

# Retrospektive Analyse des GC-MS Harnsteroidmetaboloms bei Säuglingen und Kleinkindern mit 21-Hydroxylase- Mangel

Inauguraldissertation  
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Friedrich, Clemens  
aus Großenhain

Gießen 2024

# Retrospektive Analyse des GC-MS Harnsteroidmetaboloms bei Säuglingen und Kleinkindern mit 21-Hydroxylase- Mangel

Inauguraldissertation  
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Friedrich, Clemens  
aus Großenhain

Gießen 2024

**Aus dem Fachbereich Medizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen**

Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin,  
Abteilung für Allgemeinpädiatrie und Neonatologie

Gutachter: Prof. Dr. Stefan A. Wudy

Gutachter: Prof. Dr. Tilman Borggrefe

Tag der Disputation: 28.10.2025

# INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	III
TABELLENVERZEICHNIS .....	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	VIII
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Adrenogenitale Syndrom.....	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Steroidhormonbiosynthese.....	3
1.1.3 Pathophysiologie .....	7
1.1.4 Epidemiologie .....	8
1.1.5 Symptome .....	8
1.1.6 Diagnostik.....	11
1.1.7 Therapie .....	13
<b>2 ZIELSETZUNG .....</b>	<b>14</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>15</b>
3.1 Studiendesign .....	15
3.2 Ethische Evaluation .....	16
3.3 Datenerhebung.....	16
3.3.1 Patientenkollektiv.....	18
3.3.2 Laboranalyse .....	21
3.3.3 GC-MS-Harnsteroidmetabolom-Analyse .....	25
3.4 Methoden.....	28
3.4.1 Datenverarbeitung, -aufbereitung und statistische Analyse .....	29
<b>4 ERGEBNISSE.....</b>	<b>37</b>
4.1 Deskriptiver Teil.....	37
4.1.1 Beschreibung des Patientenkollektivs.....	37
4.1.2 Beschreibung der Steroidmetabolite im Verlauf .....	46
4.2 Clusteranalyse des Patientenkollektivs .....	56
4.3 ROC-Analyse.....	65
4.4 Assoziation zwischen Steroidkonzentration und Wachstumsgeschwindigkeit.....	69

<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>72</b>
5.1	Probanden und Methoden	73
5.1.1	Probanden und Probematerial	73
5.1.2	Analysemethoden	73
5.2	Wachstum im Kontext der Therapie	75
5.3	Das Steroidmetabolom von Kindern mit AGS	77
5.4	Beurteilung der Therapie mittels Clusteranalyse	80
5.4.1	Vergleich der Steroidkonzentration unter dem Kriterium der Wachstumsgeschwindigkeit in SDS	84
5.5	Limitationen der Arbeit	85
5.6	Ausblick	86
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>89</b>
	LITERATURVERZEICHNIS	XII
	ANHANG	XX
	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	LIX
	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	LX
	DANKSAGUNG	LXI

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 - Schematischer Überblick über den physiologischen Syntheseweg der Steroidhormone.

Abb. 2 - Baumdiagramm zur Struktur der untersuchten Patientengruppen.

Abb. 3 - Schematischer Überblick über das Prinzip der GC-MS, übernommen aus Wudy et al., 2017, S.6.

Abb. 4 - Gauß-Kurven (oben) und Box-Whisker-Plots (unten) der Daten, hinsichtlich der Verteilung ihrer Steroidmetabolite (links) und Proben (rechts).

Abb. 5 - Box-Whisker-Plot der Körpergröße (SDS) unterschieden nach Alter (in Jahren), unterteilt nach männlichem (blau) und weiblichem (rot) Geschlecht (n = 60).

Abb. 6 - Box-Whisker-Plot des BMI (SDS), unterschieden nach Alter (in Jahren), unterteilt nach männlichem (blau) und weiblichem (rot) Geschlecht (n = 60).

Abb. 7 – Box-Whisker-Plot der Hydrocortison Dosierung pro Tag (in mg/m<sup>2</sup>/d), unterschieden nach Alter (in Jahren) unterteilt nach männlichem (blau) und weiblichem (rot) Geschlecht (n = 68).

Abb. 8 - Box-Whisker-Plot der Fludrocortison Dosierung pro Tag (in µg/m<sup>2</sup>/d), unterschieden nach Alter (in Jahren) unterteilt nach männlichem (blau) und weiblichem (rot) Geschlecht (n = 68).

Abb. 9 - Box-Whisker-Plot zu An (Androsteron) (5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on) (in µg/l), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).

Abb. 10 - Box-Whisker-Plot zu 11-OH-An (11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron) (5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -diol-17-on) (in µg/l), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).

Abb. 11 - Box-Whisker-Plot zu Po-5b,3a ( $17\alpha$ -OH-Pregnanolon) ( $5\beta$ -Pregnan- $3\alpha,17\alpha$ -diol-20-on) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).

Abb. 12 - Box-Whisker-Plot zu PT (Pregnantriol) ( $5\beta$ -Pregnan- $3\alpha,17\alpha,20\alpha$ -triol) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).

Abb. 13 - Box-Whisker-Plot zu 11-O-PT (11-Ketopregnanetriol) ( $5\beta$ -Pregnan- $3\alpha,17\alpha,20\alpha$ -triol-11-on) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).

Abb. 14 - Box-Whisker-Plot zu THE (Tetrahydrocortison) ( $5\beta$ -Pregnan- $3\alpha,17\alpha,21$ -triol-11,20-dion) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).

Abb. 15 - Box-Whisker-Plot zu THF (Tetrahydrocortisol) ( $5\beta$ -Pregnan- $3\alpha,11\beta,17\alpha,21$ -tetrol-20-on) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).

Abb. 16 – Heatmap-Darstellung der einzelnen Steroidmetabolite inkl. Ratios von 60 Patienten mit AGS infolge eines 21-Hydroxylasemangels.

Abb. 17 - 2-D-Score-Plot der ausgewählten Komponenten, ausgehend von der sPLS-DA-Analyse der 3 Cluster.

Abb. 18 - 19 – Loading Plots der Komponenten 1 und 2, ausgehend von der sPLS-DA gestützten Analyse der 3 Cluster.

Abb. 20 - ROC Kurve mit AUC-Wert (links) des Steroidmetabolits 11-O-PT.

Abb. 21 - Box-Whisker-Plot der 11-O-PT-Konzentration (rechts) zwischen Cluster 1 (rot) und 2 (grün).

Abb. 22 - ROC Kurve mit AUC-Wert (links) des Steroidmetabolits Pregnantriol.

Abb. 23 - Box-Whisker-Plot der Pregnantriol-Konzentration (rechts) zwischen Cluster 1 (rot) und 2 (grün).

Abb. 24 - ROC Kurve mit AUC-Wert (links) der Ratio 11-O-PT/THE.

Abb. 25 - Box-Whisker-Plot der 11-O-PT/THE-Konzentration (rechts) zwischen Cluster 1 (rot) und 2 (grün).

Abb. 26 - ROC Kurve mit AUC-Wert (links) des Steroidmetabolits 11-OH-An.

Abb. 27 - Box-Whisker-Plot der 11-OH-An-Konzentration (rechts) zwischen Cluster 2 (rot) und 3 (grün).

Abb. 28 - ROC Kurve mit AUC-Wert (links) der Ratio 11-OH-An/THE.

Abb. 29 - Box-Whisker-Plot der 11-OH-An/THE-Konzentration (rechts) zwischen Cluster 2 (rot) und 3 (grün).

Abb. 30 - ROC Kurve mit AUC-Wert (links) des Steroidmetabolits PT.

Abb. 31 - Box-Whisker-Plot der 11-O-PT-Konzentration (rechts) zwischen Cluster 2 (rot) und 3 (grün).

Abb. 32 - Box-Whisker-Plot zu 11-OH-An/THE, unabhängig des Geschlechts in der Altersgruppe von 1 Jahr, unterschieden nach der Wachstumsgeschwindigkeit (HV-SDS) (n = 14).

Abb. 33 - Box-Whisker-Plot zu 11-OH-An (in µg/l), unabhängig des Geschlechts in der Altersgruppe von 1 Jahr, unterschieden nach der Wachstumsgeschwindigkeit (HV-SDS) (n = 14).

Abb. 34 - Box-Whisker-Plot zu PT (in µg/l), unabhängig des Geschlechts in der Altersgruppe von 1 Jahr, unterschieden nach der Wachstumsgeschwindigkeit (HV-SDS) (n = 14).

## TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1 – Zusammensetzung der Patientengruppe „AGS-Steroide“ von 0 bis  $\leq 4$  Jahren hinsichtlich der Anzahl an Probanden pro Altersgruppe (N) sowie des Anteils (in %), ohne Berücksichtigung des Geschlechts (J+M) als auch unterschieden nach Jungen (J) und Mädchen (M).

Tab. 2 – Zusammensetzung der Patientengruppe „AGS-Wachstum“ von 0 bis  $\leq 4$  Jahren hinsichtlich der Anzahl an Probanden pro Altersgruppe (N) sowie des Anteils (in %), ohne Berücksichtigung des Geschlechts (J+M) als auch unterschieden nach Jungen (J) und Mädchen (M).

Tab. 3 – Urinsteroidmetabolite und Vorläufer-Hormone (28).

Tab. 4 - ausgewertete Urinsteroidmetabolite mit Trivialnamen, Abkürzungen und systematischem Namen (100).

Tab. 5 - Übersicht der Wachstumsparameter der untersuchten männlichen und weiblichen Probanden (Größe, Größe (SDS), Gewicht, BMI, BMI (SDS) (Median (IQR))).

Tab. 6 - Übersicht der Wachstumsparameter der untersuchten männlichen Probanden (Größe, Größe (SDS), Gewicht, BMI, BMI (SDS) (Median (IQR))).

Tab. 7 - Übersicht der Wachstumsparameter der untersuchten weiblichen Probanden (Größe, Größe (SDS), Gewicht, BMI, BMI (SDS) (Median (IQR))).

Tab. 8 - Übersicht der Medikation aller untersuchten Probanden (Hydrocortison-Tagesdosis, Fludrocortison-Tagesdosis, BSA (Median (IQR))).

Tab. 9 - Übersicht der Medikation aller untersuchten männlichen Probanden (Hydrocortison-Tagesdosis, Fludrocortison-Tagesdosis, BSA (Median (IQR))).

Tab. 10 - Übersicht der Medikation aller untersuchten weiblichen Probanden (Hydrocortison-Tagesdosis, Fludrocortison-Tagesdosis, BSA (Median (IQR))).

Tab. 11 Androgen-Metabolit-Konzentrationen des untersuchten Patientenkollektivs unter Behandlung mit Hydrocortison und Fludrocortison.

Tab. 12 – log. 17-OHP-Metabolit-Konzentrationen des untersuchten Patientenkollektivs unter Behandlung mit Hydrocortison und Fludrocortison.

Tab. 13 – log. Cortisol-Metabolit-Konzentrationen des untersuchten Patientenkollektivs.

Tab. 14 - K-means-Cluster-Einteilung der Probanden.

Tab. 15 – Urinsteroidmetabolit-Konzentrationen und Urinsteroid-Ratios der mittels Metabotypisierung in 3 Cluster gruppierten Daten von 60 Probanden mit AGS infolge eines 21-Hydroxylasemangels.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
♀	weiblich
♂	männlich
11-OH-An	11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron
11-O-PT	Pregnantriolon
17-OHP	17-Hydroxyprogesteron
11oxC19	11-oxygenierte Androgene
A5T-16a	Androstentriol-16 $\alpha$
a-THF	5 $\alpha$ -Tetrahydrocortisol
a.e.	am ehesten
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
AGS	Adrenogenitales Syndrom
AKR1C2/4	Aldo-keto reductase family 1 member C2/4
An	Androsteron
AUC	Area under the Curve („Fläche unter der Kurve“)
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Body Surface Area (Körperoberfläche)
bzw.	beziehungsweise
C18, C19, C21	organische Verbindung mit 18, 19 bzw. 21 Kohlenstoffatomen
CAH	Congenital adrenal hyperplasia
Cholesterol	Cholesterin

CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DOC	Deoxycorticosteron
Et	Etiocholanolon
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
H-SDS	Height-SDS (Körpergröße in SDS)
HC	Hydrocortison
HSD	Honestly significant difference (Wahrhaftig signifikanter Unterschied)
HSD3B2	3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
HV	Height Velocity (Wachstumsgeschwindigkeit)
inkl.	inklusive
IQR	Interquartile Range (Interquartilsabstand)
J+M	Jungen und Mädchen
J	Jungen
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie-Tandem- Massenspektrometrie
LOD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
M	Mädchen
Metabolit	Stoffwechselprodukt
Metabotypisierung	Analyse individueller Metabolitprofile zur Identifizierung metabolischer Muster
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Probanden
NWG	Nachweisgrenze
NNR	Nebennierenrinde

UKGM	Universitätsklinikum Gießen und Marburg
P450scc	P450-Side-Chain-Cleavage (Cholesterin-Monooxygenase)
PCOS	Polyzystisches Ovarialsyndrom
Peak	(spitzes) Maximum im Verlauf einer Kurve
Po-5a,3a	17-Hydroxyallopregnanolon
Po-5b,3a	17-Hydroxypregnanolon
PT	Pregnantriol
Ratio	Quotient
ROC	Receiver operating characteristic (Grenzwertoptimierungskurve)
SD	Standardabweichung
SDS	Standard Deviation Score („Robuste Standardabweichung“)
SIM-Modus	„selected ion monitoring“-Modus
sog.	sogenannte
sPLS-DA	sparse partial least square discriminant analysis („Partielle Kleinstquadrat-Diskriminanzanalyse“)
StAR-Protein	Steroidogenic Acute Regulatory-Protein („Steroidogenes akut regulatorisches“ Protein)
Tab.	Tabelle
THE	Tetrahydrocortison
THF	Tetrahydrocortisol
vs.	versus
z-Score	Standardabweichungsscore
zw.	zwischen

**Anmerkung:**

Das in der folgenden Arbeit gewählte generische Maskulinum bezieht sich zugleich auf Personen jeglichen Geschlechts.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das Adrenogenitale Syndrom

### 1.2 Definition

Bei einem Adrenogenitalen Syndrom, zusammengesetzt aus dem griechischen Wort „Adreno“ (Nebenniere) und dem lateinischen Wort „Genitale“, handelt es sich um eine Gruppe autosomal-rezessiv vererbter Erkrankungen (72).

Ausgangspunkt ist eine Mutation in einem von sieben Enzymen der Cortisolbiosynthese. Zu etwa 90–95 % erfolgt diese im *21-Hydroxylase-Gen (CYP21A2)* und führt zu einem Mangel an 21-Hydroxylase, einem Schlüssel-Enzym zur Bildung von Cortisol und Aldosteron (10, 70, 72, 92).

Dies resultiert in einer inadäquaten Glukokortikoid- und Mineralokortikoidproduktion und zugleich einer Hyperplasie der Nebennierenrinde. Diese Organvergrößerung geht mit einem Überschuss an männlichen Sexualhormonen, den Androgenen, einher (53, 68).

Weitaus seltener, in etwa 5–8 % der Fälle, finden sich Defekte der 11 $\beta$ -Hydroxylase (*CYP11B1*) oder in etwa 1 % aller Fälle Defekte der 17 $\alpha$ -Hydroxylase (*CYP17A1*) (10). Äußerst selten sind Gene mutiert, welche Enzyme wie die 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (*HSD3B2*), die P450 Side-Chain-Cleavage (*P450scc (CYP11A1)*), die P450-Oxidoreduktase (*POR*) oder das StAR-Protein (*STAR*) kodieren (10, 37).

Nachfolgend wird ausschließlich der häufigste Enzym-Defekt, der 21-Hydroxylase-Mangel, betrachtet. Die Bezeichnung AGS wird fortan synonym für ein Adrenogenitales Syndrom aufgrund eines 21-Hydroxylase-Mangels verwendet.

Unterschieden werden zwei Formen des Adrenogenitalen Syndroms (AGS): das klassische AGS mit und ohne Salzverlustsyndrom sowie das nicht-klassische AGS. Das klassische AGS tritt innerhalb der ersten 4 Lebenswochen auf, während sich das nicht-klassische AGS erst nach der Neonatalperiode manifestiert.

Das klassische AGS mit Salzverlustsyndrom betrifft etwa 75 % der Fälle und ist durch einen Überschuss an Androgenen, einen Mangel des Mineralokortikoids Aldosteron sowie Gedeihstörungen charakterisiert (72). Durch den Mangel an Aldosteron kann es zu Elektrolytentgleisungen kommen, die unbehandelt in potenziell tödlich verlaufende

Salzverlustkrisen münden können (72). Der bereits pränatal bestehende Überschuss an männlichen Sexualhormonen führt zudem bei erkrankten weiblichen Patienten zu einem virilisierten, also vermännlichten, äußeren Genital (72, 92).

Beim einfach virilisierenden AGS, welches auch als klassisches AGS ohne Salzverlust bezeichnet wird, ist die Aldosteronproduktion adäquat, die Cortisolbiosynthese jedoch eingeschränkt (76). Aufgrund der intakten Aldosteronproduktion treten bei dieser AGS-Form keine Elektrolytentgleisungen auf (76).

Auch hier kommt es zu einem Androgen-Überschuss und damit bei Mädchen, wie beim klassischen AGS mit Salzverlustsyndrom, zu einem virilisierten äußeren Genital. Meist kann die Diagnose bei weiblichen Patienten daher unmittelbar nach Geburt gestellt werden (76). Da Jungen nicht diese charakteristischen Auffälligkeiten aufweisen, vergehen bis zur Diagnosestellung nicht selten mehrere Jahre (76).

Beim nicht-klassischen AGS variiert die Stärke der Symptomatik in Abhängigkeit vom Ausmaß des Androgen-Überschusses. Diese reicht von leichten Symptomen wie einer verfrühten Pubarche oder Akne bis hin zu einem völlig asymptomatischen Verlauf (35, 44).

### 1.3 Steroidhormonbiosynthese

Alle Steroide der Nebennierenrinde (NNR) werden De-novo, d.h. neu synthetisiert und sofort sezerniert, ohne eine Möglichkeit der Speicherung (84). Um die Synthese so effizient wie möglich zu gestalten, ist die NNR in drei verschiedene Zonen unterteilt, wovon jede eine ganz spezifische Enzymausstattung besitzt (84). Dabei werden die Mineralokortikoide in der Zona glomerulosa, die Glukokortikoide in der Zona fasciculata und die Sexualhormone in der innersten Schicht, der Zona reticularis, synthetisiert.

Im ersten Schritt der Steroidhormonbiosynthese (Abb. 1) wird Cholesterin (Cholesterin) durch das steroidogene akut regulatorische (*StAR*) Protein zur inneren Mitochondrienmembran transportiert (47). Dort erfolgt die Umwandlung von Cholesterin zu Pregnenolon (C21-Verbindung) mittels des Enzyms P450<sub>scc</sub> (*CYP11A1*) (47, 92). Pregnenolon dient dabei als Ausgangsverbindung der weiteren Syntheseschritte der Steroidhormonbiosynthese, wobei sich diese in einen Aldosteron-, Cortisol- und Androgen-Syntheseweg aufgliedert (92).

Für die Aldosteron-Synthese wird zunächst Pregnenolon über die 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase zu Progesteron umgewandelt (43, 92). Die weitere Umwandlung von Progesteron zu 11-Deoxycorticosteron (DOC) erfolgt über die 21-Hydroxylase (*CYP21A2*) (43, 92). Die Aldosteron-Synthase (*CYP11B2*) katalysiert anschließend die folgenden drei Schritte über Corticosteron und 18-Hydroxycorticosteron zu Aldosteron (43, 92).

Die Cortisol-Synthese startet mit der Umwandlung von Pregnenolon zu 17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon über die 17 $\alpha$ -Hydroxylase (*CYP17A1*) im Endoplasmatischen Retikulum von Zona fasciculata und reticularis (101). Dieses 17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon wird dann im nächsten Schritt über die 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase zu 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron umgesetzt (92). Die weitere Umwandlung hin zu Cortisol erfolgt im Mitochondrium. Zunächst vermittelt durch die 21-Hydroxylase (*CYP21A2*) zu 11-Deoxycortisol und dann über die 11 $\beta$ -Hydroxylase (*CYP11B2*) zu Cortisol (92).

Das im ersten Schritt der Cortisol-Synthese entstandene 17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon dient auch als Ausgangssubstanz für die Androgen-Synthese in der Zona reticularis (92). Hierbei sind verschiedene Synthesewege beschrieben. Zu nennen sind der  $\Delta^5$  und  $\Delta^4$  Syntheseweg, der Syntheseweg der 11-oxygenierten Androgene, der auch als 11 $\beta$ -Hydroxyandrostenedione-Pathway bezeichnet wird, sowie der sogenannte Backdoor-Pathway (18, 66).

Der  $\Delta^5$  Syntheseweg stellt den primären Weg der Androgen-Synthese dar (21, 32). Dieser beginnt mit der Umwandlung von  $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon zu Dehydroepiandrosteron (DHEA) über die  $17\alpha$ -Hydroxylase/  $17, 20$ -Lyase (*CYP17A1*) (21, 92). Die  $3\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (*HSD3B2*) katalysiert anschließend die Umwandlung von DHEA zu Androstendion (92). Dem schließt sich die Umwandlung hin zu Testosteron und Dihydrotestosteron an.

