzw. den in Tab. 7 (S. 36) genannten Diagnosen der Estradiol-Kohorte bzw. den in Tab. 10 (S. 41) beschriebenen Diagnosen der Cortisol-Kohorte zuordnen ließ.

Die aufgelisteten Patienten in den drei Kohorten sind jeweils fortlaufend nummeriert. Patienten, von denen mehrere Messwerte eines Hormons stammen, sind innerhalb derselben Kohorte unter der gleichen Nummer mehrfach aufgelistet.

### 6.2.1 Testosteron-Kohorte

Pubertätsstadium 1

| Patientennummer | Diagnosen  |
|-----------------|--|
| 1               | Differenzialdiagnose familiärer Kleinwuchs oder KEV  |
| 2               | Hypophysärer Kleinwuchs, Hypothyreose, Herzvitium, psychomotorische Entwicklungsverzögerung  |
| 2               | Siehe oben   |
| 3               | Unklarer Kleinwuchs mit ossärer Komponente, Asthma   |
| 4               | Ehemaliges Frühgeborenes, Z. n. Sepsis und Asphyxie, syndromaler Kleinwuchs mit funktioneller Störung der Wachstumshormon-IGF1-Achse, Z. n. Ösophagusatresie und einseitiger Ureterabgangsstenose, Ohrmuscheldysplasie links mit Schallleitungsschwerhörigkeit und kognitiver und sprachlicher Entwicklungsverzögerung |
| 5               | Hypophysärer Kleinwuchs, Epilepsie   |

|   |  |
|---|--|
| 5 | Siehe oben                                       |
| 6 | Hypophysärer Kleinwuchs, Z. n. Orchidopexie bds. |
| 7 | Hypophysärer Kleinwuchs, Vitien                  |
| 7 | Siehe oben                                       |

#### Pubertätsstadium 2

| Patientennummer | Diagnosen   |
|-----------------|---|
| 8               | Hypophysärer Kleinwuchs, Skoliose   |
| 9               | Intrauteriner Kleinwuchs, Dextroposition Cordis, Omphalozele und Z. n. Herniotomie  |
| 10              | Hypophysärer Kleinwuchs, Z. n. Rhabdomyosarkom der Leber mit subtotaler Resektion, Polychemotherapie und Strahlentherapie, Depressionen |
| 11              | Differenzialdiagnose unklarer Kleinwuchs oder KEV   |
| 12              | Intrauteriner Kleinwuchs, primäre Hypothyreose  |
| 12              | Siehe oben  |
| 13              | Hypophysärer Kleinwuchs, Mikrozephalus  |
| 14              | Unklarer Kleinwuchs, Kurzdarmsyndrom bei Z. n. Gastroschisis mit langstreckiger Darmnekrose   |
| 15              | V. a. Hashimoto-Thyreoiditis  |
| 16              | Hypophysärer Kleinwuchs, Schwerhörigkeit, Torticollis spasticus   |
| 16              | Siehe oben  |

#### Pubertätsstadium 3

| Patientennummer | Diagnosen  |
|-----------------|--|
| 17              | Differentialdiagnose unklarer Kleinwuchs oder KEV  |
| 9               | Siehe oben   |
| 10              | Siehe oben   |
| 18              | Intrauteriner Kleinwuchs, Z. n. Hodenhochstand links   |
| 19              | Intrauteriner Kleinwuchs, Hypospadias coronaria, Z. n. Herniotomie bds., Z. n. Orchidopexie rechts |
| 19              | Siehe oben   |
| 20              | Intrauteriner Kleinwuchs, Asthma   |

#### Pubertätsstadium 4

| Patientennummer | Diagnosen  |
|-----------------|------------|
| 8               | Siehe oben |
| 8               | Siehe oben |



|    |  |
|----|--|
| 21 | Intrauteriner Kleinwuchs, Asthma, Hypothyreose, ADHS, Z. n. Battered-Child-Syndrom |
| 21 | Siehe oben   |
| 22 | Intrauteriner Kleinwuchs, Spastik  |
| 22 | Siehe oben   |
| 23 | Ossärer Kleinwuchs   |
| 16 | Siehe oben   |

#### Puertätsstadium 5

| Patientennummer | Diagnosen  |
|-----------------|--|
| 24              | V. a. Rathke-Zyste der Hypophyse ohne Funktionseinschränkung |
| 25              | Unklarer Hypertonus  |
| 26              | Hypophysärer Kleinwuchs mit Hemihypertrophie                 |

### 6.2.2 Estradiol-Kohorte

#### Pubertätsstadium 1

| Patientennummer | Diagnosen  |
|-----------------|--|
| 1               | Hashimoto-Thyreoiditis   |
| 2               | V. a. konstitutionelle Beschleunigung von Wachstum und Pubertät  |
| 3               | Hypophysärer Kleinwuchs, primäre Hypothyreose  |
| 4               | Syndromaler Hochwuchs, V. a. Sotos-Syndrom, leichte Störung der sprachlichen Entwicklung, motorische Koordinationsstörung, Z. n. OP einer Vaginalzyste |

#### Pubertätsstadium 2

| Patientennummer | Diagnosen                                     |
|-----------------|---|
| 5               | Spätnormale Pubertät, kleinnormale Körperhöhe |
| 3               | Siehe oben                                    |