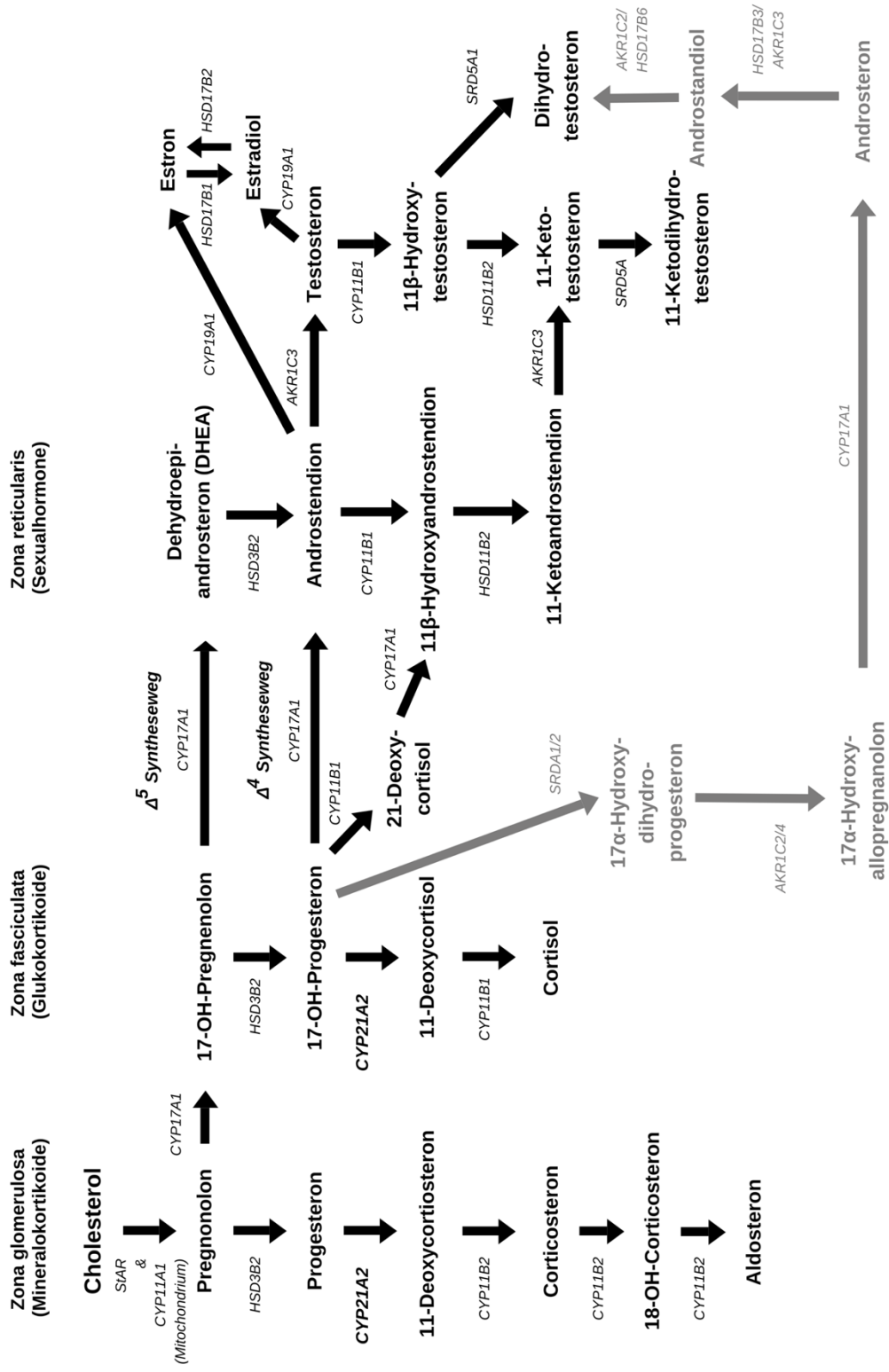
Im  $\Delta^4$  Syntheseweg wird aus  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron über die  $17\alpha$ -Hydroxylase/  $17, 20$ -Lyase (*CYP17A1*) Androstendion gebildet (32). *CYP17A1* wird in der Zona fasciculata und reticularis im Übermaß produziert und nimmt eine wesentliche Rolle bei der Synthese von Cortisol und Androgenen ein (84). Anschließend induziert die  $17\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase in den Gonaden die Konversion von Androstendion zu Testosteron (92). Mittels der  $5\alpha$ -Reduktase kann im Zielgewebe aus Testosteron die biologisch wirksamste Form des männlichen Sexualhormons, das Dihydrotestosteron, gebildet werden (32, 93). Während der Pubertätsentwicklung kann zudem die Synthese von geringen Mengen Estron bzw. Estradiol initiiert werden (47). Dafür verantwortlich ist die Aromatase (*CYP19A1*), die zum einen Androstendion zu Estron umwandelt, welches dann wiederum zu Estradiol umgewandelt werden kann (47, 67, 92). Zum anderen kann mittels der Aromatase Testosteron zu Estradiol umgesetzt werden (67, 92).

Ergänzend dazu bilden die sog. 11-oxygenierten Androgene ( $11\text{oxC}19$ ) eine weitere Gruppe von Androgenen. Alle teilen das zusätzliche Sauerstoff-Atom am 11. Kohlenstoff-Atom und stammen ausschließlich aus der NNR (77, 84). Die Existenz der 11-oxygenierten Androgene ist seit Jahrzehnten bekannt. Doch erst seit den letzten Jahren erforscht man ihre Bedeutung für Physiologie und Pathophysiologie intensiver, sodass die wachsende Studienlage nun zunehmend Evidenz für ihre Bedeutung liefert (84). 11-oxygenierte Androgene spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen Krankheiten mit Androgen-Exzess, wie dem AGS, dem Polyzystischen Ovarialsyndrom (PCOS), Androgen-abhängigen Tumoren sowie dem kastrationsresistenten Prostatakarzinom (81).

Die 11-oxygenierten Androgene entstehen ausgehend von einer  $11\beta$ -Hydroxylierung (*CYP11B1*) von Androstendion bzw. Testosteron über die Zwischenprodukte  $11\beta$ -Hydroxyandrostendion und  $11$ -Ketoandrostendion bzw.  $11\beta$ -Hydroxytestosteron (81). Die Bildung von  $11\beta$ -Hydroxyandrostendion kann zudem über einen weiteren Weg ablaufen. Dieser erfolgt unter Umgehung der Vorstufen über 21-Deoxycortisol (25, 34).

Die Endprodukte 11-Ketotestosteron und 11-Ketodihydrotestosteron sind in der Lage, die Androgen-Rezeptoren in ähnlicher Weise zu aktivieren wie Testosteron und Dihydrotestosteron und stellen sehr potente Androgene dar (77, 81). Hinsichtlich ihrer androgenen Aktivität sind sie vergleichbar mit Dihydrotestosteron, welches als das stärkste endogene Androgen angesehen wird (77).

Ein weiterer Androgen-Syntheseweg, der sogenannte Backdoor-Pathway, umgeht die Zwischenstufen Androstendion und Testosteron (32). Dieser ist gerade beim 21-Hydroxylase-Mangel von Relevanz, wo sich Androgen-Vorstufen, allen voran 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron (17-OHP), anhäufen. Bei diesem wird zunächst 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron (17-OHP) mittels 5 $\alpha$ -Reduktase Typ 1 oder 2 (*SRDA1/2*) zu 17 $\alpha$ -Hydroxydihydroprogesteron umgewandelt und durch die 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivität von *AKR1C2/4* weiter zu 17-Hydroxyallopregnanolon konvertiert (32, 47). Dieses kann dann durch die 17, 20-Lyase (*CYP17A1*) zu Androsteron und über die 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (*HSD17B3/AKR1C3*) zu Androstandiol umgewandelt werden (32, 47). Als letzten Schritt des Backdoor-Pathways kann Dihydrotestosteron über die 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (*AKR1C2/HSD17B6*) aus Androstandiol synthetisiert werden und damit den Androgen-Rezeptor aktivieren (32, 70).



**Abb. 1 - Schematischer Überblick über den physiologischen Syntheseweg der Steroidhormone.**

Syntheseweg der Mineralokortikoide, Glukokortikoide und Sexualhormone aus Cholesterol.

Gezeigt sind neben den Steroiden auch die beteiligten Enzyme (kursiv).

Aufgrund deren Relevanz für das AGS sind auch die 11-oxygenierten Androgene dargestellt (81).

Der Backdoor-Pathway, als potenziell zusätzlicher Syntheseweg von Dihydrotestosteron beim AGS, ist in grau gezeigt (32).

## 1.4 Pathophysiologie

Bei Patienten mit einem AGS zeigt sich aufgrund der Mutation im *CYP21A2*-Gen ein 21-Hydroxylase-Mangel mit daraus resultierendem relativen bis absoluten Mangel an Glukokortikoiden und Mineralokortikoiden (10, 33, 70).

Die Aufgabe des *CYP21A2*-Gens besteht darin, die 21-Hydroxylase, ein P450-Enzym (*P450c21*) zu kodieren (71). Die 21-Hydroxylase dient dabei sowohl als Katalysator für die Cortisol-Synthese (von 17-Hydroxyprogesteron zu 11-Deoxycortisol) als auch für die Mineralokortikoid-Synthese (Progesteron zu 11-Deoxycorticosteron) (70).

Infolge der gestörten Cortisol-Synthese mit fehlendem Cortisol wird im Sinne einer negativen Rückkopplung vermehrt CRH aus dem Hypothalamus und ACTH aus dem Hypophysenvorderlappen ausgeschüttet (53, 70). Dies führt zu einer Stimulation der Nebennierenrinde mit daraus folgender Hyperplasie. Neben der Nebennierenrindenhypertrophie kommt es in den vom Defekt unbeeinträchtigten Stoffwechselwegen zu einer übermäßigen Synthese von Steroiden der Nebenniere, insbesondere Androgenen (53). Zudem werden in den durch den 21-Hydroxylase-Mangel blockierten Stoffwechselwegen Steroidvorstufen angehäuft, allen voran 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron (17-OHP) (53, 70).

Für die Androgen-Synthese wird keine 21-Hydroxylase-Aktivität benötigt (32, 70, 76). Daher kann das vermehrt synthetisierte 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron über Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Androstendion weiter zu Testosteron und Dihydrotestosteron, als potentestes Androgen, konvertiert werden (32, 70, 76). Dies resultiert in einer gesteigerten Synthese von aktiven Androgenen (76).

Da die Mineralokortikoid-Synthese eine zumindest minimale 21-Hydroxylase-Aktivität benötigt, ist die Synthese von Mineralokortikoiden bei schweren AGS-Formen, wie dem klassischen AGS mit Salzverlustsyndrom, eingeschränkt und der Salzverlust, im Sinne einer schweren Elektrolytstörung, ein charakteristisches Merkmal (53).

## 1.5 Epidemiologie

Die Prävalenz eines klassischen AGS beträgt zwischen 1:10.000 bis 1:20.000 Geburten (54, 56, 78, 88). Dabei zeigen sich in etwa gleiche Verteilungen zwischen Jungen und Mädchen, bei Diagnosestellung unmittelbar nach der Geburt (10, 70).

In Europa und den USA liegt die Prävalenz eines klassischen AGS zwischen 1:15 000–1:16 000 (80, 88). Global betrachtet variiert diese erheblich, mit Angaben zwischen 1:684 bei Yupik Inuit in Alaska und 1:18 000 in Japan (73, 80).

Die nicht-klassische Form des Adrenogenitalen Syndroms besitzt eine deutlich höhere Prävalenz in der kaukasischen Bevölkerung von 0,1 % bis 0,2 % (10, 73).

Daten von New aus dem Jahr 2006 legen nahe, dass die Prävalenz eines nicht-klassischen AGS, unter Betrachtung der multiethnischen Bevölkerung von New York City (USA), sogar bei 1 % läge (51). Damit wäre es gleichzeitig die am häufigsten vorkommende autosomal-rezessive Erkrankung (51).

## 1.6 Symptome

Bestimmt wird die Symptomschwere eines AGS durch die je nach Form unterschiedliche Mutation im *CYP21A2-Gen* und die daraus resultierende Über- bzw. Unterproduktion von Androgenen bzw. Cortisol und Aldosteron (25).

### **Klassische Form mit Salzverlustsyndrom**

Das klassische AGS mit Salzverlustsyndrom ist durch einen bereits intrauterinen Cortisol- und Aldosteronmangel gekennzeichnet (25). Gleichzeitig kommt es zu einem Überschuss an Androgenen (25). Ursächlich hierfür sind Mutationen im *CYP21A2-Gen*, wie Deletionen oder Nonsense-Mutationen, welche zu einem völligen Verlust der Aktivität im 21-Hydroxylase-Enzym führen (76).

Der Androgen-Überschuss zeigt sich bei betroffenen Mädchen bereits intrauterin in der siebten Schwangerschaftswoche (76). Diese stellt eine überaus sensible Phase in der Geschlechtsentwicklung dar, da sich in dieser die Vaginal- und Urethralröhre (76) ausbilden.

Infolge der erhöhten Androgen-Konzentrationen kommt es zu typischen pathologischen Veränderungen der weiblichen Geschlechtsorgane, wie einer Klitorishypertrophie oder fusionierten Labien (76). Eine Einteilung des Schweregrads dieser Veränderungen, welche auch als Virilisierung bezeichnet werden, bietet die Einteilung nach Prader (20, 59). Diese reicht von einer leichten Klitorishypertrophie (Prader Stadium I) bis hin zu einem gemeinsamen Sinus urogenitalis und einer Verschmelzung der Labien (Prader

Stadium V). Die Stadien nach Prader beschreiben zugleich den Übergang hin zum typisch männlichen Genital (Stadium V).

Die inneren Geschlechtsorgane der betroffenen Mädchen erweisen sich im Gegensatz dazu als unauffällig (76).

Jungen zeigen bei Geburt, bis auf eine unterschiedlich stark ausgeprägte skrotale Hyperpigmentierung, keine genitalem Auffälligkeiten (76).

Infolge des Androgen-Überschusses ist eine verfrühte Pubertätsentwicklung möglich (6,14). Diese zeigt sich durch eine vorzeitige Entwicklung von Schambehaarung (prämatüre Pubarche) sowie einer Penishypertrophie bei im Vergleich kleinen Hoden (6,14).

Bei ausbleibender Therapie führt der Androgen-Exzess zu einem zunächst beschleunigtem Körperwachstum und beschleunigter Skelettreifung. Bei jedoch vorzeitigem Epiphysenfugenschluss resultiert daraus ein Kleinwuchs (20, 76).

Hinsichtlich der Endgröße zeigt sich, dass sich AGS-Patienten selbst unter engmaschigen Kontrollen bezüglich ihrer Endgröße in etwa 1,4 Standardabweichungen unterhalb des Populationsdurchschnitts befinden (19). Dieser Umstand resultiert aus einer Glukokortikoid-induzierten Inhibierung der Wachstumsachse (Überbehandlung) sowie einem Östrogen-induzierten frühzeitigen Epiphysenfugenschluss, erkennbar an einer hohen Androgen-Steroidmetabolit-Ausscheidung im Urin (Unterbehandlung) (24, 102).

Infolge des Aldosteronmangels manifestiert sich typischerweise zwischen der ersten und zweiten Lebenswoche eine potenziell lebensbedrohliche Salzverlustkrise (20, 56, 76). Charakterisiert ist diese durch eine Hyperkaliämie und Hyponatriämie, eine Dehydratation mit Gewichtsverlust und eine metabolische Azidose (20, 56, 76).

Der Mangel an Cortisol führt unbehandelt zu einer reduzierten kardialen Leistungsfähigkeit, einem herabgesetzten Ansprechen der Gefäße auf Katecholamine und einer reduzierten Glomerulären Filtrationsrate (GFR) mit verstärkter Sekretion von Antidiuretischem Hormon (ADH) (39).

Sowohl Aldosteron- als auch Cortisolmangel können im Verlauf in einer potenziell lebensbedrohlichen Nebennierenkrise mit Apathie, Erbrechen, Trinkschwäche und arterieller Hypotension münden (20, 56).

## **Einfach virilisierende Form**

Bei der einfach virilisierenden Form, auch als klassisches AGS ohne Salzverlust bezeichnet, tritt durch Missense-Mutationen im *CYP21A2-Gen* (*Ile172Asn* (*I172N*)) ebenfalls ein Mangel an Cortisol und ebenso eine deutlich erhöhte Androgenproduktion auf (1, 76). Aufgrund der Restaktivität im *CYP21A2-Gen* von 1–2 % ist die Aldosteron-Synthese geringer beeinflusst, weswegen Elektrolytentgleisungen und damit verbunden eine Salzverlustkrise ausbleiben (1, 56, 76).

Infolge der exzessiven Androgenproduktion zeigen sich bei Patienten mit dieser AGS-Form ebenfalls charakteristische Auffälligkeiten der Geschlechtsentwicklung. Bei Mädchen wird die Diagnose daher häufig unmittelbar nach Geburt gestellt (56, 76).

Bei Jungen erfolgt die Diagnosestellung oft erst nach mehreren Jahren (56, 76). Grund dafür sind die geringen Auffälligkeiten des männlichen Genitals (56, 76). Infolge eines langjährigen Überangebots an Androgenen weisen betroffene Jungen charakteristische Merkmale auf, wie eine verringerte Endgröße bei verfrühtem Körperwachstum durch eine vorzeitige Pubertätsentwicklung (*Pubertas praecox*) und vorzeitigem Epiphysenfugenschluss (56, 76).

## **Nicht klassische Form**

Bei der nicht klassischen Form liegt ein deutlich milderer Krankheitsbild vor. Grund hierfür ist eine Restaktivität im 21-Hydroxylase-Enzym von 20–60 % infolge zwei verschiedener Mutationen des *CYP21A2-Gens*: der *Val281Leu* (*V281L*) und der *Pro30Leu* (*P30L*)-Variante. (75, 76, 85)

Sowohl Cortisol als auch Aldosteron werden bei dieser Form im physiologischen Maß produziert. Lediglich bei den Androgen-Vorstufen lässt sich eine geringe bis mittelgradige Überproduktion feststellen (76). Daher werden Symptome bei Mädchen im Gegensatz zu Jungen meist früher wahrgenommen. Klinisch zeigen die betroffenen Patienten oft nur einzelne Symptome, deren Konstellation auf die nicht-klassische Form des AGS hinweisen. Eine verfrühte Pubarche, ein akzeleriertes Knochenalter, Hirsutismus, Oligomenorrhoe und Akne können solche Symptome sein (26, 44). Bei Frauen zeigen sich mitunter Zyklusanomalien oder auch eine verminderte Fertilität bis hin zu einem unerfüllten Kinderwunsch (44).

## 1.7 Diagnostik

Eine so früh wie mögliche Diagnosestellung ist essentiell, um die Morbidität und Mortalität eines Adrenogenitalen Syndroms zu senken (70). Zu diesem Zweck stehen verschiedene pränatale und postnatale diagnostische Methoden zur Verfügung.

Pränatal kann die Diagnose eines AGS bereits ab etwa der zehnten Schwangerschaftswoche mittels einer invasiven Chorionzottenbiopsie gestellt werden (69). Diese erfolgt insbesondere bei einem bekannten AGS-Fall in der betreffenden Familie (69).

Als eine neue, nicht-invasive, bislang jedoch noch nicht etablierte Methode ist die fetale Genotyp-Bestimmung aus mütterlichem Blutplasma möglich (52, 69). Die frühe Diagnostik, ab etwa der fünften Schwangerschaftswoche und die Nicht-Invasivität macht sie zu einer potenziell vielversprechenden diagnostischen Methode (52).

Postnatal ist das Stellen der klinischen Diagnose bei Mädchen meist unmittelbar nach Geburt, im Rahmen der Erstuntersuchung (U1), möglich. Grund hierfür ist das bei weiblichen Betroffenen je nach Ausprägung unterschiedlich stark virilisierte äußere Genital (76).

Bei männlichen Neugeborenen ist, durch das Fehlen markanter genitaler Auffälligkeiten, die Wahrscheinlichkeit einer verspäteten oder inkorrekten Diagnose dagegen erhöht (70).

Eine möglichst schnelle Diagnosestellung kann postnatal insbesondere durch geeignete Neugeborenen-Screening-Maßnahmen erreicht werden, wie sie weltweit mittlerweile in mehr als 35 Ländern zum Einsatz kommen (70). Auch in Deutschland ist das Screening auf ein AGS seit 2005 fester Bestandteil des gesetzlichen Neugeborenen-Screenings (20). Durchgeführt wird dieses zwischen 36 und 72 Stunden nach Geburt (20).

Die Basis zur Diagnosestellung eines AGS bildet die ausgeprägte Erhöhung des  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron (17-OHP), dem Hauptsubstrat der Steroid-21-Hydroxylase (CYP21A2) (26). Das Neugeborenen-Screening beinhaltet im Rahmen des AGS-Screenings daher die Bestimmung des 17-OHP (29, 48).

Durch das Neugeborenen-Screening ist es möglich, unter anderem die Schwere einer Hyponatriämie und die Zeit des Krankenhausaufenthalts zu reduzieren (8, 23, 79, 86). Auch ist die Anwendung, unter Nutzung weniger Tropfen Blut auf einer Trockenblutkarte, denkbar einfach.

Jedoch besitzt diese Screening-Maßnahme gewisse Limitationen. Sowohl Frühgeborene als auch kranke Neugeborene und jene mit hohem perinatalen Stress

weisen regelhaft erhöhte 17-OHP-Werte auf, woraus falsch positive Screening-Befunde resultieren können (29, 48). Der positiv prädiktive Wert eines positiven Screening-Befunds beträgt daher bei Frühgeborenen lediglich 0,4 %, wohingegen dieser bei Reifgeborenen bei 30,1 % liegt (14).

Eine Erhöhung der 17-OHP-Werte unmittelbar nach der Geburt sowie in den ersten Lebenstagen ist physiologisch (70). Bei Patienten mit AGS steigen diese jedoch weiter an, während bei gesunden Neugeborenen eine schnelle Abnahme erfolgt (70).

Das Neugeborenen-Screening erfasst nicht klassische AGS-Formen aufgrund der Limitationen nicht ausreichend sensitiv (48). Aber auch bei klassischen Formen mit Salzverlust und einem schweren Verlauf sind falsch negative Ergebnisse möglich (48).

Bei einem auffälligen Neugeborenen-Screeningbefund mit 17-OHP-Werten von mehr als 90 nmol/l werden weitere diagnostische Maßnahmen eingeleitet (20).

Diese umfassen zum einen eine Konfirmationsdiagnostik mittels Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) im Serum oder Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) im Harn (29, 48). Zum anderen erfolgt eine Blutuntersuchung mit Bestimmung der Serum-Elektrolyte, des Blutzuckers, des Säure-Basen-Haushalts, der Plasma-Renin-Aktivität sowie der Bestimmung von 17-OHP und Cortisol im Serum (48).

Auch umfasst die weitere Diagnostik eine körperliche Untersuchung u. a. hinsichtlich der Beurteilung des Prader-Stadiums bei weiblichen Neugeborenen, möglicher weiterer Fehlbildungen, der Einschätzung des Hautturgors und der Erfassung der Vitalparameter (Blutdruck, Herzfrequenz) (20).

Außerdem erfolgt eine Ultraschall-Untersuchung des Neugeborenen zur Beurteilung der Nebennieren, Gonaden und des Uterus bzw. der Vagina bei weiblichen Neugeborenen (20).

Bei Bestätigung des AGS-Verdachts wird zudem eine Mutationsanalyse im *CYP21A2-Gen* durchgeführt (48).

## 1.8 Therapie

Die Therapie eines klassischen AGS mit Salzverlustsyndrom beinhaltet die Kombination aus einem Glukokortikoid und Aldosteronanalogon.

Ziel ist es, das fehlende Cortisol zu ersetzen, die ACTH-Ausschüttung zu hemmen sowie die Androgenproduktion der Nebennierenrinde zu supprimieren.

Im Wachstumsalter wird aufgrund der geringeren negativen Wachstumsbeeinflussung, der kürzeren Halbwertszeit und des geringeren Nebenwirkungspotenzials oral verabreichtes Hydrocortison (HC) als Glukokortikoid eingesetzt (70). Empfohlen wird das Verteilen der empfohlenen Hydrocortison-Dosis von 10 bis 15 mg/m<sup>2</sup>/d auf drei Einzeldosen pro Tag (20, 70). Zu beachten ist, dass die Dosis im Falle von Infekten mit hohem Fieber oder einer Operation intensiviert und mindestens verdreifacht werden muss (sogenannte Stressdosis) (48).

Das Aldosteronanalogon Fludrocortison wird in ein bis zwei Einzeldosen in einer Dosierung von 0,05–0,2 mg pro Tag angewandt (20, 70).

Ein effektives Therapiemonitoring ist angesichts von Folgen wie einer lebensbedrohlichen Salzverlustkrise, eines therapiebedingten Cushing-Syndroms oder einer Virilisierung von immenser Bedeutung.

Bei Patienten unter 18 Monaten ist in den ersten drei Monaten nach Geburt eine engmaschige Therapieüberwachung notwendig und anschließende Kontrollen alle drei Monate anzuraten (70). Ab einem Alter von 18 Monaten können diese auf viermonatige Intervalle ausgeweitet werden (70). Neben der körperlichen Untersuchung beinhalten die Kontrollen eine Erfassung von Gewicht, Wachstumsgeschwindigkeit und Blutdruck sowie einer Beurteilung der Steroidmetabolit-Parameter mittels GC-MS im Harn (70). Von besonderer Relevanz sind hierbei üblicherweise die 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron (17-OHP) und Androstendion-Werte (70).

## 2 ZIELSETZUNG

Das Erzielen einer Balance zwischen Unter- oder Überdosierung und damit Androgen-Supprimierung bzw. Cortisol-Exzess nimmt in der Therapie des AGS eine zentrale Rolle ein (15, 33, 70).

Dabei ist es das oberste Ziel, durch eine optimale medikamentöse Therapie, den betroffenen Kindern ein nach Möglichkeit normales Wachstum im jeweiligen Zielgrößenbereich sowie eine altersgerechte Entwicklung zu ermöglichen (15, 33, 70).

Das Anliegen dieser Arbeit bestand darin, anhand einer retrospektiven Datenanalyse von Spontanurin- und 24h-Sammelurinproben Erkenntnisse über das Wachstum und die Konstellationen der Steroidmetabolite bei Patienten mit klassischem AGS und Salzverlustsyndrom zu gewinnen.

Die zentrale Frage der Untersuchung lautete dabei: Welche relevanten Erkenntnisse liefert die Analyse des Harnsteroidmetaboloms und wie sind die untersuchten Patienten mit 21-Hydroxylasemangel hinsichtlich der Wachstumsparameter zu charakterisieren?

Zugleich bestand das Anliegen darin, durch eine retrospektive Analyse metabolische Muster mit typischen Konstellationen der Urinsteroidmetabolite zu identifizieren und im Sinne einer guten Behandlung, Unterbehandlung und Überbehandlung zu charakterisieren (Metabotypisierung). Dies erfolgte mit der Absicht, mittels konkreter Biomarker das Therapiemonitoring zu verbessern, sowie eine Therapieoptimierung und eine möglichst individualisierte Therapie zu ermöglichen.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine retrospektive Kohortenstudie.

Analysiert wurden sowohl Sammelurinproben unterschiedlicher Sammeldauer als auch Spontanurinproben von Patienten im Alter von 0 bis  $\leq 4$  Jahren mit klassischem AGS mit Salzverlustsyndrom unter Behandlung. Die Analysen erfolgten gemäß der Methode der qualitativen und quantitativen Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) nach Shackelton et al. (64) im Steroid- und Peptidhormonlabor des Schwerpunktes pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie des Zentrums für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. S.A. Wudy.

Die für diese Studie verwendeten Daten entstammten dem Patientenregister des Labors. Sie wurden vor Beginn der Studie anonymisiert, mittels Microsoft<sup>®</sup> Excel<sup>®</sup> 365 für Mac in einer Datenbank verwaltet und anschließend statistisch mittels Graphpad<sup>®</sup> Prism<sup>®</sup> 9 und MetaboAnalyst 5.0 ausgewertet.

Die Studie gliederte sich in zwei Hauptteile: zum einen in die Beschreibung des Patientenkollektivs, welche verschiedene anthropometrische Parameter umfasste. Dazu zählten die Größe (in cm als auch in SDS (Standard Deviation Score)), der BMI ((Body-Mass-Index) in  $\text{kg}/\text{m}^2$  als auch in SDS) und Parameter der Therapie-Einstellung, wie die Hydrocortison- und Fludrocortison Dosierung.

Zum anderen wurden zur Beschreibung der Steroidmetabolite im Verlauf, die für die Untersuchung wichtigsten Urinsteroidmetabolite, unterteilt nach dem Alter, betrachtet. Ebenfalls erfasste, jedoch für die Untersuchung weniger relevante Urinsteroidmetabolite sind im Anhang aufgeführt.

Zudem beinhaltet dieser Abschnitt eine Clusteranalyse in Verbindung mit einer „Grenzwertoptimierungskurven“ (ROC) -Analyse der sechs wichtigsten Unterscheidungsmerkmale. Die Methodik der ROC-Analyse wird in Kapitel 3.4.1 erläutert.

Anhand der "Fläche unter der Kurve" (AUC) wurden die drei besten Unterscheidungsmerkmale ausgewählt. Diese wurden im Hinblick auf den Zusammenhang zwischen Steroidkonzentration und Wachstumsgeschwindigkeit untersucht.

### **3.2 Ethische Evaluation**

Das positive Ethikvotum ohne Einwände der Ethik-Kommission für ärztliche Forschung der Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Humanmedizin, lag unter dem Aktenzeichen 84/13 vom 23. April 2013 bereits vor Studienbeginn vor.

### **3.3 Datenerhebung**

Die Basis dieser Promotionsarbeit bildeten, im Sinne einer retrospektiven, deskriptiven Datenanalyse, die im Steroid- und Peptidhormonlabor des Schwerpunktes pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie des Zentrums für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. S.A. Wudy erhobenen und im Patientenregister des genannten Labors gespeicherten Daten. Berücksichtigt wurden Daten, die zwischen dem 01.01.2003 und dem 30.09.2017 erhoben wurden. Diese basierten auf der routinemäßigen Untersuchung von Patienten bis 4 Jahren mit klassischem Adrenogenitalen Syndrom aufgrund eines 21-Hydroxylasemangels mit Salzverlustsyndrom unter Behandlung. Daten einer gesunden Vergleichskohorte aus einem hauseigenen Referenzkollektiv, zum Vergleich der anthropometrischen Parameter und Steroidmetabolit-Werte, lagen nicht vor.

Erfasst wurden die Daten mit Hilfe des Anforderungsscheins „Anforderung: GC-MS-Urinsteroide-Metabolom-Analyse“. Mit diesem wurden folgende anthropometrische bzw. therapierelevanten Daten erhoben:

- Alter
- Geschlecht
- Art der Urinprobe (24h-Sammelurin, Spontanurin, oder andere Sammelartdauer)
- falls vorhanden: Urin-Sammelmenge in ml
- Gewicht in kg (auf die 1. Dezimalstelle genau)
- Größe in cm (auf die 1. Dezimalstelle genau)
- Hydrocortison Dosis-Schema
- Fludrocortison Dosis-Schema

Die im Rahmen der Routine-Untersuchung erhobenen Urinproben wurden mittels qualitativer und quantitativer GC-MS analysiert.

Durch dieses Verfahren können unter anderem Steroidmetabolite im Harn untersucht werden, was auch die Diagnose von Erkrankungen der NNR ermöglicht.

Hierdurch ergaben sich individuelle Steroidprofile mit jeweils 36 Steroidmetaboliten, die im Patientenregister des Labors gespeichert und weiterverarbeitet werden konnten.

Kompatible Probanden bis zum Alter von 4 Jahren wurden zum Zweck der weiteren Verarbeitung aus der Gesamt-Datenbank ausgewählt. Die Auswahl erfolgte anhand der Kriterien „Diagnose“ und „Alter“. Zudem wurden die Patientendaten anonymisiert verarbeitet.

Einschlusskriterien waren: 1.) ein klassisches Adrenogenitales Syndrom aufgrund eines 21-Hydroxylasemangels mit Salzverlustsyndrom, welches anhand charakteristisch erhöhter Urinsteroidmetabolit-Konzentrationen von 17-OHP und 21-Deoxycortisol mittels GC-MS diagnostiziert wurde, 2.) eine Therapie mit Hydrocortison, unter dreimal täglichen Gaben sowie 3.) die Gabe von Fludrocortison (64, 97, 98).

Ausschlusskriterien waren: eine zusätzliche synthetische Glukokortikoid- bzw. eine fehlende Fludrocortison-Therapie.

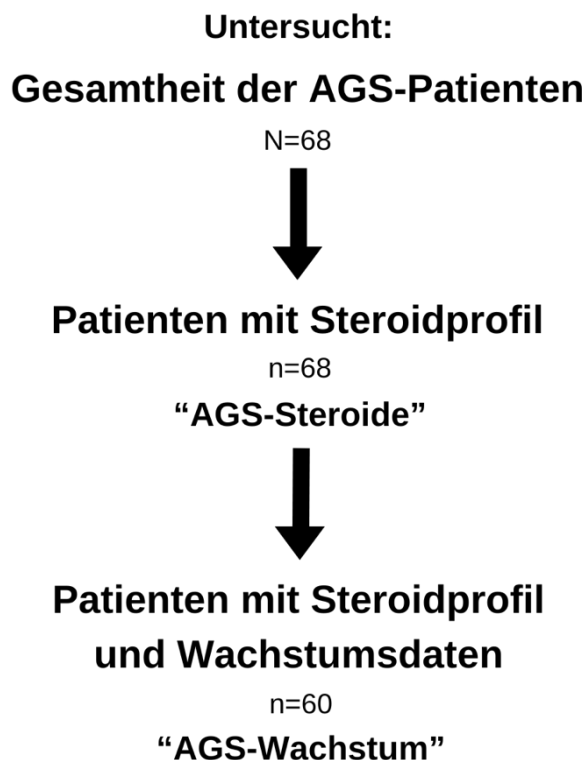
Anschließend erfolgte eine manuelle Ergänzung der vorliegenden Datensätze mittels der ausgefüllten archivierten Anforderungsscheine „Anforderung: GC-MS-Urinsteroidmetabolom-Analyse“. Dabei wurden anthropometrische und therapierelevante Daten wie Größe, Gewicht sowie Hydrocortison- und Fludrocortison-Dosierungen ergänzt.

Zur Untersuchung des Steroidmetaboloms wurden die Datensätze außerdem um die Ergebnisse der GC-MS-gestützten Urinsteroidmetabolom-Analyse ergänzt.

Insgesamt standen Daten von 68 Patienten zur Verfügung. Diese wurden gemäß einer der zentralen Fragen der Studie („Welche relevanten Erkenntnisse liefert die Analyse des Harnsteroidmetaboloms?“) analysiert und fortan als Patientengruppe „AGS-Steroide“ bezeichnet. Für jeden Datensatz war ein vollständiges Steroidprofil erforderlich.

Zur Beantwortung der zweiten zentralen Frage der Studie („Wie sind die untersuchten Patienten mit 21-Hydroxylasemangel hinsichtlich der Wachstumsparameter zu charakterisieren?“) wurde die Gruppe erneut analysiert, wobei eine geschärfte Betrachtungsweise notwendig wurde. Diese Patientengruppe wird im Folgenden als „AGS-Wachstum“ geführt. Da nicht von allen Patienten Wachstumsdaten vorlagen,

welche Gewichts- und Größenangaben auf eine Dezimalstelle genau enthielten, war diese Patientengruppe mit Daten von 60 Patienten etwas kleiner.



**Abb. 2 – Baumdiagramm zur Struktur der untersuchten Patientengruppen.**

*Bildung der Patientengruppe „AGS-Steroide“ (n = 68) aus dem Patientenkollektiv (N = 68),  
daraus leitete sich die Patientengruppe „AGS-Wachstum“ (n = 60) ab.*

*n ≙ Anzahl der Patienten*

*„AGS-Steroide“, AGS-Wachstum“ ≙ Bezeichnung der Patientengruppen*

### **3.4 Patientenkollektiv**

Die Patientengruppe „AGS-Steroide“ umfasste 250 Datensätze von 68 Probanden mit 21-Hydroxylase-Mangel. Diese bot die Grundlage für die Analyse der Steroidprofile der Patienten.

Um in der Patientengruppe „AGS-Wachstum“ eine ausreichende Genauigkeit und eine hohe Datenqualität bei der Beschreibung der Wachstumsparameter zu gewährleisten, wurde ein restriktives Kriterium angewendet. Dieses Kriterium verlangte, dass die Gewichts- und Größenangaben der Daten auf eine Dezimalstelle genau angegeben sein mussten. Aufgrund dieser Anforderung wurden 8 Probanden von der Analyse der Wachstumsparameter ausgeschlossen. Dadurch umfasste die Patientengruppe „AGS-Wachstum“ 60 Patienten mit insgesamt 158 Datensätzen.

Zur Unterteilung des Patientenkollektivs in einzelne Untergruppen diente das Patientenalter und -geschlecht, wobei hinsichtlich des Alters ein halbjährliches Intervall gewählt wurde.

Hierdurch ergaben sich jeweils neun Untergruppen pro Geschlecht.

Zum Vergleich der Wachstumsparameter Größe, BMI und Wachstumsgeschwindigkeit mit einer gesunden Vergleichsgruppe wurden Referenzdaten von gesunden, gleichaltrigen Kindern herangezogen.

Referenzdaten für die Größe und den BMI wurden der KiGGS-Studie entnommen, einer Langzeitstudie des Robert-Koch-Instituts zur gesundheitlichen Lage von Kindern und Jugendlichen in Deutschland aus dem Jahr 2010 (49). Die Studie umfasst eine Referenzpopulation von 17.158 gesunden Kindern und Jugendlichen im Alter von 3 Monaten bis 17 Jahren, darunter 8.706 Jungen und 8.452 Mädchen (49).

Als Referenzdaten für die Wachstumsgeschwindigkeit von Patienten jünger als 24 Monaten dienten die „WHO Child Growth Standards“ (95). Die Grundlage zu diesen bilden anthropometrische Daten von 1743 gesunden Kindern im Alter zwischen 0 und 24 Monaten aus unterschiedlichen ethnischen Hintergründen und Ländern, ohne bekannte wachstumseinschränkende Gesundheits- und Umweltfaktoren, wie Mangelernährung oder bestehende Erkrankungen (95).

Referenzdaten für die Wachstumsgeschwindigkeit bei Probanden älter als 24 Monate lieferten deutsche Referenzwerte für die Wachstumsgeschwindigkeit (7). Diese basieren auf den „Bonner und Dortmunder Longitudinal-Studien über kindliches Wachstum“ aus dem Jahr 1988 mit 150 Probanden, welche ab Geburt über 16 Jahre begleitet wurden (7).

### **Ausgeschlossene Patienten**

Gründe für den Ausschluss in den beiden Patientengruppen bildeten fehlende Angaben für die Körpergröße und das Gewicht (80 Datensätze) oder eine nicht vorhandene medikamentöse Therapie mittels des Aldosteronanalogs Fludrocortison (96 Datensätze). Außerdem wurden all jene Patienten ausgeschlossen, die nicht dem halbjährlichen Intervall zur Gruppierung nach dem Alter entsprachen (187 Datensätze).

Im Folgenden werden die beiden Patientengruppen hinsichtlich ihrer Altersverteilung vorgestellt.

## AGS-Steroide

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Altersverteilung der Patientengruppe „AGS-Steroide“, unterteilt in Untergruppen im halbjährlichen Intervall von 0 bis  $\leq 4$  Jahren, ohne Unterscheidung des Geschlechts sowie unterschieden nach Jungen und Mädchen.

Es wurde deutlich, dass in den Altersgruppen von 2,5 bis 4 Jahren der Anteil (in %) an der Gesamtheit als auch die Anzahl der Daten je Untergruppe zunahm, wobei die Altersgruppe der 0-Jährigen den kleinsten Anteil ausmachte.

**Tab. 1 - Zusammensetzung der Patientengruppe „AGS-Steroide“ von 0 bis  $\leq 4$  Jahren hinsichtlich der Anzahl an Probanden pro Altersgruppe (n) sowie des Anteils (in %), ohne Berücksichtigung des Geschlechts (J+M) als auch unterschieden nach Jungen (J) und Mädchen (M).**

Alter (Jahren)	n (J+M)	Anteil (J+M in %)	n (J)	Anteil (J in %)	n (M)	Anteil (M in %)
0	20	8,0	11	8,3	9	7,7
0,5	27	10,8	13	9,8	14	12,0
1	24	9,6	12	9,0	12	10,3
1,5	22	8,8	9	6,8	13	11,1
2	23	9,2	12	9,0	11	9,4
2,5	28	11,2	17	12,8	11	9,4
3	29	11,6	18	13,5	11	9,4
3,5	34	13,6	19	14,3	15	12,8
4	43	17,2	22	16,5	21	17,9

## AGS-Wachstum

Die Altersverteilung der Patientengruppe „AGS-Wachstum“, unterteilt in halbjährliche Intervalle von 0 bis  $\leq 4$  Jahren, sowohl ohne Geschlechterunterscheidung als auch getrennt nach Geschlecht, ist in Tabelle 2 dargestellt.

Es zeigte sich, dass die Altersgruppe der 0-Jährigen den kleinsten und die Altersgruppen von 3,5 und 4 Jahren die größten Anteile (in %) an der Gesamtheit der Probanden ausmachten.

**Tab. 2 - Zusammensetzung der Patientengruppe „AGS-Wachstum“ von 0 bis  $\leq$  4 Jahren hinsichtlich der Anzahl an Probanden pro Altersgruppe (n) sowie des Anteils (in %), ohne Berücksichtigung des Geschlechts (J+M) als auch unterschieden nach Jungen (J) und Mädchen (M).**

Alter (Jahren)	n (J+M)	Anteil (J+M in %)	n (J)	Anteil (J in %)	n (M)	Anteil (M in %)
0	10	6,3	5	6,2	5	6,5
0,5	14	8,9	6	7,4	8	10,4
1	14	8,9	7	8,6	7	9,1
1,5	13	8,2	5	6,2	8	10,4
2	16	10,1	7	8,6	9	11,7
2,5	13	8,2	4	5,0	9	11,7
3	21	13,3	14	17,3	7	9,1
3,5	24	15,2	15	18,5	9	11,7
4	33	20,9	18	22,2	15	19,4

### 3.5 Laboranalyse

Im Steroid- und Peptidhormonlabor des Schwerpunktes pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie des Zentrums für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. S.A. Wudy wird das Verfahren der qualitativen, quantitativen GC-MS angewandt (64, 65, 72, 92, 100).