#### Pubertätsstadium 3

| Patientennummer | Diagnosen   |
|-----------------|-------------|
| 3               | Siehe oben  |
| 6               | HDR-Syndrom |

|   |  |
|---|--|
| 7 | Hypophysärer Kleinwuchs, Ichthyosis congenita gravis                     |
| 8 | Unklarer Kleinwuchs, Verzögerung von Entwicklung und Pubertät, Epilepsie |
| 9 | Hypophysärer Kleinwuchs, Floating-Harbor-Syndrom, ADS                    |
| 9 | Siehe oben   |

#### Pubertätsstadium 4

| Patientennummer | Diagnosen   |
|-----------------|---|
| 10              | Hypophysärer Kleinwuchs, Z. n. Konstruktion einer Ileum-Neoblase bei Kloakenfehlbildung, Periventrikuläre Leukomalazie, Z. n. Tethered cord |
| 10              | Siehe oben  |
| 9               | Siehe oben  |
| 11              | Hashimoto-Thyreoiditis, Z. n. M. Basedow  |
| 7               | Siehe oben  |

#### Pubertätsstadium 5

| Patientennummer | Diagnosen   |
|-----------------|---|
| 7               | Siehe oben  |
| 12              | Hyperplastische Adenohypophyse ohne Dysfunktion, arterieller Hypertonus |
| 12              | Siehe oben  |
| 12              | Siehe oben  |
| 13              | Hypophysärer Kleinwuchs, Syndrom des einzelnen mittleren Schneidezahns  |
| 14              | Familiärer Hochwuchs, unklare Oligomenorrhoe                            |
| 15              | Schilddrüsenzysten, leichte Hypertonie                                  |
| 16              | Hypophysenerkrankung ausgeschlossen                                     |

### 6.2.3 Cortisol-Kohorte

Abnahmezeitraum vor 8.30 Uhr

| Patientennummer | Diagnosen                                       |
|-----------------|---|
| 1               | Hypophysärer Kleinwuchs, Hashimoto-Thyreoiditis |
| 2               | Intrauteriner Kleinwuchs, Mikrocephalus         |

Abnahmezeitraum zwischen 8.30 Uhr und 10.29 Uhr

| Patientennummer | Diagnosen   |
|-----------------|---|
| 3               | Syndromaler Kleinwuchs, Pierre-Robin-Sequenz, Innenohrschwerhörigkeit, Skoliose, Kolobom des rechten Auges, Z. n. Spontanverschluss eines offenen Ductus Arteriosus Botalli |
| 3               | Siehe oben  |
| 4               | Unklarer Kleinwuchs, bilaterale Cerebralparese, Mikrocephalus, psychomotorische Entwicklungsverzögerung, Z. n. Hüftluxation   |
| 5               | Ehemaliges Frühgeborenes, hypophysärer Kleinwuchs, Z. n. bronchopulmonaler Dysplasie, intermittierende Hyperthyreotropinämie  |
| 6               | Intrauteriner Kleinwuchs, Mikrocephalus, perizentrische Inversion des Chromosom 9, Z. n. Orchidopexie bds.  |
| 7               | Hypophysärer Kleinwuchs, Herzvitien, Hypothyreose, psychomotorische Entwicklungsverzögerung   |
| 7               | Siehe oben  |
| 8               | Intrauteriner Kleinwuchs, konnatale Fazialislähmung, psychomotorische Entwicklungsretardierung, latente Hypothyreose  |
| 9               | Inkomplette VATER-Assoziation, Ösophagusatresie, rezidivierende Nephritiden und Pankreatitiden, Z. n. Klumpfuß-Korrektur  |
| 10              | Intrauteriner Kleinwuchs, Z. n. Omphalozele und Herniotomie, Dextroposition Cordis  |
| 11              | Ullrich-Turner-Syndrom, Hashimoto-Thyreoiditis  |
| 12              | V. a. Rathke-Zyste der Hypophyse ohne Funktionseinschränkung  |
| 13              | Intrauteriner Kleinwuchs, primäre Hypothyreose,   |
| 14              | Hypergonadotroper Hypogonadismus bei Ullrich-Turner-Syndrom, Hashimoto-Thyreoiditis, rezidivierende Mittelohrentzündungen   |
| 15              | Hypophysärer Kleinwuchs, Pubertas tarda, Epilepsie  |
| 16              | Ullrich-Turner-Syndrom, mediane Halszyste, Vitiligo, Schwerhörigkeit, Fruktoseintoleranz  |
| 17              | Hypophysärer Kleinwuchs, TSH-Mangel   |
| 17              | Siehe oben  |
| 18              | Hirsutismus bei Testosteron produzierendem Tumor im rechten Ovar  |
| 19              | Hypophysärer Kleinwuchs, Epilepsie  |
| 19              | Siehe oben  |
| 20              | Hypophysärer Kleinwuchs, V. a. Hypogonadotroper Hypogonadismus  |
| 20              | Siehe oben  |
| 20              | Siehe oben  |
| 21              | Intrauteriner Kleinwuchs, Silver-Russell-ähnliche Symptomatik   |
| 22              | Intrauterine Wachstumsretardierung, Wachstumshormonmangel, makuläre Fehlbildungen unklarer Genese, Hypercholesterinämie, Z. n. M. Perthes                                   |
| 23              | Ehemaliges Frühgeborenes bei Zwillingsschwangerschaft,  |