Dieses basiert auf einer von Shackleton modifizierten Methode (65, 99).

Dabei handelt es sich um eine nicht-invasive, nicht-selektive, quantitative Bestimmungsmethode. Die Methode ermöglicht die simultane Darstellung von 36 C18-, C19- sowie C21-Steroidmetaboliten in einer Spontan- oder 24h-Sammelurinprobe, von denen Rückschlüsse auf Synthese und Katabolismus des Steroidstoffwechsels möglich sind.

Das resultierende Profil zeigt die Gesamtheit der im Harn erfassten Steroidmetabolite. Dies ermöglicht Rückschlüsse auf unterschiedliche, die Steroidsynthese betreffende, Erkrankungen der NNR. Hervorzuheben ist, dass die Diagnosestellung aus einer Multisteroidanalyse möglich ist (100).

### Probenverarbeitung / -extraktion

Vor der eigentlichen Analyse wird die tiefgefrorene Urinprobe behutsam aufgetaut, wobei darauf geachtet wird, dass keine Eisrückstände verbleiben.

Zur Vorbereitung der Analyse werden nach sorgfältigem Mischen 5 ml aus der zu analysierenden Urinprobe entnommen. Vorversuche hatten gezeigt, dass sich diese Menge optimal eignet, um eine effiziente Auftrennung und Detektion mittels GC-MS zu ermöglichen.

Zur Isolierung unkonjugierter und konjugierter Steroide erfolgt vor der Analyse eine Festphasenextraktion. Hierzu wird die Urinprobe durch eine Sep-Pak® C18 Kartusche geleitet (Sep-Pak® C18 Kartusche, Waters Corporation, Milford, MA, USA).

Aufgrund der vorwiegend konjugierten Form der Steroide (Sulfate und Glucuronide) wird eine Hydrolyse für 48 h bei 37 °C mit Sulfatase ( $\beta$ -Glucuronidase/ Arylsulfatase aus *Helix Pomatia*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) durchgeführt (64, 100).

Die Steroide werden anschließend ein zweites Mal mittels der Sep-Pak® Kartuschen extrahiert, mittels Stickstoffstrom eingedampft und anschließend in Methanol gelöst (64). Damit liegen die Steroide nun in unkonjugierter Form vor.

Zur Quantifizierung der Steroide werden der zu untersuchenden Teilprobe als Nächstes drei verschiedene interne Standards zugegeben, 5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -diol, Stigmasterol und Cholesterylbutyrat (98). Dabei handelt es sich um stabile Verbindungen, welche nicht beim Menschen vorkommen (100).

## **Derivatisierung**

Die Probe verfügt nun zwar über unkonjugiert vorliegende Steroide, jedoch verhalten sich die Moleküle aufgrund des hohen Anteils an Alkohol- und Ketogruppen sehr polar. Dies würde eine Analyse mittels GC-MS erschweren. Da bei diesem Verfahren sehr thermostabile, verdampfbare und möglichst niedrig polare Verbindungen benötigt werden, erfolgt als nächster Schritt eine Derivatisierung der nun in Methanol gelösten Probe (96).

Dabei handelt es sich um eine spezielle chemische Modifikation der zu analysierenden Verbindung (100). Hierbei werden als Erstes die Ketogruppen mittels Zugabe von Methyloxim-HCL in Pyridin und anschließender Inkubation bei 60 °C in Oxim-Verbindungen umgewandelt. Als Nächstes werden die polaren Alkoholgruppen durch eine Silylierungsreaktion mittels Trimethylsilylimidazol in unpolare silylierte Kohlenstoff-Verbindungen umgewandelt.

## **Probenaufreinigung**

Die nun derivatisierte Probe, die infolge der Derivatisierung noch über hohe Reagenzien-Mengen verfügt, wird zur Reinigung über eine selbst hergestellte Lipidex-5000 Mini-

Säule; PerkinElmer, Waltham, MA, USA geleitet. Die Säule besteht aus Pasteur-Glaspipetten, die mit Glaswolle gestopft sind, um eine durchlässige Struktur für Flüssigkeiten zu schaffen, während das verwendete Lipidex zurückgehalten wird. Das Lipidex filtert zudem grobe Partikel heraus. Die gelösten Moleküle werden in einem neuen Reagenzglas gesammelt.

Nach der Aufreinigung wird die Probe erneut getrocknet und in Isooctan/Pyridin/Hexamethyldisilazan (Verhältnis 98:1:1 v/v/v) gelöst. Dieses organische Lösungsmittel, in dem die Steroide gut löslich sind, dient der Stabilisierung der mithilfe der Derivatisierung gewonnenen Verbindungen (Silylether). Die Probe kann anschließend mittels des Verfahrens der GC-MS analysiert werden (65).

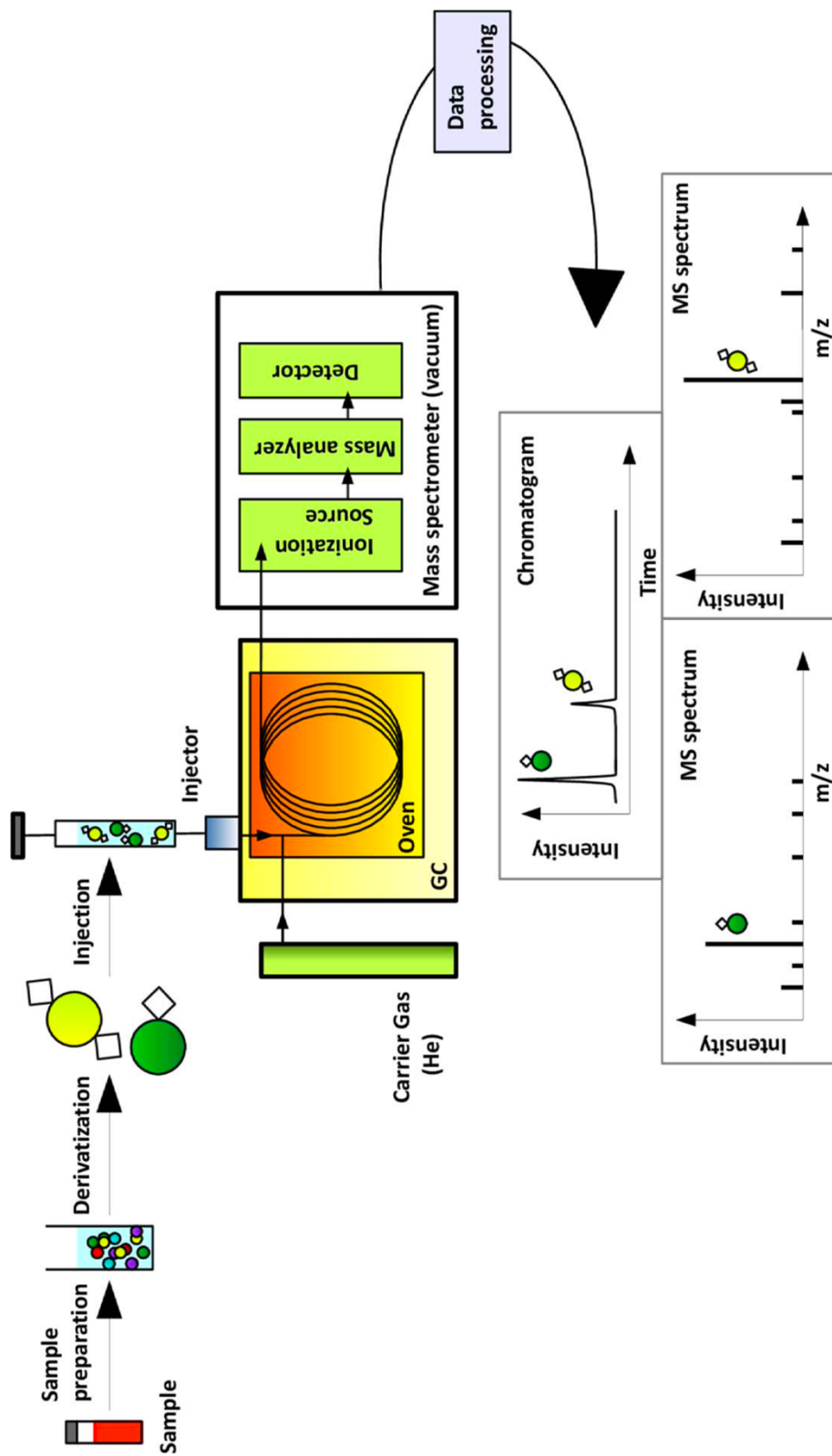
### **Gaschromatographie-Massenspektrometrie**

Der Aufbau besteht aus einem Gaschromatographen (GC-Serie 6890, Agilent Technologie GmbH, Böblingen, Deutschland), der eine sogenannte „fused silica“ Kapillare (Polydimethylsiloxan) enthält. Dieser ist außerdem mit einem Agilent 7683 Autoinjektor ausgestattet, welcher wiederum mit einem Agilent 5973 N massenselektiven Detektor verbunden ist. Dieser Aufbau ermöglicht eine voll automatisierte Probeneingabe, wie auch Prozessierung (65, 100).

Die Analyse der Probe findet während eines temperaturregulierten Arbeitsschrittes, bei Temperaturen von 210-270 °C auf einer Optima-1 MS-Säule (Länge: 25 m; Filmdicke: 0,1 µm; Innendurchmesser: 0,2 mm; Macherey-Nagel) statt (100). Als Trägergas kommt Helium zum Einsatz (100).

Das Massenspektrometer arbeitet im sogenannten „SIM-Modus“ („selected ion monitoring“), bei welchem sich die Messung anstelle vollständiger Massenspektren auf die Ionenströme einiger weniger ausgewählter Massen mit hoher Intensität beschränkt (100). Diese Ionen stellen die für die zu analysierende Verbindung repräsentativen, d.h. charakteristischen Ionen dar (100). Die Methode besitzt damit eine deutlich höhere Empfindlichkeit und wird daher auch zur Quantifizierung genutzt (100).

Zur Quantifizierung werden die Flächen unter den Peaks der einzelnen Komponenten der jeweiligen Probe computergestützt in einem Diagramm aufgetragen und mit den Flächen der Peaks des internen Standards (Androstandiol, Sigmasterol) in Beziehung gesetzt (65). Die Angabe der Absolutwerte erfolgt in der Einheit µg/l.



**Abb. 3 – Schematischer Überblick über das Prinzip der GC-MS, übernommen aus Wudy et al., 2017, S.6. Auftrennung der Probenbestandteile durch Gaschromatographie (GC) und anschließende Analyse mittels Massenspektrometrie (MS).**

### **3.6 GC-MS-Harnsteroidmetabolom-Analyse**

Ausgewertet wurden sowohl Sammelurinproben, d.h. Urinproben unterschiedlicher Sammeldauer, als auch Spontanurinproben von Patienten im Alter von 0 bis  $\leq 4$  Jahren. Der hohe Anteil an Spontanurinproben resultierte insbesondere aus dem sehr jungen Probandenalter und der damit verbundenen schwierigen Probengewinnung.

Um auch die Steroidmetabolit-Werte der Sammelurinproben in dieser Studie berücksichtigen zu können, erfolgte eine Normalisierung der Steroidausscheidung auf eine Konzentration in  $\mu\text{g/l}$ . Hierzu wurden die jeweiligen Werte durch die zum Datensatz zugehörige Urin-Sammelmenge (in Litern) dividiert.

In Tabelle 3 sind die mittels GC-MS bestimmten Harnsteroid-Metabolite zusammen mit ihren jeweiligen Vorläuferhormonen im Blut aufgeführt.

Tabelle 4 zeigt die zur Auswertung verwendeten Steroidmetabolite, ergänzt um deren systematische Namen. Zur Erfassung der Gesamtkonzentrationen von Androgen-, 17-OHP- und Cortisol-Metaboliten wurden die Konzentrationen der einzelnen Metabolite summiert.

**Tab. 3 – Urinsteroidmetabolite und Vorläufer-Hormone (28).**

Harnsteroid-Metabolit (Abkürzung)	Vorläufer-Hormon im Blut
<b>Androgen Metabolite</b>	
Androsteron (An)	Androstendion, Testosteron, 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron
Etiocholanolon (Et)	Androstendion, Testosteron
11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron (11-OH-An)	11 $\beta$ -Hydroxyandrostendion, 11-Ketoandrostendion, 11 $\beta$ -Hydroxytestosteron, 11-Ketotestosteron
11-Ketoandrosteron (11-O-An)	11 $\beta$ -Hydroxyandrostendion, 11-Ketoandrostendion, 11 $\beta$ -Hydroxytestosteron, 11-Ketotestosteron
Androstentriol-16 $\alpha$ (A5T-16a)	Dehydroepiandrosteron
<b>17-OHP Metabolite</b>	
Pregnantriolon (11-O-Pt)	21-Deoxycortisol
Pregnanetriol (PT)	17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron
5 $\alpha$ -17 $\alpha$ -Hydroxypregnanolon (Po-5a,3a)	17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron
17 $\alpha$ -Hydroxypregnanolon (Po-5b,3a)	17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron
<b>Cortisol Metabolite</b>	
Tetrahydrocortison (THF)	Cortisol, Hydrocortison
5 $\alpha$ -Tetrahydrocortisol (a-THF)	Cortisol, Hydrocortison
Tetrahydrocortisol (THE)	Cortisol, Hydrocortison
$\alpha$ -Cortolon (a-Cl)	Cortisol, Hydrocortison
$\beta$ -Cortolon (b-Cl)	Cortisol, Hydrocortison
$\alpha$ -Cortol (a-C)	Cortisol, Hydrocortison
$\beta$ -Cortol (b-C)	Cortisol, Hydrocortison
6 $\beta$ -Hydroxycortisol (6b-OH-F)	Cortisol, Hydrocortison
20 $\alpha$ -Dihydrocortisol (20a-DHF)	Cortisol, Hydrocortison
Cortisol (F)	Cortisol, Hydrocortison

**Tab. 4 - ausgewertete Urinsteroidmetabolite mit Trivialnamen, Abkürzungen und systematischem Namen (100).**

Trivialname (Abkürzung)	Systematischer Name
<b>Androgen Metabolite</b>	
Androsteron (An)	5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on
Etiocholanolon (Et)	5 $\beta$ -Androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on
11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron (11-OH-An)	5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -diol-17-on
Androstentriol-16 $\alpha$ (A5T-16a)	5-Androsten-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol
$\Sigma$ Androgen Metabolite	<i>Summe aus:</i> An, Et, 11-OH-An, A5T-16 $\alpha$
<b>17-OHP Metabolite</b>	
17-Hydroxypregnanolon (Po-5 $\beta$ ,3 $\alpha$ )	5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -diol-20-on
17-Hydroxyallopregnanolon (Po-5 $\alpha$ ,3 $\alpha$ )	5 $\alpha$ -Pregnan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -diol-20-on
Pregnanetriol (PT)	5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -triol
Pregnanetriolon (11-O-PT)	5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -triol-11-on
$\Sigma$ 17-OHP Metabolite	<i>Summe aus:</i> Po-5 $\beta$ ,3 $\alpha$ , Po-5 $\alpha$ ,3 $\alpha$ , PT, 11-O-PT
<b>Cortisol Metabolite</b>	
Tetrahydrocortison (THE)	5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,21-triol-11,20-dion
Tetrahydrocortisol (THF)	5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,17 $\alpha$ , 21-tetrol-20-on
5 $\alpha$ -Tetrahydrocortisol ( $\alpha$ -THF)	5 $\alpha$ -Pregnan-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-tetrol-20-on
$\alpha$ -Cortol ( $\alpha$ -C)	5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ ,21-pentol
$\beta$ -Cortol ( $\beta$ -C)	5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21-pentol
$\alpha$ -Cortolon ( $\alpha$ -Cl)	5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ ,21-tetrol-11-on
$\beta$ -Cortolo ( $\beta$ -Cl)	5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21-tetrol-11-on
$\Sigma$ Cortisol Metabolite	<i>Summe aus:</i> $\alpha$ -THF, THF, THE, $\alpha$ -Cortol ( $\alpha$ -C), $\beta$ -Cortol ( $\beta$ -C), $\alpha$ -Cortolon ( $\alpha$ -Cl), $\beta$ -Cortolo ( $\beta$ -Cl)

### 3.7 Methoden

Sämtliche Daten, welche allesamt in einer lokalen Microsoft<sup>®</sup>-Access<sup>®</sup>-2016-Datenbank erhoben wurden, wurden vor dem Export verblindet. Die statistische Auswertung erfolgte anonymisiert mittels Microsoft<sup>®</sup> Excel<sup>®</sup> für Mac (Version 16.66.1, Redmond, WA, USA), GraphPad Prism (Version 9.4.1 GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA) für Macintosh und BiAS. (11.12, epsilon-Verlag GbR, Hochheim Darmstadt, Deutschland) für Windows.

Die Tabellen umfassten folgende Attribute:

- anonymisierte Probandennummer
- Probandenalter zum Zeitpunkt des Probeneingangs als Dezimalangabe und in Monaten
- der zeitliche Abstand zur Voruntersuchung als Dezimalangabe und in Monaten
- Geschlecht des Probanden
- Art der Urinprobe (24h-Sammelurin, Spontanurin, oder andere Sammelartdauer)
- Urin-Sammelmenge in ml
- Gewicht des Probanden in kg (auf die 1.Dezimalstelle genau („AGS-Wachstum“))
- Körpergröße des Probanden in cm (auf die 1.Dezimalstelle genau („AGS-Wachstum“))
- Körperoberfläche (BSA (Body Surface Area)) der Probanden in m<sup>2</sup>
- Hydrocortison-Dosis als Tagesdosis in mg/m<sup>2</sup>/d und als Einzeldosen in mg
- Fludrocortison-Tagesdosis in µg/d

Zusätzlich wurden aus den vorhandenen Daten u. a. folgende Parameter berechnet:

- Körpergröße in SDS
- Wachstumsgeschwindigkeit (HV) in cm/Jahr und in SDS
- Körperoberfläche (BSA) in m<sup>2</sup>
- BMI in kg/m<sup>2</sup> und in SDS
- Hydrocortison-Tagesdosis in Relation zur Körperoberfläche in mg/m<sup>2</sup>/d
- Hydrocortison-Verhältnis von morgens zu abends in Prozent (%)
- Fludrocortison-Tagesdosis in Relation zur Körperoberfläche in µg/m<sup>2</sup>/d

### 3.8 Datenverarbeitung, -aufbereitung und statistische Analyse

Zu Beginn der Untersuchung wurden die Datensätze der Patientengruppen „AGS-Steroide“ und „AGS-Wachstum“ in Untergruppen untergliedert. Das Kriterium zur Unterteilung bildete das Patientenalter zum Abnahmezeitpunkt der Probe. Die Unterteilung erfolgte in halbjährlichen Intervallen. Daraus resultierten Untergruppen im Patientenalter von 0 bis  $\leq 4$  Jahren.

Weiterhin wurden diese Untergruppen sowohl geschlechtsunabhängig als auch unterschieden nach männlichem bzw. weiblichen Geschlecht betrachtet.

Zur Darstellung der ausgewerteten Parameter in der Übersicht wurden Tabellen verwendet. Zur Visualisierung der einzelnen Parameter kamen Box-Whisker-Plots zum Einsatz, in denen die Gruppen männlichen und weiblichen Geschlechts nebeneinander dargestellt wurden. Auf der x-Achse sind jeweils die Altersgruppen von  $> 0$  bis  $\leq 4$  Jahren, auf der y-Achse die Körpergröße (in cm, in SDS) bzw. der BMI (in  $\text{kg}/\text{m}^2$ , in SDS) aufgetragen.

Die tabellarischen Datenauswertungen sind im Anhang angefügt.

Für Steroidmetabolit-Werte, deren Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = „Limit of Detection“) lagen, wurden spezifische Nachweisgrenzen festgelegt. Diese Werte wurden mit „ $< \text{LOD}$ “ gekennzeichnet. Folgende Nachweisgrenzen wurden vor der Umwandlung in logarithmierte Werte festgelegt:

- 3,125  $\mu\text{g}/\text{l}$ : An; Et
- 6,25  $\mu\text{g}/\text{l}$ : A5-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ ; A5-3 $\beta$ ,17 $\beta$ ; 16 $\alpha$ -OH-DHEA; PD; 11OH-Et; Po-5 $\alpha$ ,3 $\alpha$
- 12,5  $\mu\text{g}/\text{l}$ : DHEA; 20 $\alpha$ -DHF
- 0  $\mu\text{g}/\text{l}$ : E1; E2; E3, PD; P5D; THS; TH-DOC; P5T-17 $\beta$ ; THA; THB; 5 $\beta$ -THB

Die Konzentrationen der folgenden 15 Steroidmetabolite lagen in den untersuchten Altersgruppen vollständig unterhalb der Nachweisgrenze. Diese wurden aufgrund ihrer fehlenden Relevanz für die Analyse nicht weiter berücksichtigt: A5-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ ; DHEA, A5-3 $\beta$ ,17 $\beta$ ; 16 $\alpha$ -OH-DHEA, E1, E2, E3; PD; P5D; THS; TH-DOC; P5T-17 $\beta$ ; THA; THB; 5 $\beta$ -THB.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 9, wobei zur statistischen Auswertung der nicht parametrischen Daten eine einfaktorielle Varianzanalyse sowie der Kruskal-Wallis-Test verwendet wurde.

## **„AGS-Steroide“**

Zur Analyse der Patientengruppe „AGS-Steroide“ wurde festgelegt, dass pro Untergruppe nur ein Datensatz pro Probanden verwendet wird. So konnte eine Überrepräsentation von bestimmten Probanden vermieden werden.

Wenn mehrere Werte in einem Probanden-Datensatz vorhanden waren, wurde derjenige Wert bevorzugt, der am ehesten sechs Monate nach der jeweiligen Voruntersuchung erhoben wurde. Dadurch wurden möglichst halbjährliche Intervalle zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten eingehalten.

Zudem wurden Ausreißertests nach Grubbs durchgeführt. Die entsprechenden Werte wurden von der weiteren statistischen Auswertung ausgeschlossen.

Zur Generierung einer Standardnormalverteilung erfolgte eine dekadische Logarithmierung ( $\log_{10}$ -Transformation) der Steroidmetabolit-Werte mit Hilfe der LOG-Funktion in Microsoft<sup>®</sup> Excel<sup>®</sup> 365 für Mac. Danach wurden diese Daten mittels D'Agostino-Pearson-Test auf Normalverteilung geprüft (Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ) und anschließend anhand von Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

Darüber hinaus wurden die Steroidmetabolite auf geschlechtsspezifische Unterschiede mittels ungepaartem t-Test getestet.

Die nach Alter gruppierten Urinsteroidmetabolit-Konzentrationen wurden ohne Unterscheidung des Geschlechts statistisch ausgewertet. Die Auswertung erfolgte hinsichtlich der Perzentilen (P5, P25, P50 (Median), P75, P95), des Interquartilsabstands und, nach Herstellen einer Normalverteilung, hinsichtlich des Mittelwerts und der Standardabweichung.

Ebenso erfolgte die grafische Darstellung in Form von Box-Whisker-Plots. Diese Darstellungsform besteht aus einer „Box“, die den Median („Strich innerhalb“) darstellt und durch das untere bzw. obere Quartil begrenzt wird. Die sogenannten „Whisker“ stellen grafisch die größten bzw. kleinsten Werte („Antennen“) dar. Dabei galt ein  $p$ -Wert  $< 0,05$  als statistisch signifikant.

## **„AGS-Wachstum“**

Analog zur Patientengruppe „AGS-Steroide“ erfolgte eine Unterteilung in Untergruppen des halbjährlichen Intervalls. Um eine Überrepräsentation zu verhindern, wurde ebenfalls lediglich ein Datensatz pro Proband pro Altersgruppe verwendet.

Zur weiteren Beschreibung des Wachstums der untersuchten Probanden wurden aus den erhobenen Daten u. a. Parameter, wie der BMI (in  $\text{kg}/\text{m}^2$ ), die Körperoberfläche (BSA in  $\text{m}^2$ ) und die Wachstumsgeschwindigkeit (in  $\text{cm}/\text{Jahr}$  und in SDS) berechnet.

Die Berechnung des BMI erfolgte mit Hilfe dieser Formel:

$$\text{BMI (kg/m}^2\text{)} = \frac{\text{Körpergewicht (kg)}}{\text{Körpergröße (m)}^2}$$

Da die BSA eng mit dem Nebennierenvolumen sowie der Hydrocortison- und Fludrocortison-Dosis der Patienten in Verbindung steht, wurde die jeweilige BSA ermittelt (62, 72). Zur Berechnung verwendet wurde die für Kinder gebräuchlichste Formel nach Mosteller (45).

$$\text{Körperoberfläche (BSA) (m}^2\text{)} = \sqrt{\frac{\text{Körpergröße (cm)} \times \text{Körpergewicht (kg)}}{3600}}$$

Zum Vergleich der Parameter Größe, BMI und Wachstumsgeschwindigkeit mit Werten von gesunden gleichaltrigen Kindern wurden SDS-Werte gebildet.

Die zur Berechnung der Größe und des BMI in SDS benötigten Referenzdaten wurden der KiGGS-Studie entnommen (49). Die Berechnung der Wachstumsgeschwindigkeit in SDS erfolgte für Probanden, die zum Zeitpunkt der Untersuchung unter 24 Monaten alt waren, mittels der „WHO Child Growth Standards“ (95).

Zur SDS-Berechnung wurde die LMS-Methode nach Cole verwendet (13):

$$\text{SDS} = \frac{((x/M)^L - 1)}{(LxS)}$$

Die Berechnung der Wachstumsgeschwindigkeit in SDS für Probanden im Alter von über 24 Monaten erfolgte anhand der unten genannten Formel. Hierfür wurde zunächst die jeweilige Differenz zwischen dem Wert der Probandendaten vom Mittelwert der zugehörigen Referenzdaten gebildet. Diese Differenz wurde durch die Standardabweichung der zugehörigen Referenzdaten dividiert.

$$\text{SDS} = \frac{(x - MW)}{SD}$$

Die hierfür genutzten Referenzdaten beruhen auf Deutschen Referenzwerten für die Wachstumsgeschwindigkeit, welche in einer longitudinalen Entwicklungsstudie zur Wachstumsgeschwindigkeit gesunder Kinder in den ersten 16 Lebensjahren erhoben wurden (7).

Bei nicht vorliegender Normalverteilung erfolgte für die Parameter Größe, Größe in SDS, Wachstumsgeschwindigkeit in SDS, BMI und BMI in SDS die Angabe des Medians mit Interquartilsabstand (IQR) und der Perzentilen.

Für die Parameter Größe, Größe in SDS, BMI und BMI in SDS wurde ein Signifikanztest mittels ungepaartem t-Test durchgeführt. Zusätzlich wurde für die Parameter Größe in

SDS, BMI und BMI in SDS ein Signifikanztest zwischen den verschiedenen Altersgruppen durchgeführt. Die p-Werte wurden dabei durch Adjustierung nach der Bonferroni-Holm-Methode korrigiert.

Anschließend wurden die Werte mittels Box-Whisker-Plots dargestellt.

## **Clusteranalyse**

Eine Clusteranalyse ermöglicht es, Objekte basierend auf ihren Eigenschaften zu einzelnen Cluster zusammenzufassen und dadurch insbesondere Muster in komplexen Datenstrukturen erkennbar zu machen (57). Es ist das Ziel, dass jedes Cluster zum einen in sich möglichst gleichartig (homogen) ist und sich zum anderen möglichst stark von anderen Cluster unterscheidet (heterogen) (57).

Die Analyse und Charakterisierung spezifischer metabolischer Muster in Metaboliten bezeichnet man als Metabotypisierung, abgeleitet von den Begriffen "Metabolismus" (Stoffwechsel) und "Typisierung" (Einteilung).

Basierend auf der Analyse zur Erkennung von Mustern und Unterschieden können dadurch individuelle Metabotypen identifiziert werden. Diese Metabotypen spiegeln unterschiedliche metabolische Zustände wider, welche beispielsweise mit einer Unter- oder auch Überbehandlung mit Hydrocortison in Verbindung zu bringen sind.

Die Grundlage zur Clusteranalyse bildeten 60 Urinsteroidprofile von 60 Probanden der Patientengruppe „AGS-Steroide“ mit den dazugehörigen ermittelten Konzentrationen der einzelnen Steroidmetabolite inkl. relevanter anthropometrischer Daten, wie der Größe, dem BMI und der Wachstumsgeschwindigkeit, jeweils in SDS. Erfasst wurden die Daten in Microsoft<sup>®</sup> Excel<sup>®</sup> 365 für Mac.

Zum Zweck der Vorbereitung der Probandendaten auf die Clusteranalyse mussten darüber hinaus gewisse Festlegungen getroffen werden.

Um eine Überrepräsentation einzelner Probanden zu vermeiden, wurde für jeden Probanden jeweils nur eine Probe in die Analyse einbezogen. Wenn einem Probanden mehrere Datensätze zugeordnet werden konnten, wurde der Datensatz mit der höchsten Datenqualität ausgewählt. Vorrangig wurden dabei Datensätze berücksichtigt, bei denen die Wachstumsgeschwindigkeit angegeben war.

Zur Generierung einer Standardnormalverteilung wurden die Steroidmetabolit-Konzentrationen mittels der LOG-Funktion in Microsoft<sup>®</sup> Excel<sup>®</sup> 365 für Mac

logarithmiert (log<sub>10</sub>-Transformation). Fehlende Werte sowie Ausreißer wurden von der Clusteranalyse ausgeschlossen.

Zur Clusteranalyse genutzt wurde das online-basierte Metabolom-Datenanalyse-Tool MetaboAnalyst 5.0, welches die Analyse, Visualisierung und Interpretation der Daten in Form von Clustern ermöglichte (11). Dadurch war es möglich, mehrere Variablen zeitgleich zu untersuchen.

In Abbildung 4 ist die Datenverteilung der untersuchten Daten als Gaußsche Glockenkurven und Box-Whisker-Plots gezeigt.

Es erfolgte die Generierung von Cluster mittels des K-means-Algorithmus. Der K-means-Algorithmus zählt zu den bekanntesten und am häufigsten eingesetzten Cluster-Methoden. Er ist abstandsbasiert, wobei ähnliche Datenpunkte so angeordnet werden, dass Muster erkennbar werden (57). Es ist notwendig, die Anzahl an Cluster vorab festzulegen (57), wobei die Anzahl an k=3 Cluster durch die hierarchische Clustering-Methode unter Zuhilfenahme der euklidischen Distanz und des „Ward’s Linkage Algorithmus“ ermittelt wurde.

Aufgrund des sehr hohen Anteils an Spontanurinproben und der damit verbundenen Abhängigkeit der Steroidmetabolit-Konzentration von der jeweiligen Urinkonzentration, war es erforderlich, Ratios heranzuziehen. Dadurch wurde es möglich, die Steroidmetabolit-Konzentration unabhängig von der Urinkonzentration zu betrachten.

Anschließend erfolgte die statistische Auswertung der jeweiligen Cluster hinsichtlich klinischer Parameter, wie dem Gewicht, der Größe und der Wachstumsgeschwindigkeit sowie der Größe, des BMI und der Wachstumsgeschwindigkeit in SDS. Dies erfolgte, bei nicht vorliegender Standardnormalverteilung, mittels Kruskal-Wallis-Test unter Angabe des Medians und des Interquartilsabstands.

In gleicher Art und Weise wurden auch die Parameter der Therapieeinstellung, d.h. Hydrocortison-Tagesdosis und die Fludrocortison-Tagesdosis statistisch ausgewertet.

Zur statistischen Auswertung der Urinsteroidmetabolit-Konzentrationen von Androgen-, 17-OHP-, Glukokortikoid-Metaboliten und der vier verwendeten Ratios wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Dabei werden die Mittelwerte von drei oder mehr Gruppen auf Unterschiede geprüft. Zusätzlich wurden der Median und der Interquartilsabstand angegeben. Eine statistische Signifikanzprüfung zwischen den Clustern erfolgte mit Hilfe des Tukey-HSD-Tests ( $p < 0,05$ ).

## **sPLS-DA-Analyse**

Um herauszufinden, welche der 17-OHP- bzw. Androgen-Steroidmetabolite die beste Trennschärfe aufweisen, wurde eine „sparse partial least square discriminant analysis“ (sPLS-DA) -Analyse durchgeführt.

Dadurch konnte die Anzahl der Steroidmetabolite und damit der Variablen reduziert werden, wodurch leicht interpretierbare Modelle entstanden sind (27). Durch eine Machine Learning gestützte Analyse wurden die zehn wichtigsten Steroidmetabolite, aufgetragen nach deren Gewichtung in Loading Plots, herausgefiltert (2, 12).

Machine Learning („maschinelles Lernen“), ein Bereich der künstlichen Intelligenz, ermöglicht es Systemen, Muster und Zusammenhänge in Daten zu erkennen. Durch kontinuierliches Lernen entwickelt das System die Fähigkeit, eigenständige Lösungen zu finden und präzise Vorhersagen zu treffen.

Es wurde zudem ein "2-D Scores Plot" erstellt, der die Proben nach ihrem Cluster und der ermittelten Hauptkomponente grafisch darstellt.

Auf Basis der sPLS-DA-Analyse konnten die vier bedeutendsten 17-OHP- bzw. Androgen-Metabolite identifiziert und aus diesen vier verschiedene Ratios gebildet werden. Dabei wurden die gemäß der Gewichtung aussagekräftigsten 17-OHP- bzw. Androgen-Metabolite (Zähler) gegen den dominierenden Cortison-Metaboliten Tetrahydrocortison (THE) (Nenner) ins Verhältnis gesetzt (29, 31). Durch die überwiegende Analyse von Spontanurinproben und den damit verbundenen Schwankungen der Urinsteroidmetabolit-Konzentration wurden Ratios gebildet, welche unabhängig von der Urinkonzentration zu betrachten sind.

Die optische Darstellung der Cluster erfolgte mittels einer Heatmap, einem Diagramm zur grafischen Visualisierung von Daten.

Um herauszufinden, welche Diskriminatoren am besten zur Trennung der einzelnen Cluster sowie als potenzielle Biomarker zum Therapiemonitoring geeignet sind, wurde eine ROC-Analyse durchgeführt. Dabei wurden entsprechende Cut-Off-Werte ermittelt.

## ROC-Analyse

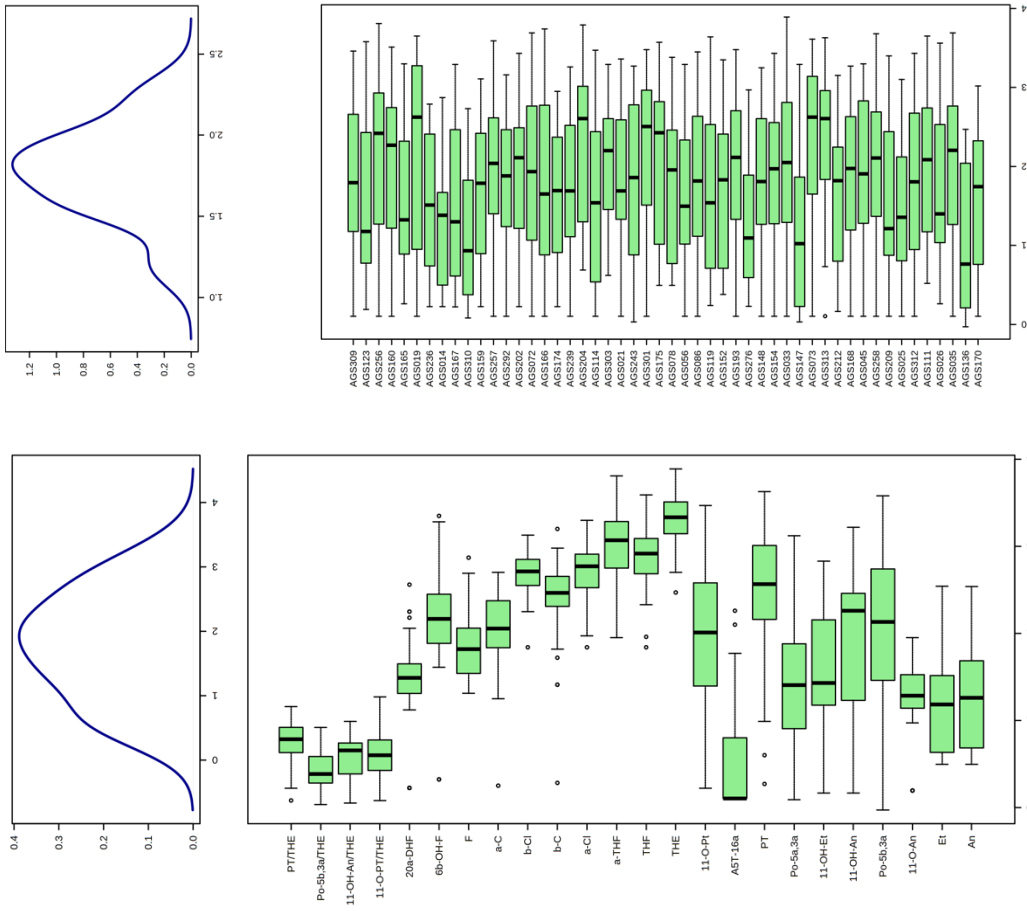
Bei ROC-Kurven handelt es sich um eine grafische Darstellungsform zur Beurteilung von beispielsweise diagnostischen Tests. Diese Darstellungsform umfasst unter anderem die Angabe der Sensitivität (y-Achse), der 1-Spezifität (x-Achse) und einer Winkelhalbierenden durch den Koordinatenursprung. Der AUC-Wert gibt vereinfacht die zwischen der Kurve und der x-Achse eingeschlossene Fläche an und ist ein Maß für die Testgüte.

Das Ergebnis lässt sich anhand des Verhältnisses von Kurve und Winkelhalbierenden einschätzen. Vereinfacht ausgedrückt gilt hierbei: Je konvexer die Kurve verläuft und je weiter sie von der Winkelhalbierenden abweicht, desto höher ist die Testgüte. Veranschaulicht wird dieser Zusammenhang anhand des AUC-Werts. Bei einer Übereinstimmung von Kurve und Winkelhalbierenden besitzt dieser den Wert 0,5, was einer Zufallsvorhersage entspricht. Er nähert sich dabei immer mehr der Zahl 1 an, je konvexer die Kurve ist. Damit steigt ebenso der Vorhersagewert des Tests und damit die Testgüte, d.h. der gewählte Test generiert weniger falsch negative oder falsch positive Werte.

ROC-Analysen können zudem dazu verwendet werden, spezifische diagnostische Cut-Off-Werte zu generieren. Dabei wird der Cut-Off-Wert bestimmt, der bei 100 % Sensitivität die höchste Spezifität aufweist.

Abschließend wurde der Zusammenhang zwischen Steroidkonzentration und Wachstumsgeschwindigkeit in SDS überprüft. Dabei wurden die drei Metabolite ausgewählt, die im Mann-Whitney-U-Test die signifikantesten Unterschiede in Bezug auf die Wachstumsgeschwindigkeit größer bzw. kleiner als -1 SDS zeigten (Signifikanzniveau:  $p < 0,05$ ). Die Unterteilung des Wachstums in größer versus kleiner -1 SDS entspricht einer Unterteilung in ein am ehesten normales versus ein verlangsamtes Wachstum.

Diese Gegenüberstellung wurde anschließend mittels Box-Whisker-Plots für die drei ermittelten Metabolite grafisch dargestellt.



**Abb. 4 – Gauß-Kurven (oben) und Box-Whisker-Plots (unten) der Daten, hinsichtlich der Verteilung ihrer Steroidmetabolite (links) und Proben (rechts).**

Die logarithmierten Werte folgen einer Standardnormalverteilung, erkennbar an den Gauß-Kurven ohne Schiefe.

Strich innerhalb der Box: Median, Begrenzung durch unteres bzw. oberes Quartil; Whisker: Minimum bzw. Maximum

## **4 ERGEBNISSE**

### **4.1 Deskriptiver Teil**

#### **4.1.1 Beschreibung des Patientenkollektivs**

##### **Beschreibung des Patientenkollektivs hinsichtlich der Wachstumsparameter**

Die Tabellen 5 – 7 präsentieren die erhobenen anthropometrischen Daten sowohl in der Gesamtheit aller Datensätze als auch nach Geschlecht differenziert.

Zur Betrachtung der Wachstumsparameter wurden 158 Datensätze (81 von Jungen, 77 von Mädchen) von 60 Probanden der Gruppe „AGS-Wachstum“ analysiert. Das Alter betrug im Mittel (MW  $\pm$  SD)  $2,46 \pm 1,3$  Jahre (Bereich: 0,06 – 4,23). In der Altersgruppe von 0 Jahren war eine Berechnung der Körpergröße und des BMI in SDS, aufgrund der fehlenden Datengrundlage nicht möglich.

Hinsichtlich der Körpergröße waren Jungen in den Altersgruppen von 0,5 bis 2 sowie 3 bis 4 Jahren zwischen 0,6 und 5,5 cm größer als Mädchen. Dieser Unterschied zeigte sich jedoch bis auf die Gruppe der 1,5-Jährigen ( $p=0,04$ ) statistisch nicht signifikant (Tab. 6 – 7).

Bezüglich der Körpergröße in SDS lagen die Mädchen der Altersgruppe 1 bis 2 Jahre bei etwa -1, während Jungen im Alter von 1,5 Jahren eine Körpergröße in SDS von 0,5 aufwiesen (statistisch nicht signifikant) (Tab. 6 – 7).

Bei Betrachtung des Gewichts ergab sich für Jungen im Alter von 0,5 Jahren im Vergleich zu Mädchen derselben Altersgruppe ein um 1,6 kg höheres Gewicht und im Alter von 1,5 Jahren ein um 1,7 kg höheres Gewicht. Mädchen hingegen waren im Alter von 2,5 Jahren um 1,3 kg und im Alter von 3,5 Jahren um 0,6 kg schwerer als Jungen (Tab. 6 – 7).