|    |   |
|----|---|
|    | intrauteriner Kleinwuchs, Alopecia areata, Hashimoto-Thyreoiditis   |
| 24 | Ehemaliges Frühgeborenes bei Zwillingschwangerschaft, intrauteriner Kleinwuchs, Alopecia areata, Hashimoto-Thyreoiditis   |
| 24 | Siehe oben  |
| 25 | Kolloidzyste der Hypophyse ohne Funktionseinschränkung  |
| 1  | Siehe oben  |
| 1  | Siehe oben  |
| 26 | Hypophysärer Kleinwuchs, Entwicklungsverzögerung, Z. n. Herpesenzephalitis  |
| 27 | Intrauteriner Kleinwuchs, IgA-Mangel, Mikrocephalus   |
| 28 | Ullrich-Turner-Syndrom, Hashimoto-Thyreoiditis  |
| 29 | Hypophysärer Kleinwuchs, TSH-Mangel, Z. n. Hüftdysplasie bds. und M. Perthes bds.   |
| 30 | Ehemaliges Frühgeborenes bei Zwillingschwangerschaft, hypophysärer Kleinwuchs, Entwicklungsretardierung, latente Hypothyreose, Dandy-Walker-Malformation mit Shuntversorgung bei okklusivem Hydrocephalus |
| 31 | Hypophysärer Kleinwuchs, TSH-Mangel, Entwicklungsverzögerung, muskuläre Hypotonie   |
| 31 | Siehe oben  |
| 32 | Intrauteriner Kleinwuchs, Hydrocephalus mit Shuntversorgung   |
| 33 | Unklarer Kleinwuchs, familiäre SGA-Komponente, mentale Entwicklungsverzögerung, sekundärer Mikrocephalus  |
| 34 | Hypothyreose, Herzfehler  |
| 35 | Kraniopharyngeom ohne Funktionseinschränkung der Hypophyse  |
| 36 | Intrauteriner und ossärer Kleinwuchs bei Roberts-Syndrom  |
| 37 | Hypophysärer Kleinwuchs, Torticollis spasticus, Schwerhörigkeit   |

Abnahmezeitraum zwischen 10.30 Uhr und 12.29 Uhr

| Patientennummer | Diagnosen  |
|-----------------|--|
| 38              | Idiopathischer Diabetes insipidus centralis  |
| 39              | Unklarer Kleinwuchs, verzögerte Pubertät   |
| 40              | Unklarer Hochwuchs, hypogonadotroper Hypogonadismus  |
| 41              | Intrauteriner Kleinwuchs, chromosomale Auffälligkeiten, primäre Hypothyreose   |
| 42              | Intrauteriner Kleinwuchs, prämatüre Thelarche  |
| 43              | Hypophysärer Kleinwuchs, Neurodermitis   |
| 44              | Hypophysärer Kleinwuchs, V. a. Goldenhar-Syndrom, große Ohrmissbildungen links, Z. n. Korrektur einer Ösophagusatresie, kompensierte Fazialisparese links, maximale Schalleitungsschwerhörigkeit links |
| 45              | Hypoparathyreoidismus, Schallempfindungsschwerhörigkeit, V. a. HDR-Syndrom   |

|    |   |
|----|---|
| 46 | Hypophysärer Kleinwuchs, Ichthyosis congenita gravis, Vitamin D-Mangel  |
| 46 | Siehe oben  |
| 47 | Gynäkomastie, rezidivierende Bauchschmerzen, intermittierende Zephalgien  |
| 48 | Hypophysärer Kleinwuchs, Hyperandrogenämie  |
| 49 | Hypophysärer Kleinwuchs, atopische Dermatitis   |
| 50 | Intrauterine Wachstumsretardierung, hypophysärer Kleinwuchs, Mikrocephalie, primäre Enuresis nocturna, Hypothyreose   |
| 51 | KEV, rezidivierende Diarrhoe, Untergewicht  |
| 1  | Siehe oben  |
| 52 | Kein Anhalt für eine Hypophysenerkrankung   |
| 53 | 4H-Syndrom, Kleinwuchs, Pubertas tarda, Hypogonadismus, cerebrale Myelin Aufbaustörung mit Kleinhirnatrophie, grenzwertige Mikrocephalie, kognitive Entwicklungsstörung, muskuläre Hypotonie, Knick-Senkfüße bds., Gangataxie |
| 54 | Ullrich-Turner-Syndrom, Hashimoto Thyreoiditis, Z. n. Aortenisthmusstenose, Z. n. Sinusvenenthrombose   |
| 55 | Ullrich-Turner-Syndrom, Hashimoto Thyreoiditis, Extrasystolen   |
| 56 | Hypogonadismus, Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalte, Kolobom, Mikropenis, Nondescensus testis rechts, eingeschlagene Daumen bds., Hypotrophie des M. depressor anguli oris  |
| 57 | Hypergonadotroper Hypogonadismus, mentale Entwicklungsretardierung, Karyotyp 49,XXXXY, Z. n. Entfernung einer dysplastischen Niere rechts, Z. n. Orchidopexie links   |
| 58 | Gynäkomastie, Hypothyreose  |
| 59 | KEV, Testosteronmangel, Steatosis hepatis   |
| 59 | Siehe oben  |
| 60 | Konstitutionelles Untergewicht, Oligomenorrhoe  |
| 61 | CHARGE-Assoziation, Hypogonadotroper Hypogonadismus, Mikropenis, Choanalatresie, Wachstumshormonmangel, globale Entwicklungsverzögerung, Mikrocephalie, Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalte   |
| 61 | Siehe oben  |
| 62 | Intrauteriner Kleinwuchs, ehemaliges Frühgeborenes, psychomotorische Retardierung, Enuresis nocturna  |
| 63 | Pubertas tarda, familiärer Kleinwuchs, Pubertätsgynäkomastie  |
| 64 | Hypergonadotroper Hypogonadismus, kognitive Entwicklungsstörung, Aberration des Chromosom 3   |
| 65 | Idiopathischer Hypoparathyreoidismus, Absence-Epilepsie   |
| 66 | Kleinwuchs, hypophosphatämische Rachitis, leichte Nephrokalzinose   |
| 67 | Intrauteriner Kleinwuchs, Hashimoto Thyreoiditis, Innenohrschwerhörigkeit, Vitiligo   |