Der BMI der Jungen lag im Vergleich zu Mädchen der Altersgruppe von 0,5 Jahren mit  $18,6 \text{ kg/m}^2$  vs.  $15,7 \text{ kg/m}^2$  signifikant höher ( $p=0,02$ ). Bei Mädchen war der BMI in den Altersgruppen von 3 bis 4 Jahren im Vergleich zu Jungen um 0,2 bis 0,7  $\text{kg/m}^2$  höher, jedoch zeigte sich dieser Unterschied statistisch nicht signifikant (Tab. 6 – 7).

Bezüglich der BMI in SDS ergab sich für Jungen im Alter von 0,5 Jahren im Vergleich zu Mädchen eine Differenz in SDS von 1,5 (1 bei Jungen und -0,5 bei Mädchen).

Dieser Unterschied war statistisch signifikant ( $p=0,009$ ). In den übrigen Altersgruppen zeigten sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich des BMI in SDS (Tab. 6 – 7).

**Tab. 5 - Übersicht der Wachstumsparameter der untersuchten männlichen und weiblichen Probanden** (Größe, Größe (SDS), Gewicht, BMI, BMI (SDS) (Median (IQR))).

Alter (MW $\pm$ SD (Jahren))	N	Größe (cm)	Größe (SDS)	Gewicht (kg)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	BMI (SDS)
0 (0,14 $\pm$ 0,06)	10	55,0 (4,1)		4,8 (1,4)	15,4 (2,5)	
0,5 (0,52 $\pm$ 0,12)	14	66,7 (6,5)	-0,61 (2,31)	7,5 (2,6)	17,3 (3,3)	0,20 (1,82)
1 (1,05 $\pm$ 0,09)	14	71,9 (3,7)	-1,25 (1,28)	8,6 (2,2)	16,4 (2,1)	-0,42 (1,43)
1,5 (1,51 $\pm$ 0,08)	13	80,9 (7,0)	-0,24 (2,49)	10,9 (3,2)	16,4 (1,7)	-0,20 (1,15)
2 (1,97 $\pm$ 0,10)	16	83,6 (6,4)	-1,16 (1,96)	11,8 (1,7)	16,6 (1,6)	0,29 (1,10)
2,5 (2,50 $\pm$ 0,12)	13	90,4 (6,1)	-0,75 (2,14)	12,9 (3,9)	16,0 (2,1)	-0,08 (1,60)
3 (3,06 $\pm$ 0,12)	21	96,9 (9,3)	0,29 (2,57)	15,6 (2,8)	16,1 (1,7)	0,30 (1,38)
3,5 (3,54 $\pm$ 0,11)	24	96,7 (8,7)	-1,09 (2,47)	15,8 (4,4)	16,0 (1,7)	0,25 (1,28)
4 (4,00 $\pm$ 0,11)	33	103,1 (9,1)	-0,28 (2,19)	17,3 (5,1)	16,3 (2,0)	0,57 (1,58)

**Tab. 6 - Übersicht der Wachstumsparameter der untersuchten männlichen Probanden** (Größe, Größe (SDS), Gewicht, BMI, BMI (SDS) (Median (IQR))).

Alter (Jahren)	N	Größe (cm)	Größe (SDS)	Gewicht (kg)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	BMI (SDS)
0	5	54,5 (6,4)		4,5 (2,0)	15,2 (5,4)	
0,5	6	68,2 (5,9)	-0,09 (2,44)	8,3 (2,3)	18,6 (2,5)	0,96 (1,45)
1	7	73,8 (5,3)	-1,13 (2,18)	8,8 (2,4)	16,5 (2,4)	-0,43 (1,65)
1,5	5	84,5 (9,8)	0,57 (3,43)	12,1 (3,4)	16,1 (1,6)	-0,41 (1,21)
2	7	86,7 (10,2)	-0,49 (3,26)	12,6 (2,8)	16,6 (1,3)	0,21 (1,01)
2,5	4	89,0 (3,9)	-1,18 (1,19)	12,8 (3,7)	16,1 (3,1)	-0,02 (2,66)
3	14	97,5 (8,3)	0,10 (2,33)	15,1 (3,2)	16,1 (1,9)	0,12 (1,53)
3,5	15	97,3 (7,9)	-0,97 (2,06)	15,8 (4,4)	15,9 (2,0)	0,12 (1,53)
4	18	104,0 (8,4)	-0,14 (2,04)	17,9 (5,8)	16,2 (3,1)	0,51 (0,30)

**Tab. 7 - Übersicht der Wachstumsparameter der untersuchten weiblichen Probanden**  
 (Größe, Größe (SDS), Gewicht, BMI, BMI (SDS) (Median (IQR))).

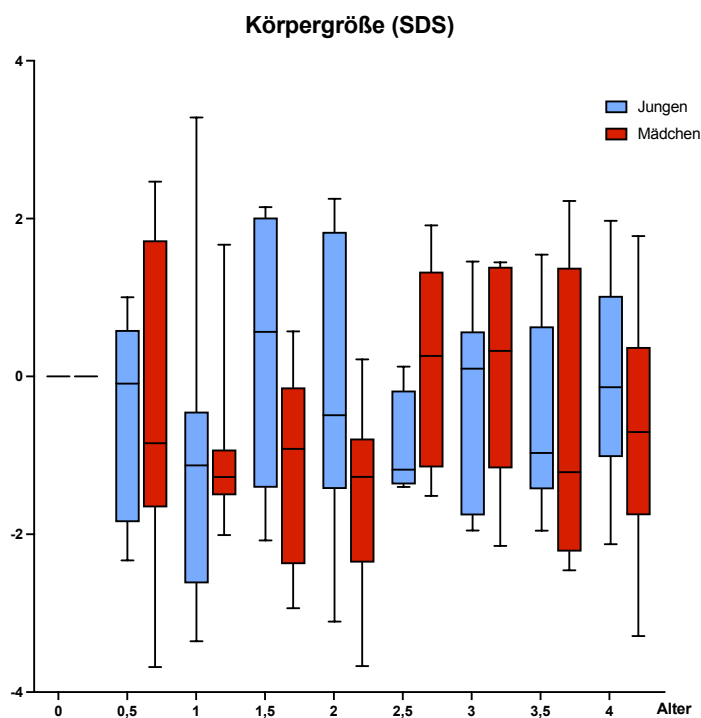
Alter (Jahren)	N	Größe (cm)	Größe (SDS)	Gewicht (kg)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	BMI (SDS)
0	5	56,1 (4,8)		5,0 (1,0)	15,5 (2,3)	
0,5	8	64,4 (8,5)	-0,85 (3,38)	6,7 (2,5)	15,7 (2,5)	-0,51 (1,76)
1	7	71,8 (1,5)	-1,27 (0,58)	8,4 (2,2)	16,2 (2,0)	-0,31 (1,47)
1,5	8	79,0 (6,3)	-0,92 (2,24)	10,4 (2,9)	16,7 (1,9)	0,26 (1,42)
2	9	82,8 (4,9)	-1,27 (1,57)	11,3 (2,3)	16,5 (2,5)	0,37 (1,69)
2,5	9	92,2 (8,3)	0,26 (2,48)	14,1 (4,4)	15,7 (2,1)	-0,37 (1,60)
3	7	96,9 (9,1)	0,32 (2,56)	15,8 (2,9)	16,8 (2,0)	0,80 (1,34)
3,5	9	95,2 (13,6)	-1,21 (3,60)	16,4 (4,6)	16,4 (1,7)	0,57 (1,05)
4	15	100,7 (8,5)	-0,71 (2,13)	16,2 (4,1)	16,4 (2,2)	0,47 (1,62)

## Körpergröße und Körpergröße in SDS

Die Körpergröße in SDS, unterschieden nach dem Geschlecht, ist in Abbildung 5 veranschaulicht.

Abgesehen von den 1,5-Jährigen ( $p=0,04$ ) gab es keine signifikanten Größenunterschiede zwischen Mädchen und Jungen. (Tab. 6 – 7 und Anhang 1, Tab. 1 – 2).

Unter Betrachtung der Körpergröße in SDS zeigte sich in keiner der untersuchten Altersgruppen ein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern. Bei den 0-Jährigen war die Berechnung der Körpergröße in SDS aufgrund fehlender Daten der KiGGS-Studie nicht möglich (Tab. 6 – 7 und Anhang 1, Tab. 3 – 4).



**Abb. 5 - Box-Whisker-Plot der Körpergröße (SDS), unterschieden nach Alter (in Jahren) unterteilt nach männlichem (blau) und weiblichem (rot) Geschlecht (n = 60).**

*Keine signifikanten Unterschiede zw. den Geschlechtern.*

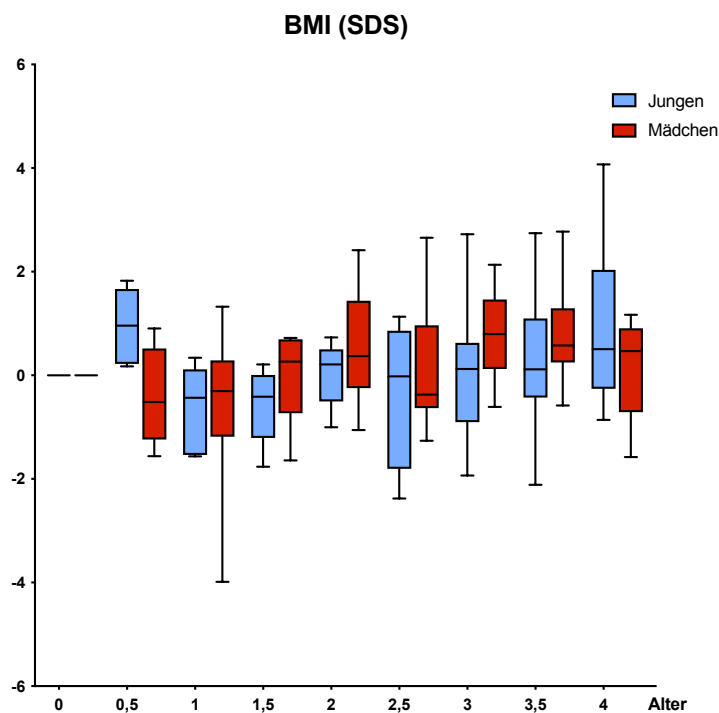
*Strich innerhalb der Box: Median, Begrenzung durch unteres bzw. oberes Quartil; Whisker: Minimum bzw. Maximum*

## Body-Mass-Index (BMI) und BMI in SDS

Die Abbildung 6 zeigt den BMI in SDS, differenziert nach Geschlecht.

Bei der Analyse des Body-Mass-Index (BMI) zeigte sich bei den 0,5-Jährigen, dass Jungen im Vergleich zu Mädchen einen signifikant höheren BMI von 18,6 kg/m<sup>2</sup> aufwiesen ( $p=0,002$ ) (Tab. 6 – 7 und Anhang 1, Tab. 7 – 8). In den restlichen Altersgruppen wurden dagegen keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

In Bezug auf den BMI in SDS ergab sich ebenfalls nur bei den 0,5-Jährigen Jungen ein signifikant höherer Wert im Vergleich zu Mädchen ( $p=0,009$ ) (Tab. 6 – 7 und Anhang 1, Tab. 9 – 10). Aufgrund fehlender Daten der KiGGS-Studie war eine Berechnung des BMI in SDS für die 0-Jährigen nicht möglich.



**Abb. 6 - Box-Whisker-Plot des BMI (SDS), unterschieden nach Alter (in Jahren) unterteilt nach männlichem (blau) und weiblichem (rot) Geschlecht (n = 60).**

*Bis auf die Gruppe der 0,5-Jährigen ( $p=0,009$ ) kein signifikanter Unterschied zw. Jungen und Mädchen.*

*Strich innerhalb der Box: Median, Begrenzung durch unteres bzw. oberes Quartil; Whisker: Minimum bzw. Maximum*

## Beschreibung des Patientenkollektivs hinsichtlich der Medikation

In den Tabellen 8 – 10 sind die Daten zur Medikation unabhängig sowie unterschieden nach Geschlecht dargestellt.

Die Probanden der Gruppe waren im Mittel  $2,27 \pm 1,32$  Jahre alt (Bereich: 0,05 – 4,23). Die Hydrocortison-Tagesdosis betrug im Median  $12,1 \text{ mg/m}^2/\text{d}$  (Bereich: 4,9 –  $32,0 \text{ mg/m}^2/\text{d}$ ) und die Fludrocortison-Tagesdosis im Median  $116 \text{ }\mu\text{g/m}^2/\text{d}$  (Bereich: 30 –  $825 \text{ }\mu\text{g/m}^2/\text{d}$ ) bei einer Körperoberfläche von  $0,55 \text{ m}^2$  (Bereich: 0,19 –  $0,87 \text{ m}^2$ ) (Median).

Nach Geschlecht differenziert zeigte sich, dass die Hydrocortison-Dosierung bei den Mädchen im Vergleich zu den Jungen im Alter von 0 Jahren höher lag. Mit 1 Jahr war die Dosierung bei den Mädchen im Vergleich zu den Jungen dann um  $1,7 \text{ mg/m}^2/\text{d}$  niedriger. In der Gruppe der 2- bis 3-Jährigen erhielten Mädchen erneut höhere Hydrocortison-Tagesdosen als Jungen (Tab. 9 – 10).

Für die Fludrocortison-Tagesdosis ergaben sich bei den Jungen im Vergleich zu den Mädchen niedrigere Werte in der Gruppe der 1- bis 1,5-Jährigen. Ab der Gruppe der 2-Jährigen waren die Dosierungen für Jungen dann durchweg höher (Tab. 9 – 10).

Bezogen auf die Körperoberfläche (BSA) zeigten sich im Alter von 1 bis 2 Jahren niedrigere Werte für die Mädchen (Tab. 9 – 10).

**Tab. 8 - Übersicht der Medikation aller untersuchten Probanden** (Hydrocortison-Tagesdosis, Fludrocortison-Tagesdosis, BSA (Median (IQR))).

Alter (MW $\pm$ SD (Jahren))	N	Mediane Hydrocortison- Tagesdosis ( $\text{mg/m}^2/\text{d}$ ) (IQR)	Mediane Fludrocortison- Tagesdosis ( $\mu\text{g/m}^2/\text{d}$ ) (IQR)	Mediane BSA ( $\text{m}^2$ ) (IQR)
0 (0,12 $\pm$ 0,06)	29	14,9 (6,1)	385 (170)	0,26 (0,06)
0,5 (0,52 $\pm$ 0,12)	27	13,5 (3,6)	241 (223)	0,37 (0,06)
1 (1,02 $\pm$ 0,11)	24	11,7 (3,1)	121 (117)	0,43 (0,05)
1,5 (1,49 $\pm$ 0,10)	22	11,8 (2,6)	121 (132)	0,49 (0,08)
2 (1,96 $\pm$ 0,11)	23	12,8 (2,9)	108 (97)	0,53 (0,04)
2,5 (2,52 $\pm$ 0,11)	28	11,8 (3,0)	89 (64)	0,58 (0,11)
3 (3,04 $\pm$ 0,13)	29	11,4 (3,3)	82 (65)	0,65 (0,09)
3,5 (3,53 $\pm$ 0,12)	34	12,2 (2,7)	81 (36)	0,67 (0,11)
4 (4,01 $\pm$ 0,12)	43	11,6 (3,1)	78 (70)	0,69 (0,09)

**Tab. 9 - Übersicht der Medikation aller untersuchten männlichen Probanden**  
(Hydrocortison-Tagesdosis, Fludrocortison-Tagesdosis, BSA (Median (IQR))).

Alter (MW ± SD (Jahren))	N	Mediane Hydrocortison- Tagesdosis (mg/m <sup>2</sup> /d) (IQR)	Mediane Fludrocortison- Tagesdosis (µg/m <sup>2</sup> /d) (IQR)	Mediane BSA (m <sup>2</sup> ) (IQR)
0 (0,11 ± 0,07)	11	14,6 (6,8)	380 (332)	0,26 (0,07)
0,5 (0,49 ± 0,09)	13	13,7 (5,6)	226 (275)	0,37 (0,05)
1 (1,02 ± 0,13)	12	13,7 (5,6)	120 (98)	0,44 (0,06)
1,5 (1,51 ± 0,08)	9	12,0 (2,7)	100 (161)	0,52 (0,10)
2 (1,97 ± 0,10)	12	12,8 (2,7)	98 (103)	0,55 (0,08)
2,5 (2,50 ± 0,12)	17	11,2 (3,2)	89 (70)	0,58 (0,11)
3 (3,06 ± 0,12)	18	11,2 (3,0)	92 (63)	0,65 (0,12)
3,5 (3,54 ± 0,11)	19	12,3 (2,4)	88 (31)	0,66 (0,11)
4 (4,01 ± 0,12)	22	11,7 (2,0)	92 (47)	0,70 (0,17)

**Tab. 10 - Übersicht der Medikation aller untersuchten weiblichen Probanden**  
(Hydrocortison-Tagesdosis, Fludrocortison-Tagesdosis, BSA (Median (IQR))).

Alter (MW ± SD (Jahren))	N	Mediane Hydrocortison- Tagesdosis (mg/m <sup>2</sup> /d) (IQR)	Mediane Fludrocortison- Tagesdosis (µg/m <sup>2</sup> /d) (IQR)	Mediane BSA (m <sup>2</sup> ) (IQR)
0 (0,13 ± 0,06)	9	15,4 (5,0)	385 (143)	0,26 (0,07)
0,5 (0,52 ± 0,13)	14	13,3 (3,3)	242 (172)	0,37 (0,07)
1 (1,01 ± 0,11)	12	12,0 (3,6)	160 (165)	0,42 (0,05)
1,5 (1,48 ± 0,13)	13	11,5 (2,6)	146 (123)	0,46 (0,08)
2 (1,97 ± 0,12)	11	13,0 (2,3)	88 (61)	0,52 (0,05)
2,5 (2,54 ± 0,09)	11	12,4 (3,5)	77 (58)	0,57 (0,09)
3 (3,02 ± 0,14)	11	11,7 (3,9)	76 (58)	0,65 (0,08)
3,5 (3,52 ± 0,14)	15	12,0 (4,2)	76 (77)	0,67 (0,09)
4 (4,01 ± 0,13)	21	11,6 (4,5)	75 (68)	0,67 (0,08)

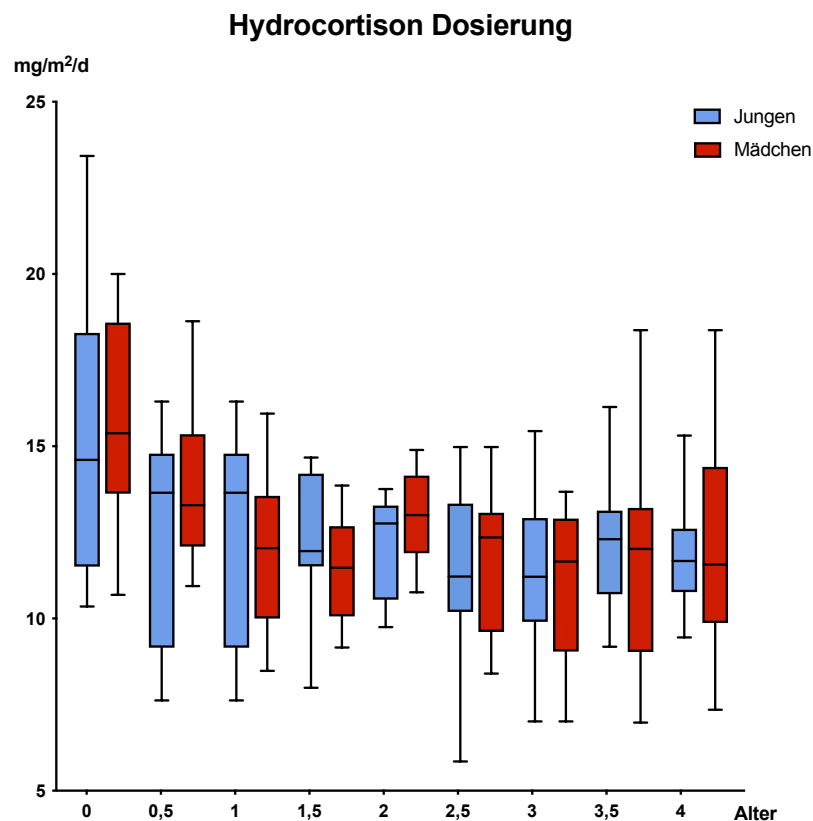
## Hydrocortison Dosierung

Die Hydrocortison Dosierung pro Tag betrug in der Altersgruppe von 0 Jahren (jeweils im Median) 14,6 (♂) bzw. 15,4 mg/m<sup>2</sup>/d (♀) (Abb. 7 und Tab. 9 – 10).

Anschließend zeigte sich eine schrittweise Reduktion der Hydrocortison-Tagesdosis von 13,7 (♂) bzw. 13,3 mg/m<sup>2</sup>/d (♀) in der Gruppe von 0,5 Jahren auf 12,0 (♂) bzw. 11,5 mg/m<sup>2</sup>/d (♀) in der Altersgruppe von 1,5 Jahren (Abb. 7 und Tab. 9 – 10).

In den nachfolgenden Altersgruppen stabilisierte sich die Hydrocortison Dosierung. Bei den männlichen Probanden erfolgte dies ab der Altersgruppe der 2,5- bzw. 3-Jährigen bei einem Wert im Median von 11,2 mg/m<sup>2</sup>/d und bei den weiblichen Probanden ab der Altersgruppe der 2-Jährigen bei einem Wert von 13,0 mg/m<sup>2</sup>/d. (Abb. 7 und Tab. 9 – 10).

Die Hydrocortison Dosierung zeigte bei Mädchen signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen ( $p=0,009$ ), wohingegen bei Jungen keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden ( $p=0,19$ ) (Abb. 7 und Tab. 9 – 10).



**Abb. 7 – Box-Whisker-Plot der Hydrocortison Dosierung pro Tag (in mg/m<sup>2</sup>/d), unterschieden nach Alter (in Jahren) unterteilt nach männlichem (blau) und weiblichem (rot) Geschlecht (n = 68).**

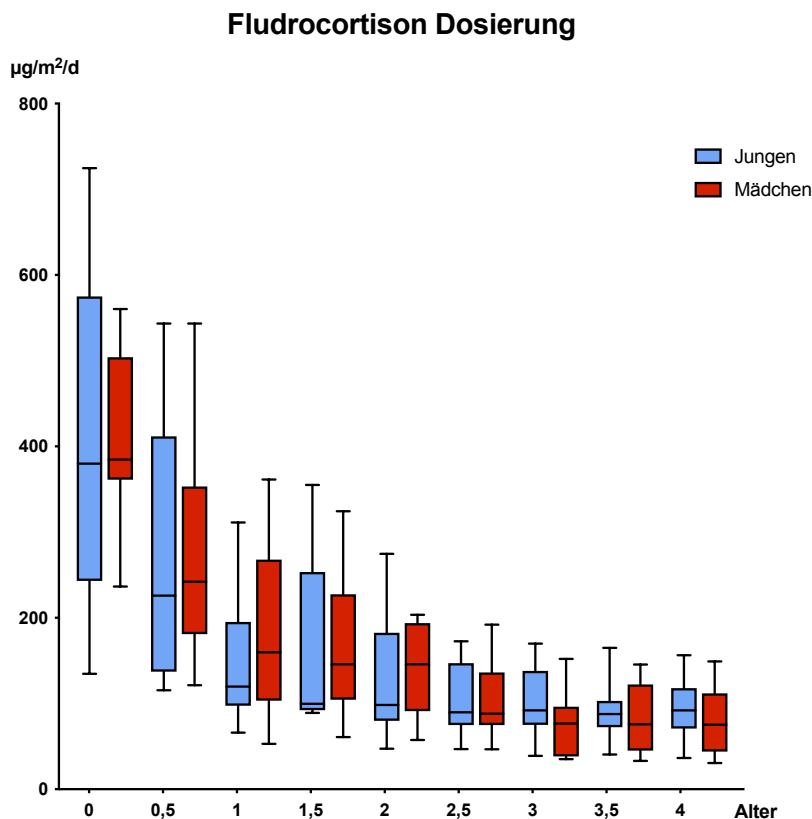
*Signifikante Unterschiede zw. den Altersgruppen bei Mädchen ( $p=0,009$ ), nicht bei Jungen.*

*Strich innerhalb der Box: Median, Begrenzung durch unteres bzw. oberes Quartil; Whisker: Minimum bzw. Maximum*

## Fludrocortison Dosierung

Die Fludrocortison-Dosis pro Tag nahm ausgehend von einer Anfangsdosis mit 0 Jahren von 380 (♂) bzw. 385  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{d}$  (♀) (jeweils im Median) über 226 (♂) bzw. 242  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{d}$  (♀) im Alter von 0,5 Jahren und 120 (♂) bzw. 160  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{d}$  (♀) im Alter von 1 Jahr schrittweise ab. Ab einem Alter von 2,5 Jahren stabilisierte sich diese dann auf Werte zwischen 75 (♀) und 90  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{d}$  (♂) (Abb. 8 und Tab. 9 – 10).

Die Fludrocortison-Tagesdosis unterschied sich signifikant zwischen den Altersgruppen der Mädchen ( $p < 0,0001$ ) und auch der Jungen ( $p < 0,0001$ ) (Abb. 8 und Tab. 9 – 10).



**Abb. 8 - Box-Whisker-Plot der Fludrocortison Dosierung pro Tag (in  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{d}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unterteilt nach männlichem (blau) und weiblichem (rot) Geschlecht (n = 68).**

*Signifikante Unterschiede zw. den Altersgruppen der Mädchen ( $p < 0,0001$ ) als auch der Jungen ( $p < 0,0001$ ).*

*Strich innerhalb der Box: Median, Begrenzung durch unteres bzw. oberes Quartil; Whisker: Minimum bzw. Maximum*

## 4.1.2 Beschreibung der Steroidmetabolite im Verlauf

### Androgen-Metabolite

Die Tabelle 11 zeigt die logarithmierten Konzentrationen der Androgen-Metabolite im Urin, betrachtet in der Gesamtsumme, als auch differenziert zwischen den einzelnen Steroidmetaboliten.

Die Summe der Androgen-Metabolite setzte sich aus den einzelnen Konzentrationen von An, Et, 11-OH-An, A5T-16a zusammen.

Die Analyse der summierten Androgen-Metabolite im Urin ergab einen initialen Rückgang in den Altersgruppen bis 1 Jahr, gefolgt von einem Anstieg der Konzentrationen (Tab. 11).

Die Konzentrationen von Androsteron (An) und Etiocholanolon (Et) lagen im Median bis zum Alter von 1 bzw. 1,5 Jahren unterhalb der Nachweisgrenze und wurden daher durch einen zuvor definierten Wert von 3,125 µg/l ersetzt (Anhang 2, Tab. 15 – 16).

11β-Hydroxyandrosteron (11-OH-An) war der dominierende Urin-Androgen-Metabolit. Dessen Konzentrationen übertrafen jene von Androsteron in manchen Altersgruppen um etwa den Faktor 10 (Anhang 2, Tab. 15 und 25).

**Tab. 11 Androgen-Metabolit-Konzentrationen des untersuchten Patientenkollektivs unter Behandlung mit Hydrocortison und Fludrocortison.**

Altersgruppe (Jahren)	An (MW ± SD (log (µg/l)))	Et (MW ± SD (log (µg/l)))	11-OH-An (MW ± SD (log (µg/l)))	A5T-16a (MW ± SD (log (µg/l)))	Σ Androgen Metabolite (MW ± SD (log (µg/l)))
0	0,882 ± 0,657*	0,712 ± 0,360	1,895 ± 0,677	2,087 ± 0,299	1,394 ± 0,498
0,5	0,882 ± 0,552*	0,787 ± 0,493*	1,767 ± 0,702*	1,314 ± 0,625*	1,188 ± 0,593
1	0,794 ± 0,450	0,721 ± 0,329*	1,886 ± 0,781	0,851 ± 0,080	1,063 ± 0,410
1,5	1,180 ± 0,640	1,070 ± 0,567	2,057 ± 0,651	1,097 ± 0,411*	1,351 ± 0,567
2	1,165 ± 0,624	1,096 ± 0,578	1,794 ± 0,699	0,790 ± 0,0678	1,211 ± 0,492
2,5	1,329 ± 0,652	1,275 ± 0,614	1,993 ± 0,682	0,790 ± 0,0678	1,346 ± 0,504
3	1,264 ± 0,672	1,205 ± 0,614	2,047 ± 0,739	1,141 ± 0,3484	1,414 ± 0,594
3,5	1,329 ± 0,637	1,317 ± 0,607	2,101 ± 0,604	0,985 ± 0,247*	1,433 ± 0,524
4	1,437 ± 0,680	1,403 ± 0,613	2,282 ± 0,686	0,9843 ± 0,208	1,526 ± 0,547

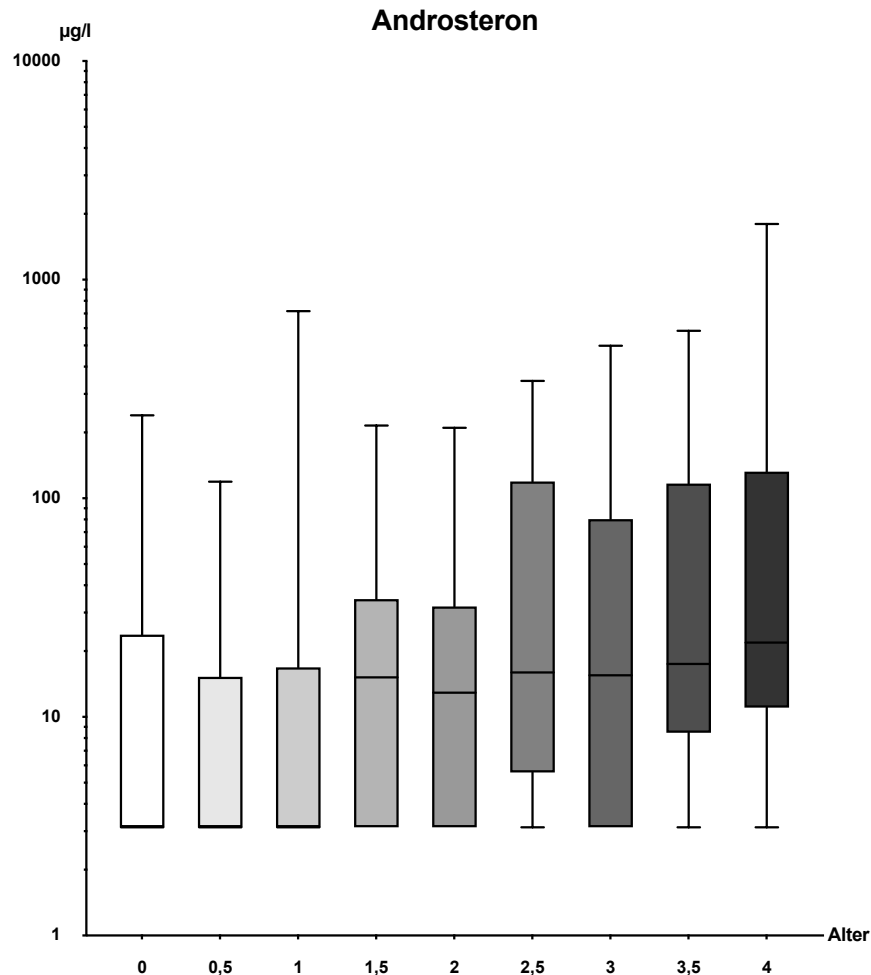
Σ ≙ Summe der Androgen Metabolite (An, Et, 11-OH-An, A5T-16a)

\*≙ Daten, die trotz dekadischer Logarithmierung zur Herstellung einer Standardnormalverteilung nicht standardnormalverteilt sind.

## Androsteron

Die Androsteron-Konzentrationen (An) im Urin lagen bis einschließlich des 1. Lebensjahres im Median unterhalb der Nachweisgrenze.

Anschließend zeigte sich eine Zunahme der Konzentration im Urin, insbesondere nach dem 1. Lebensjahr (Abb. 16 und Anhang 2, Tab. 15).



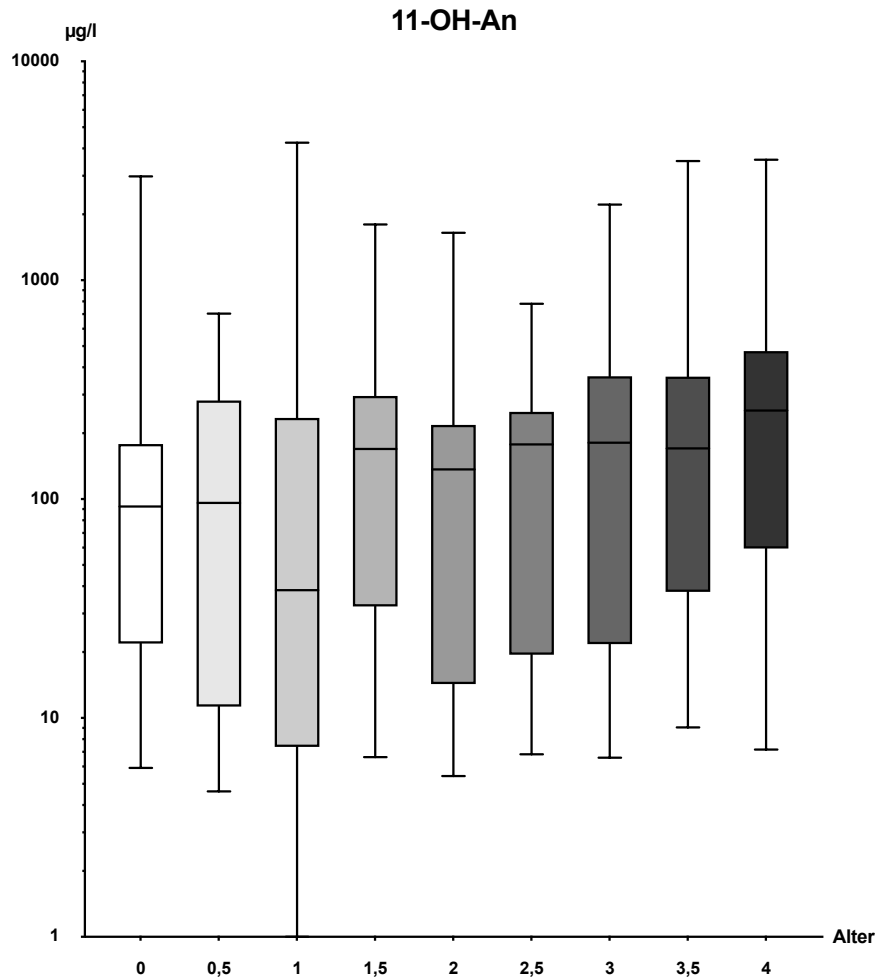
**Abb. 9 - Box-Whisker-Plot zu An (Androsteron) (5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

*Werte bis 1 Jahr unterhalb der Nachweisgrenze, mit anschließender Zunahme der Konzentration.*

## 11-OH-An

Die 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron-Konzentrationen im Urin zeigten in den ersten sechs Monaten einen annähernd konstanten Verlauf und fielen dann mit 1 Jahr von im Median 96,16 auf 38,37  $\mu\text{g/l}$  ab (Abb. 10 und Anhang 2, Tab. 25).

Mit 1,5 Jahren stiegen sie deutlich an und blieben bis zum Alter von 3,5 Jahren nahezu konstant. In der Altersgruppe der 4-Jährigen zeigte sich ein erneuter leichter Anstieg (Abb. 10 und Anhang 2, Tab. 25).



**Abb. 10 - Box-Whisker-Plot zu 11-OH-An (11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron) (5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -diol-17-on) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

*Abfall der Konzentration im Alter von 1 Jahr, anschließender Anstieg und nachfolgend annähernde Konstanz der Werte.*

## 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron-Metabolite

Tabelle 12 zeigt die logarithmierten Konzentrationen der 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron-Metabolite im Urin, dargestellt in der Gesamtsumme, als auch differenziert nach den einzelnen Steroidmetaboliten.

Die Summe der 17-OHP-Metabolite wurde aus den Konzentrationen von Po-5b,3a, Po-5a,3a, PT und 11-O-PT berechnet.

Im 1. Lebensjahr fiel die Summe der 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron-Metabolit-Konzentration im Urin ab. Danach blieben die Konzentrationen bis zum Alter von 3,5 Jahren nahezu konstant. In der Altersgruppe der 4-Jährigen zeigte sich dann ein leichter Anstieg (Tab. 12).

**Tab. 12 – log. 17-OHP-Metabolit-Konzentrationen des untersuchten Patientenkollektivs unter Behandlung mit Hydrocortison und Fludrocortison.**

Altersgruppe (Jahren)	Po-5b,3a (MW $\pm$ SD (log ( $\mu$ g/l)))	Po-5a,3a (MW $\pm$ SD (log ( $\mu$ g/l)))	PT (MW $\pm$ SD (log ( $\mu$ g/l)))	11-O-PT (MW $\pm$ SD (log ( $\mu$ g/l)))	$\Sigma$ 17-OHP Metabolite (MW $\pm$ SD (log ( $\mu$ g/l)))
0	2,335 $\pm$ 0,829	2,006 $\pm$ 0,701*	2,416 $\pm$ 0,635	2,657 $\pm$ 0,825	2,354 $\pm$ 0,747
0,5	1,955 $\pm$ 0,808	1,618 $\pm$ 0,767*	2,181 $\pm$ 0,814	1,738 $\pm$ 0,150*	1,873 $\pm$ 0,885
1	1,824 $\pm$ 0,879	1,397 $\pm$ 0,562	2,265 $\pm$ 0,898	1,812 $\pm$ 1,073	1,825 $\pm$ 0,853
1,5	2,126 $\pm$ 0,782	1,660 $\pm$ 0,737	2,549 $\pm$ 0,776	2,037 $\pm$ 0,962	2,093 $\pm$ 0,814
2	1,883 $\pm$ 0,738	1,253 $\pm$ 0,481	2,321 $\pm$ 0,690	1,803 $\pm$ 0,806*	1,815 $\pm$ 0,679
2,5	2,132 $\pm$ 0,728	1,485 $\pm$ 0,582	2,52 $\pm$ 0,744	2,002 $\pm$ 0,815	2,03475 $\pm$ 0,717
3	2,187 $\pm$ 0,916	1,583 $\pm$ 0,729	2,454 $\pm$ 1,101	2,146 $\pm$ 0,975	2,0925 $\pm$ 0,930
3,5	2,171 $\pm$ 0,738	1,458 $\pm$ 0,575*	2,625 $\pm$ 0,650	2,045 $\pm$ 0,803	2,075 $\pm$ 0,691
4	2,387 $\pm$ 0,930	1,674 $\pm$ 0,748	2,766 $\pm$ 0,856	2,333 $\pm$ 0,905	2,290 $\pm$ 0,860

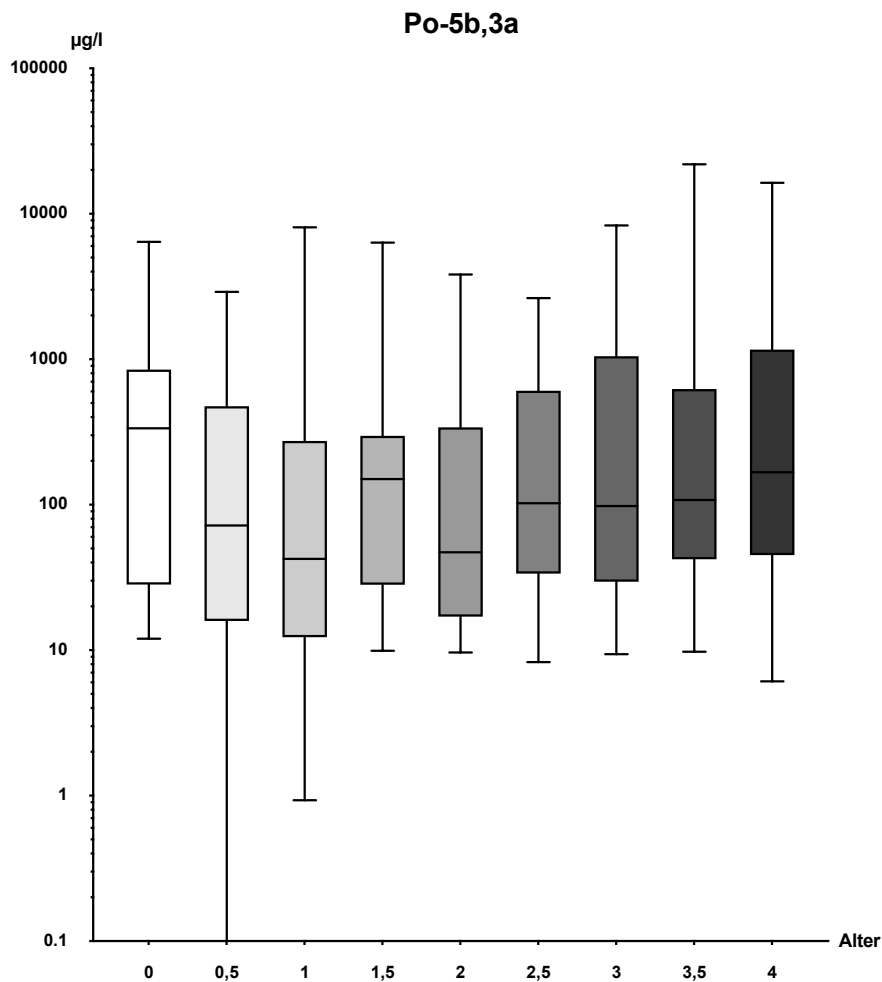
$\Sigma \triangleq$  Summe der 17-OHP-Metabolite (Po-5b,3a, Po-5a,3a, PT, 11-O-PT)

\* $\triangleq$  Daten, die trotz dekadischer Logarithmierung zur Herstellung einer Standardnormalverteilung nicht standardnormalverteilt sind.