Abnahmezeitraum zwischen 12.30 Uhr und 15.59 Uhr

| Patientennummer | Diagnosen   |
|-----------------|---|
| 38              | Siehe oben  |
| 68              | Hypogonadotroper Hypogonadismus, fragliches Marfan-Syndrom  |
| 44              | Siehe oben  |
| 69              | Arterielle Hypertonie   |
| 26              | Siehe oben  |
| 70              | Menometrorrhagie, Pityriasis versicolor, Akne vulgaris, Café-au-lait-Flecken, V. a. Eisenmangelanämie   |
| 71              | Leichtgradiger Hirsutismus, adrenaler Hyperandrogenismus  |
| 72              | Unklarer Kleinwuchs, Situs inversus, funktionell univentrikuläres Herz, großer Vorhofseptumdefekt I, Transpositionsstellung der großen Arterien, Pulmonalstenose, Asplenie, Heterotaxie-Syndrom, Z. n. Sternumrevision bei instabilem Sternum, Z. n. Anlage einer carvo-pulmonalen Anastomose, Z. n. Resektion eines Sigmoidpolypen |
| 73              | Idiopathischer Kleinwuchs, V. a. KEV  |
| 74              | SGA-Kleinwuchs mit ossärer Komponente, Z. n. Korrektur einer Hypospadie, Weitsichtigkeit, Kryptorchismus rechts, Lese- und Rechtschreibschwäche   |
| 75              | Pseudopubertas praecox bei LH-Rezeptor-Mutation   |
| 76              | Inzidentalom ohne Funktionseinschränkung der Hypophyse  |

Abnahmezeitraum ab 16.00 Uhr

| Patientennummer | Diagnosen   |
|-----------------|---|
| 77              | Unklarer Kleinwuchs, Kurzdarmsyndrom bei Z. n. langstreckiger Darmnekrose bei Gastroschisis |

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Albers N (2010)**: Klinische Untersuchung. In: Hiort O; Danne T; Wabitsch M (Hg.): *Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie*; 64 Tabellen. Berlin, Heidelberg, New York, NY: Springer. S. 47-67.
2. **Albertsson-Wikland K; Rosberg S; Lannering B; Dunkel L; Selstam G; Norjavaara E (1997)**: Twenty-four-hour profiles of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, testosterone, and estradiol levels: a semilongitudinal study throughout puberty in healthy boys. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (2), S. 541-549.
3. **Ankarberg-Lindgren C; Norjavaara E (2004)**: Changes of diurnal rhythm and levels of total and free testosterone secretion from pre to late puberty in boys: testis size of 3 ml is a transition stage to puberty. In: *Eur. J. Endocrinol.* 151 (6), S. 747-757.
4. **Ankarberg-Lindgren C; Westphal O; Dahlgren J (2011)**: Testicular size development and reproductive hormones in boys and adult males with Noonan syndrome: a longitudinal study. In: *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 165 (1), S. 137-144. DOI: 10.1530/EJE-11-0092.
5. **Arimura C; Nozaki T; Takakura S; Kawai K; Takii M; Sudo N; Kubo C (2010)**: Predictors of menstrual resumption by patients with anorexia nervosa. In: *Eat Weight Disord* 15 (4), e226-33. DOI: 10.3275/7039.
6. **Arnaldi G; Scandali VM; Trementino L; Cardinaletti M; Appolloni G; Boscaro M (2010)**: Pathophysiology of dyslipidemia in Cushing's syndrome. In: *Neuroendocrinology* 92 Suppl 1, S. 86-90. DOI: 10.1159/000314213.
7. **Bailey D; Colantonio D; Kyriakopoulou L; Cohen AH; Chan MK; Armbruster D; Adeli K (2013)**: Marked Biological Variance in Endocrine and Biochemical Markers in Childhood: Establishment of Pediatric Reference Intervals Using Healthy Community Children from the CALIPER Cohort. In: *Clin. Chem.* 59 (9), S. 1393-1405. DOI: 10.1373/clinchem.2013.204222.
8. **Barra CB; Silva IN; Rodrigues TMB; Santos JLS; Colosimo EA (2015)**: Morning serum Basal cortisol levels are affected by age and pubertal maturation in school-aged children and adolescents. In: *Hormone research in paediatrics* 83 (1), S. 55-61. DOI: 10.1159/000369801.
9. **Binder G (2010)**: Störungen des Wachstums. In: Hiort O; Danne T; Wabitsch M (Hg.): *Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie*; 64 Tabellen. Berlin, Heidelberg, New York, NY: Springer. S. 261-281.
10. **Binder G; Schweizer R; Blumenstock G; Ferrand N (2017)**: Adrenarche in Silver-Russell Syndrome: Timing and Consequences. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 102 (11), S. 4100-4108. DOI: 10.1210/jc.2017-00874.

11. **Biro FM; Lucky AW; Huster GA; Morrison JA (1990):** Hormonal studies and physical maturation in adolescent gynecomastia. In: *J. Pediatr.* 116 (3), S. 450-455.
12. **Boyar RM; Rosenfeld RS; Kapen S; Finkelstein JW; Roffwarg HP; Weitzman ED; Hellman L (1974):** Human puberty. Simultaneous augmented secretion of luteinizing hormone and testosterone during sleep. In: *J. Clin. Invest.* 54 (3), S. 609-618. DOI: 10.1172/JC1107798.
13. **Boyar RM; Wu RH; Roffwarg H; Kapen S; Weitzman ED; Hellman L; Finkelstein JW (1976):** Human puberty: 24-hour estradiol in pubertal girls. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 43 (6), S. 1418-1421.
14. **Budziszewska B; Basta-Kaim A; Kubera M; Lasoń W (2010):** Udział czynników immunologicznych i endokrynych w etiopatogenezie ADHD. In: *Prz. Lek.* 67 (11), S. 1200-1204.
15. **Burr IM; Sizonenko PC; Kaplan SL; Grumbach MM (1970):** Hormonal changes in puberty. I. Correlation of serum luteinizing hormone and follicle stimulating hormone with stages of puberty, testicular size, and bone age in normal boys. In: *Pediatr. Res.* 4 (1), S. 25-35.
16. **Chan MK; Seiden-Long I; Aytakin M; Quinn F; Ravalico T; Ambruster D; Adeli K (2009):** Canadian Laboratory Initiative on Pediatric Reference Interval Database (CALIPER): pediatric reference intervals for an integrated clinical chemistry and immunoassay analyzer, Abbott ARCHITECT ci8200. In: *Clinical biochemistry* 42 (9), S. 885-891. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2009.01.014.
17. **Chavenet W; Crymble GG (1973):** Quality control seminar notes. East Scarborough, Ontario: Warner Chilcott Diagnostics, S. 26-27.
18. **Chrousos GP; O'Dowd L; Uryniak T; Simpson B; Casty F; Goldman M (2007):** Basal and cosyntropin-stimulated plasma cortisol concentrations, as measured by high-performance liquid chromatography, in children aged 5 months to younger than 6 years. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92 (6), S. 2125-2129. DOI: 10.1210/jc.2006-1554.
19. **Collins MT; Singer FR; Eugster E (2012):** McCune-Albright syndrome and the extraskelatal manifestations of fibrous dysplasia. In: *Orphanet J Rare Dis* 7 Suppl 1, S4. DOI: 10.1186/1750-1172-7-S1-S4.
20. **Dörr HG (1999):** Störungen der Nebennieren. In: Kruse K (Hg.): *Pädiatrische Endokrinologie*; 71 Tabellen. 2., neubearb. und erw. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme (Bücherei des Pädiaters, 97), S. 73-104.
21. **Elmlinger MW; Kühnel W; Ranke MB (2002):** Reference ranges for serum concentrations of lutropin (LH), follitropin (FSH), estradiol (E2), prolactin, progesterone, sex hormone-binding globulin (SHBG), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), cortisol and ferritin in neonates, children and young adults. In: *Clin. Chem. Lab. Med.* 40 (11), S. 1151-1160. DOI: 10.1515/CCLM.2002.202.



22. **Elmlinger MW; Kühnel W; Wormstall H; Döller PC (2005)**: Reference intervals for testosterone, androstenedione and SHBG levels in healthy females and males from birth until old age. In: *Clinical laboratory* 51 (11-12), S. 625-632.
23. **Forest MG; Cathiard AM; Bertrand JA (1973)**: Total and unbound testosterone levels in the newborn and in normal and hypogonadal children: use of a sensitive radioimmunoassay for testosterone. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 36 (6), S. 1132-1142. DOI: 10.1210/jcem-36-6-1132.
24. **Gässler N; Peuschel T; Pankau R (2000)**: Pediatric reference values of estradiol, testosterone, lutropin, follitropin and prolactin. In: *Clin. Lab.* 46 (11-12), S. 553-560.
25. **Goji K (1993)**: Twenty-four-hour concentration profiles of gonadotropin and estradiol (E2) in prepubertal and early pubertal girls: the diurnal rise of E2 is opposite the nocturnal rise of gonadotropin. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77 (6), S. 1629-1635.
26. **Goji K; Tanikaze S (1993)**: Spontaneous gonadotropin and testosterone concentration profiles in prepubertal and pubertal boys: temporal relationship between luteinizing hormone and testosterone. In: *Pediatr. Res.* 34 (2), S. 229-236. DOI: 10.1203/00006450-199308000-00026.
27. **González-Sánchez V; Moreno-Pérez O; García de Guadiana L; Sánchez-Pellicer P; Alfayate R; Mauri M; Sánchez-Payá J; Picó A (2015)**: Reference ranges for serum and salivary testosterone in young men of Mediterranean region. In: *Endocrinología y nutrición : órgano de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición* 62 (1), S. 4-10. DOI: 10.1016/j.endonu.2014.09.002.
28. **Hauffa BP (2010)**: Störungen der Geschlechtsreife. In: Hiort O; Danne T; Wabitsch M (Hg.): *Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie*; 64 Tabellen. Berlin, Heidelberg, New York, NY: Springer. S. 283-308.
29. **Hero M; Wickman S; Hanhijärvi R; Siimes MA; Dunkel L (2005)**: Pubertal upregulation of erythropoiesis in boys is determined primarily by androgen. In: *The Journal of pediatrics* 146 (2), S. 245-252. DOI: 10.1016/j.jpeds.2004.09.002.
30. **Hill EE; Eisenmann JC; Gentile D; Holmes ME; Walsh D (2011)**: The association between morning cortisol and adiposity in children varies by weight status. In: *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 24 (9-10), S. 709-713.
31. **Hoffmann RG (1963)**: Statistics in the practice of medicine. In: *JAMA* 185, S. 864-873.
32. **Janfaza M; Sherman TI; Larmore KA; Brown-Dawson J; Klein KO (2006)**: Estradiol levels and secretory dynamics in normal girls and boys as determined by an ultrasensitive bioassay: a 10 year experience. In: *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 19 (7), S. 901-909.

33. **Jonetz-Mentzel L; Wiedemann G (1993):** Establishment of reference ranges for cortisol in neonates, infants, children and adolescents. In: *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 31 (8), S. 525-529.
34. **Judd HL; Parker DC; Siler TM; Yen SS (1974):** The nocturnal rise of plasma testosterone in pubertal boys. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38 (4), S. 710-713.
35. **Juniewicz PE; Johnson BH; Bolt DJ (1987):** Effect of adrenal steroids on testosterone and luteinizing hormone secretion in the ram. In: *J. Androl.* 8 (3), S. 190-196.
36. **Karaman MI; Kaya C; Caskurlu T; Guney S; Ergenekon E (2005):** Measurement of pediatric testicular volume with Prader orchidometer: comparison of different hands. In: *Pediatr. Surg. Int.* 21 (7), S. 517-520. DOI: 10.1007/s00383-005-1470-1.
37. **Kerrigan JR; Veldhuis JD; Leyo SA; Iranmanesh A; Rogol AD (1993):** Estimation of daily cortisol production and clearance rates in normal pubertal males by deconvolution analysis. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 76 (6), S. 1505-1510. DOI: 10.1210/jcem.76.6.8501158.
38. **Khairullah A; Klein LC; Ingle SM; May MT; Whetzel CA; Susman EJ; Paus T (2014):** Testosterone trajectories and reference ranges in a large longitudinal sample of male adolescents. In: *PloS one* 9 (9), e108838. DOI: 10.1371/journal.pone.0108838.
39. **Klein KO; Baron J; Colli MJ; McDonnell DP; Cutler GB (1994):** Estrogen levels in childhood determined by an ultrasensitive recombinant cell bioassay. In: *J. Clin. Invest.* 94 (6), S. 2475-2480. DOI: 10.1172/JCI117616.
40. **Klein KO; Mericq V; Brown-Dawson JM; Larmore KA; Cabezas P; Cortinez A (1999):** Estrogen levels in girls with premature thelarche compared with normal prepubertal girls as determined by an ultrasensitive recombinant cell bioassay. In: *J. Pediatr.* 134 (2), S. 190-192.
41. **Knutsson U; Dahlgren J; Marcus C; Rosberg S; Brönnegård M; Stierna P; Albertsson-Wikland K (1997):** Circadian cortisol rhythms in healthy boys and girls: relationship with age, growth, body composition, and pubertal development. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (2), S. 536-540.
42. **Konforte D; Shea JL; Kyriakopoulou L; Colantonio D; Cohen AH; Shaw J; Bailey D; Chan MK; Armbruster D; Adeli K (2013):** Complex biological pattern of fertility hormones in children and adolescents: a study of healthy children from the CALIPER cohort and establishment of pediatric reference intervals. In: *Clinical chemistry* 59 (8), S. 1215-1227. DOI: 10.1373/clinchem.2013.204123.

43. **Kristesashvili J; Chanukvadze D (2011):** [Correlations between clinical signs and hormonal parameters in young women with hirsutism]. In: *Georgian Med News* 11 (200), S. 30-35.
44. **Kulasingam V; Jung BP; Blasutig IM; Baradaran S; Chan MK; Aytakin M; Colantonio D; Adeli K (2010):** Pediatric reference intervals for 28 chemistries and immunoassays on the Roche cobas 6000 analyzer--a CALIPER pilot study. In: *Clinical biochemistry* 43 (13-14), S. 1045-1050. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2010.05.008.
45. **Largo RH; Prader A (1983):** Pubertal development in Swiss boys. In: *Helv Paediatr Acta* 38 (3), S. 211-228.
46. **Lee PA; Jaffe RB; Midgley AR (1974):** Serum gonadotropin, testosterone and prolactin concentrations throughout puberty in boys: a longitudinal study. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 39 (4), S. 664-672. DOI: 10.1210/jcem-39-4-664.
47. **Lou X; Duan G; Chen J; Zhou Y (2006):** Study on the level changes of obesity-associated factors and puberty-associated hormones and their relationship between obese and normal 13 years old children. In: *Wei Sheng Yan Jiu* 35 (4), S. 468-471.
48. **Marshall WA; Tanner JM (1969):** Variations in pattern of pubertal changes in girls. In: *Arch. Dis. Child.* 44 (235), S. 291-303.
49. **Marshall WA; Tanner JM (1970):** Variations in the pattern of pubertal changes in boys. In: *Arch. Dis. Child.* 45 (239), S. 13-23.
50. **Mitamura R; Yano K; Suzuki N; Ito Y; Makita Y; Okuno A (1999):** Diurnal rhythms of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and testosterone secretion before the onset of male puberty. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (1), S. 29-37.
51. **Norjavaara E; Ankarberg C; Albertsson-Wikland K (1996):** Diurnal rhythm of 17 beta-estradiol secretion throughout pubertal development in healthy girls: evaluation by a sensitive radioimmunoassay. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81 (11), S. 4095-4102.
52. **Parker DC; Judd HL; Rossman LG; Yen SS (1975):** Pubertal sleep-wake patterns of episodic LH, FSH and testosterone release in twin boys. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 40 (6), S. 1099-1109. DOI: 10.1210/jcem-40-6-1099.
53. **Prader A (1966):** Testicular size: assessment and clinical importance. In: *Triangle* 7 (6), S. 240-243.
54. **Reed AH; Henry RJ; Mason WB (1971):** Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range. In: *Clinical chemistry* 17 (4), S. 275-284.
55. **Riepe FG (2010):** Nebenniere. In: Hiort O; Danne T; Wabitsch M (Hg.): *Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie* ; 64 Tabellen. Berlin, Heidelberg, New York, NY: Springer. S. 365-390.

56. **Roberts WL; Rockwood, Alan L; Bunker AM; Kushnir MM; Meikle AW (2010)**: Limitations of the Hoffman approach to determine pediatric reference intervals for two steroids. In: *Clinical biochemistry* 43 (10-11), 933-4; author reply 935. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2010.04.064.
57. **von Schnakenburg K; Bidlingmaier F; Knorr D (1980)**: 17-hydroxyprogesterone, androstenedione, and testosterone in normal children and in prepubertal patients with congenital adrenal hyperplasia. In: *European journal of pediatrics* 133 (3), S. 259-267.
58. **Siemensma EPC; van Alfen-van der Velden AAEJ; Otten BJ; Laven JS; Hokken-Koelega AC (2012)**: Ovarian function and reproductive hormone levels in girls with Prader-Willi syndrome: a longitudinal study. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97 (9), E1766-73. DOI: 10.1210/jc.2012-1595.
59. **Sizonenko PC; Paunier L (1975)**: Hormonal changes in puberty III: Correlation of plasma dehydroepiandrosterone, testosterone, FSH, and LH with stages of puberty and bone age in normal boys and girls and in patients with Addison's disease or hypogonadism or with premature or late adrenarche. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 41 (5), S. 894-904.
60. **Solberg HE (2004)**: The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. The RefVal program. In: *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 42 (7), S. 710-714. DOI: 10.1515/CCLM.2004.121.
61. **Soldin OP; Hoffman EG; Waring MA; Soldin SJ (2005)**: Pediatric reference intervals for FSH, LH, estradiol, T3, free T3, cortisol, and growth hormone on the DPC IMMULITE 1000. In: *Clin. Chim. Acta* 355 (1-2), S. 205-210. DOI: 10.1016/j.cccn.2005.01.006.
62. **Soldin SJ; Murthy JN; Agarwalla PK; Ojeifo O; Chea J (1999)**: Pediatric reference ranges for creatine kinase, CKMB, Troponin I, iron, and cortisol. In: *Clin. Biochem.* 32 (1), S. 77-80.
63. **Stárka L; Dusková M; Hill M (2008)**: Dihydrotestosterone and testosterone throughout the life span of Czech men. In: *Neuro endocrinology letters* 29 (2), S. 201-204.
64. **Taieb J; Mathian B; Millot F; Patricot MC; Mathieu E; Queyrel N; Lacroix I; Somma-Delpero C; Boudou P (2003)**: Testosterone measured by 10 immunoassays and by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry in sera from 116 men, women, and children. In: *Clinical chemistry* 49 (8), S. 1381-1395.
65. **Tanner JM; Whitehouse RH (1976)**: Clinical longitudinal standards for height, weight, height velocity, weight velocity, and stages of puberty. In: *Arch. Dis. Child.* 51 (3), S. 170-179.
66. **Theintz G; Savage MO (1982)**: Growth and pubertal development in five boys with Noonan's syndrome. In: *Arch. Dis. Child.* 57 (1), S. 13-17.

67. **de Weerth C; Zijl Robbert H; Buitelaar JK (2003):** Development of cortisol circadian rhythm in infancy. In: *Early Hum. Dev.* 73 (1-2), S. 39-52.
68. **Wikström AM; Dunkel L (2008):** Testicular function in Klinefelter syndrome. In: *Horm. Res.* 69 (6), S. 317-326. DOI: 10.1159/000117387.
69. **Wilson CA; Heinrichs C; Larmore KA; Craen M; Brown-Dawson J; Shaywitz S et al. (2003):** Estradiol levels in girls with Turner's syndrome compared to normal prepubertal girls as determined by an ultrasensitive assay. In: *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 16 (1), S. 91-96.
70. **Zachmann M; Prader A; Kind HP; Häfliger H; Budliger H (1974):** Testicular volume during adolescence. Cross-sectional and longitudinal studies. In: *Helv Paediatr Acta* 29 (1), S. 61-72.
71. **Zec I; Kučak I; Begčević I; Simundić AM; Tišlarić-Medenjak D; Megla ZB; Vrkić N (2012):** Reference intervals for reproductive hormones in prepubertal children on the automated Roche cobas e 411 analyzer. In: *Clinical biochemistry* 45 (15), S. 1206-1212. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2012.05.019.
72. **Zhai L; Liu J; Zhao J; Liu J; Bai Y; Jia L; Yao X (2015):** Association of Obesity with Onset of Puberty and Sex Hormones in Chinese Girls: A 4-Year Longitudinal Study. In: *PloS one* 10 (8), e0134656. DOI: 10.1371/journal.pone.0134656.

## ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Diese Dissertation mit dem Titel

### **Ermittlung von pädiatrischen Referenzwerten für die Analyte Testosteron, Estradiol und Cortisol (Immunoassay)**

wurde an der Universitätskinderklinik in Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. med. G. Binder durchgeführt. Ich, Anna Janina Zehr, habe keine Hilfe Dritter oder andere unzulässige Hilfsmittel in Anspruch genommen. Die aus anderen Quellen übernommenen Inhalte sind als solche gekennzeichnet. Ich versichere, dass ich keine Quellen als Grundlage des Textes verwendet habe, die nicht im Literaturverzeichnis aufgeführt sind.

Die Daten wurden von Frau K. Weber herausgesucht. Meine Aufgabe bestand darin, die Daten heraus zu filtern, die zur Ermittlung der Referenzwerte geeignet waren. In schwierigen Fällen fand diese Entscheidung in Rücksprache mit Prof. Dr. med. G. Binder statt. Die statistische Auswertung erfolgt selbstständig durch mich nach einem Beratungsgespräch am Institut für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie bei der Diplomstatistikerin Frau A. Naumann.

Ich habe bisher noch nicht den Grad eines Dr. med. erlangt.

---

Ort, Datum

---

Anna Janina Zehr

## DANKSAGUNG

Ich möchte herzlich Prof. Dr. med. G. Binder danken, der mich die ganze Zeit ausgezeichnet als Doktorandin betreute, stets Antworten auf meine Fragen geben konnte und wertvolle Tipps für mich hatte.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Karin Weber im Hormonlabor, die mir die Daten sowie Informationsmaterial zu den Assays zur Verfügung stellte, immer Zeit für mich hatte und mir geduldig alle meine Fragen beantwortete und außerdem Teile meiner Doktorarbeit Korrektur gelesen hat. Danke dem gesamten Team des Hormonlabors, das mich herzlich aufgenommen hat. Ich habe mich von Anfang an sehr willkommen gefühlt und hatte Spaß daran, Einblicke in die Laborarbeit zu bekommen und die Funktionsweise der Immunoassays praktisch kennenzulernen.

Danke dem Team der endokrinologischen Ambulanz dafür, dass ich im Rahmen einer Famulatur den Arbeitsalltag in der endokrinologischen Sprechstunde kennenlernen durfte. So habe ich viele Patienten und Krankheitsbilder persönlich gesehen und die Daten, die in der Dissertation ausgewertet wurden, haben für mich „ein Gesicht“ bekommen.

Danke an Frau Aline Naumann, Diplomstatistikerin, mit der Prof. Dr. med. G. Binder und ich ausführlich die statistische Auswertung der Daten besprochen haben. Außerdem profitierte ich sehr von ihren Seminaren über das Programm JMP, an denen ich teilgenommen habe, sodass mir bei der Dissertation der Umgang mit dem Programm bereits vertraut war.

Ein herzlicher Dank gilt meiner Familie und meinem Partner, die mich in der langen und nicht immer leichten Zeit des Studiums und der Promotion unterstützt und mir oft Mut zum Durchhalten gemacht haben, wenn ich ihn am dringendsten brauchte. Danke für das geduldige Korrekturlesen, die wertvollen Verbesserungsvorschläge und die guten Tipps bei der Formatierung.

Danke an meine gute Freundin Bettina Becker, die während des ganzen Studiums eine wunderbare Begleiterin war, zu der ich mit all meinen Fragen kommen konnte und die mir stets weitergeholfen hat.