## Po-5b,3a

Die Konzentration von  $17\alpha$ -OH-Pregnanolon (Po-5b,3a) im Urin fiel im 1. Lebensjahr deutlich von 335 auf 42,4  $\mu\text{g/l}$  ab (Median) (Abb. 11 und Anhang 2, Tab. 24).

Ab der Altersgruppe der 1,5-Jährigen schwankte die  $17\alpha$ -OH-Pregnanolon-Konzentration dann im Median zw. 47,07 und 167,3  $\mu\text{g/l}$ , mit einer Tendenz zur Zunahme zwischen dem 2. bis 4. Lebensjahr (Abb. 11 und Anhang 2, Tab. 24).

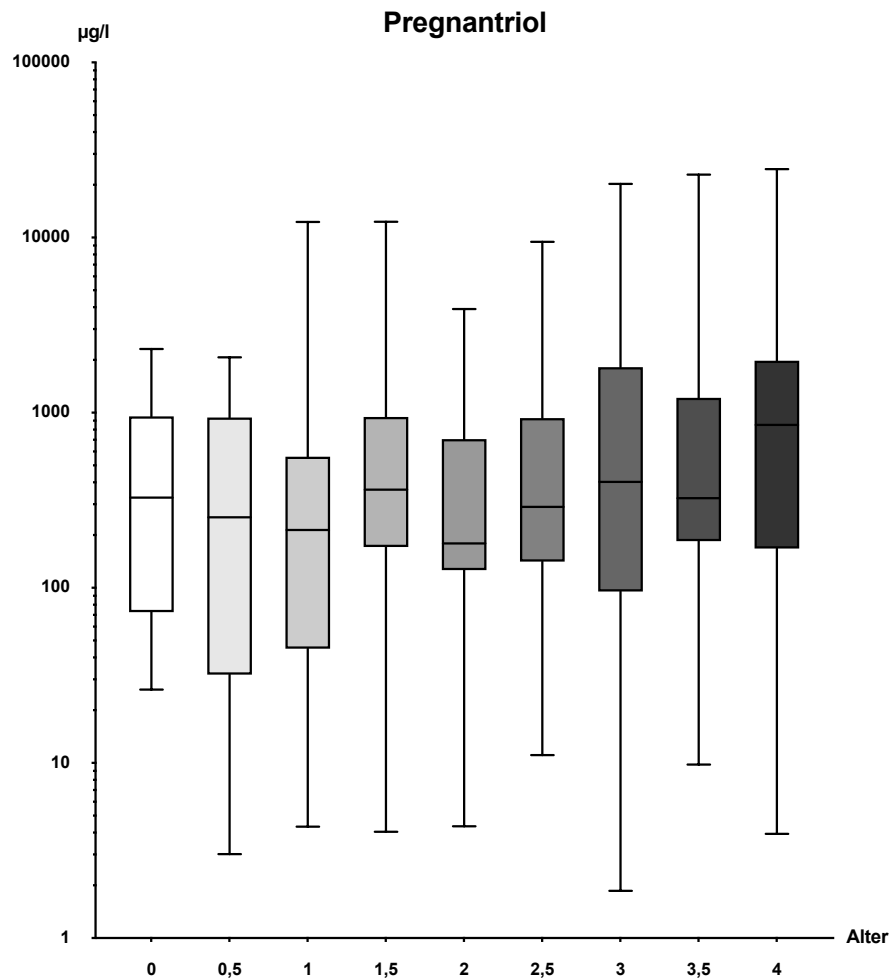


**Abb. 11 - Box-Whisker-Plot zu Po-5b,3a ( $17\alpha$ -OH-Pregnanolon) ( $5\beta$ -Pregnan- $3\alpha,17\alpha$ -diol- $20$ -on) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

*Abfall der Konzentration innerhalb des 1. Lebensjahres, mit Tendenz zur Zunahme zw. dem 2.-4. Lebensjahr.*

## Pregnantriol

Die Urinkonzentrationen von Pregnantriol (PT) zeigten innerhalb der betrachteten Altersgruppen einen annähernd konstanten Verlauf zwischen im Median 179,1 und 403,1  $\mu\text{g/l}$  (Abb. 12 und Anhang 2, Tab. 30).

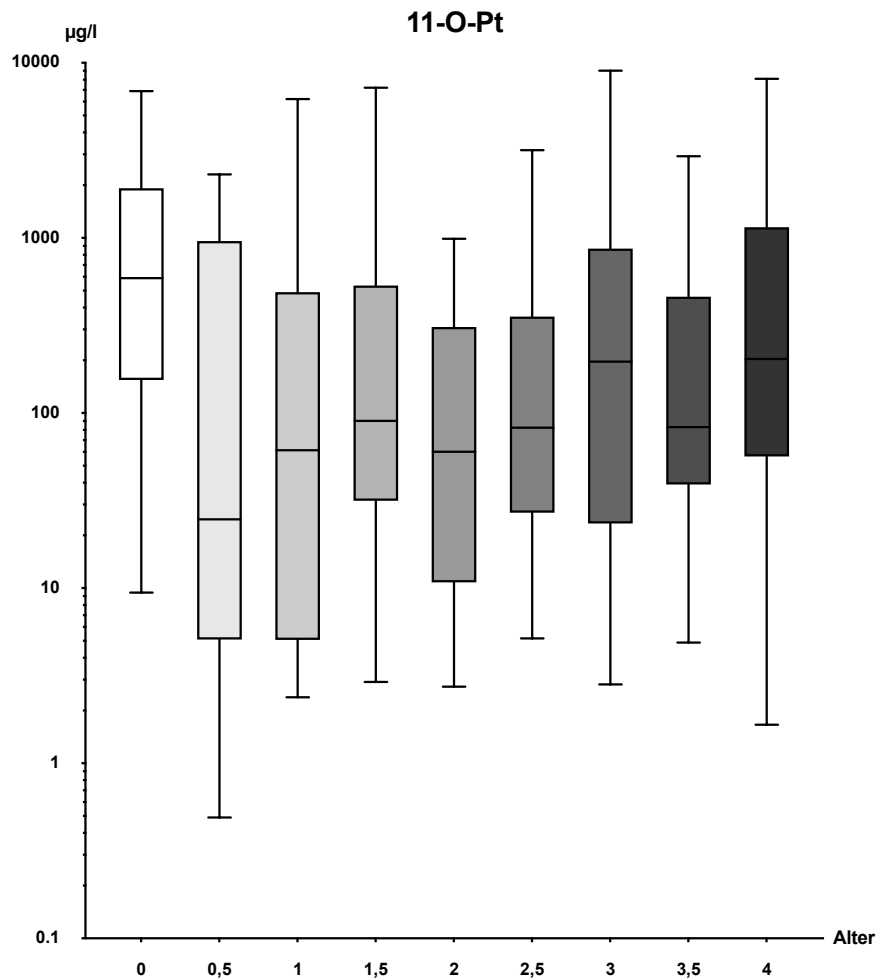


**Abb. 12 - Box-Whisker-Plot zu PT (Pregnantriol) ( $5\beta$ -Pregnan- $3\alpha,17\alpha,20\alpha$ -triol) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

*Relativ konstanter Verlauf der Konzentrationen.*

## 11-O-Pt

Die 11-Ketopregnanetriol (11-O-PT)-Konzentrationen im Urin fielen im 1. Lebenshalbjahr stark von im Median, 589,5 auf 24,74 µg/l ab. Anschließend zeigte sich ein leicht progredienter Anstieg (Abb. 13 und Anhang 2, Tab. 36).



**Abb. 13 - Box-Whisker-Plot zu 11-O-PT (11-Ketopregnanetriol) (5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -triol-11-on) (in µg/l), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

*Abfall der Konzentration im 1. Lebenshalbjahr, mit anschließend leichter Progredienz.*

## Cortisol-Metabolite

Die Tabelle 13 zeigt die logarithmierten Cortisol-Metabolit-Konzentrationen im Urin, betrachtet in der Gesamtheit, als auch differenziert anhand der einzelnen Steroidmetabolite.

Die Summe der Cortisol-Metabolite setzte sich aus den einzelnen Konzentrationen von a-THF, THF, THE, a-C, b-C, a-Cl, b-Cl zusammen.

Für die Summe der Cortisol-Metabolit-Konzentrationen im Urin zeigte sich entlang der betrachteten Altersgruppen eine annähernd stetige Progredienz der Konzentration (Tab. 13).

**Tab. 13 – log. Cortisol-Metabolit-Konzentrationen des untersuchten Patientenkollektivs.**

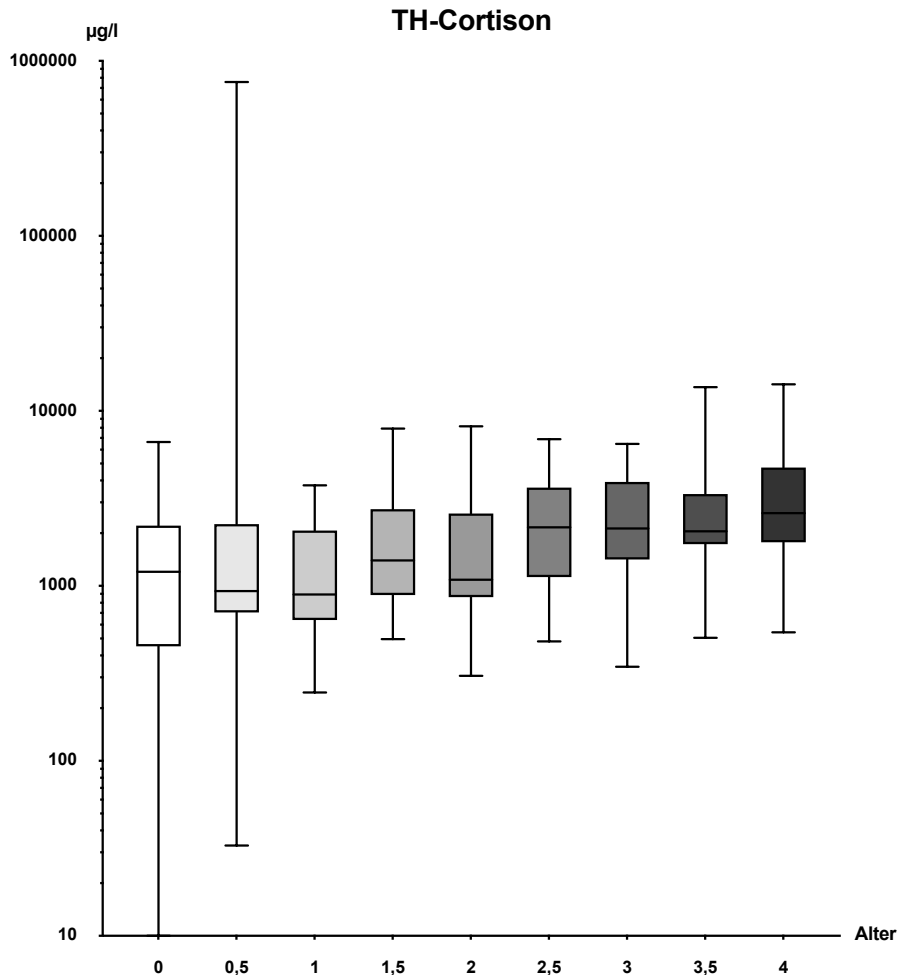
Altersgruppe (Jahren)	THE (MW ± SD (log (µg/l)))	THF (MW ± SD (log (µg/l)))	a-THF (MW ± SD (log (µg/l)))	Σ Cortisol Metabolite (MW ± SD (log (µg/l)))
0	3,061 ± 0,371	1,954 ± 0,504	2,147 ± 0,555	2,110 ± 0,445
0,5	3,125 ± 0,3532	2,694 ± 0,452	3,098 ± 0,377	2,564 ± 0,377
1	3,007 ± 0,339	2,655 ± 0,375	2,995 ± 0,426	2,545 ± 0,366
1,5	3,208 ± 0,319	2,837 ± 0,248	3,064 ± 0,293	2,700 ± 0,273
2	3,140 ± 0,344	2,765 ± 0,408	2,953 ± 0,384	2,579 ± 0,361
2,5	3,291 ± 0,329	2,92 ± 0,292	3,035 ± 0,335	2,720 ± 0,334
3	3,332 ± 0,319	2,936 ± 0,343	2,957 ± 0,458	2,756 ± 0,329
3,5	3,379 ± 0,316	2,978 ± 0,359	3,105 ± 0,411	2,819 ± 0,322
4	3,440 ± 0,302	3,006 ± 0,376	3,136 ± 0,318	2,873 ± 0,299

Σ ≙ Summe der Cortisol Metabolite (a-THF, THF, THE, a-C, b-C, a-Cl, b-Cl)

\* ≙ Daten, die trotz dekadischer Logarithmierung zur Herstellung einer Standardnormalverteilung nicht standardnormalverteilt sind.

## TH-Cortison

Die Urinkonzentration von Tetrahydrocortison (THE) sank von initial 1204  $\mu\text{g/l}$  leicht auf 892,5  $\mu\text{g/l}$  (Median) bei 1-jährigen Kindern ab. Danach stiegen die THE-Konzentrationen im Urin bis zum 4. Lebensjahr an (Abb. 14 und Anhang 2, Tab. 38).

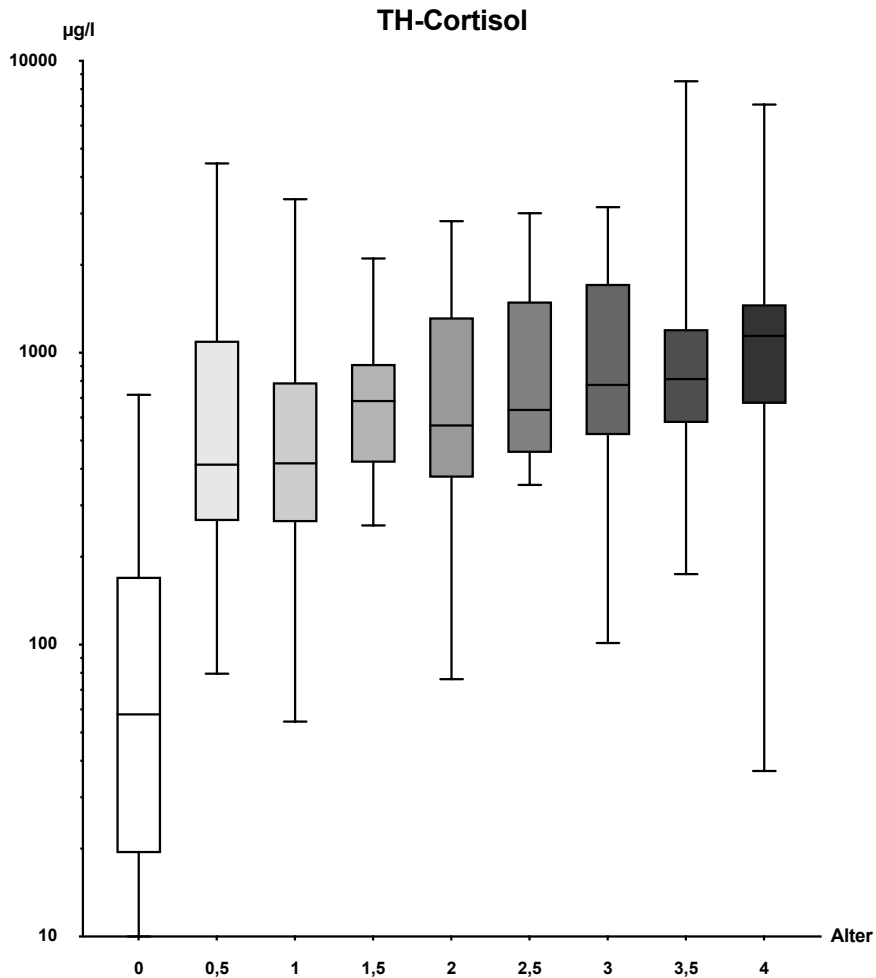


**Abb. 14 - Box-Whisker-Plot zu THE (Tetrahydrocortison) ( $5\beta$ -Pregnan- $3\alpha,17\alpha,21$ -triol- $11,20$ -dion) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

*Abfall der Konzentration bis 1 Jahr, mit anschließendem Anstieg.*

## TH-Cortisol

Die Tetrahydrocortisol-Konzentrationen (THF) im Urin stiegen im 1. Lebenshalbjahr stark von im Median 57,5 auf 414,1  $\mu\text{g/l}$  an. Danach zeigte sich eine steigende Tendenz bis auf einen Wert von 1143  $\mu\text{g/l}$  in der Altersgruppe von 4 Jahren (Abb. 15 und Anhang 2, Tab. 42).



**Abb. 15 - Box-Whisker-Plot zu THF (Tetrahydrocortisol) (5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-tetrol-20-on) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

*Starker Anstieg der Konzentration im 1. Lebenshalbjahr mit anschließend steigender Tendenz.*

## 4.2 Clusteranalyse des Patientenkollektivs

Anhand einer Metabotypisierung konnten aus den gegebenen Daten drei klar differenzierbare Cluster gebildet werden, welche jeweils eine einzigartige Signatur ihrer Steroidmetabolite aufwiesen (Tab. 14). Dabei spiegelt die Einteilung in 3 Cluster auch die zu erwartende Einteilung in die drei Gruppen der unter-, adäquat und übertherapierten Patienten wider.

**Tab. 14 - K-means-Cluster-Einteilung der Probanden.**

Cluster 1 (n = 15)	AGS073, AGS159, AGS204, AGS021, AGS035, AGS193, AGS202, AGS301, AGS303, AGS313, AGS019, AGS020, AGS154, AGS158, AGS181
Cluster 2 (n = 28)	AGS014, AGS078, AGS111, AGS212, AGS236, AGS072, AGS160, AGS243, AGS309, AGS056, AGS168, AGS175, AGS256, AGS265, AGS292, AGS312, AGS033, AGS045, AGS086, AGS148, AGS152, AGS170, AGS174, AGS235, AGS239, AGS257, AGS258, AGS262
Cluster 3 (n = 17)	AGS136, AGS171, AGS025, AGS114, AGS123, AGS132, AGS147, AGS165, AGS167, AGS177, AGS026, AGS119, AGS166, AGS194, AGS209, AGS276, AGS310

*n*  $\hat{=}$  Anzahl der Probanden im jeweiligen Cluster

AGS014-AGS312  $\hat{=}$  anonymisierte Probandennamen

Zur Darstellung der Cluster wurde die tabellarische (Tab. 15) sowie die grafische Form als Heatmap (Abb. 16) verwendet.

Die einzelnen Cluster lassen sich folgendermaßen charakterisieren:

Das Cluster 1 umfasste 25 % der Patienten (n = 15) mit einem Altersmedian von  $2,9 \pm 1,4$  Jahren und einem Anteil von 47 % weiblichen Patienten (Tab. 15).

In Bezug auf die Steroidmetabolit-Konzentrationen im Urin zeigten sich hohe Androgen- und 17-OHP-Konzentrationen (Tab. 15).

Die Körpergröße betrug im Median  $95,6 \pm 15,9$  cm, das Gewicht  $15,4 \pm 6,7$  kg.

Sowohl die Körpergröße-SDS, der BMI-SDS als auch die Wachstumsgeschwindigkeit in SDS lagen im Normalbereich (Tab. 15).

Die Hydrocortison-Tagesdosis betrug im Median  $12,2 \pm 3,1$  mg/m<sup>2</sup>/d. Die Verteilung der Hydrocortison-Dosis zwischen morgendlicher und abendlicher Hydrocortison-Gabe lag bei  $2,0 \pm 0,9$ . Für die Fludrocortison-Tagesdosis ergab sich ein Wert im Median von  $88,2 \pm 94,7$  µg/m<sup>2</sup>/d (Tab. 15).

Das anteilig größte Cluster bildete das Cluster 2 mit 47 % der Patienten (n = 28) bei einem Alter im Median von  $3,4 \pm 1,9$  Jahren und prozentual 43 % weiblichen Patienten (Tab. 15).

Hinsichtlich der Konzentrationen der Steroidmetabolite zeigten sich für die Androgen- und 17-OHP-Metabolite sowie Cortisol- und Cortison-Metabolite im Urin mittlere Konzentrationen mit Werten zwischen Cluster 1 und 3 (Tab. 15).

Die Körpergröße betrug im Median  $98,0 \pm 15,9$  cm, das Gewicht  $15,6 \pm 6,2$  kg.

Körpergröße-SDS, BMI-SDS und Wachstumsgeschwindigkeit in SDS befanden sich im Normalbereich (Tab. 15).

Die Hydrocortison-Dosis betrug im Median  $12,3 \pm 2,4$  mg/m<sup>2</sup>/d, mit einer Verteilung zw. morgendlicher und abendlicher HC-Dosis von  $2,0 \pm 1,0$ . Die Fludrocortison-Dosis lag bei  $101,6 \pm 60,9$  µg/m<sup>2</sup>/d (Tab. 15).

Das Cluster 3 umfasste 28 % der Patienten (n = 17) mit einem Altersmedian von  $3,4 \pm 0,8$  Jahren und einem Anteil von 59 % weiblichen Patienten (Tab. 15).

Die Steroidmetabolit-Konzentrationen im Urin zeigten niedrige Werte für Androgen-, Cortisol und 17-OHP-Metabolite (Tab. 15).

Die Körpergröße lag im Median bei  $95,4 \pm 10,3$  cm, das Gewicht bei  $15,7 \pm 5,8$  kg (Tab. 15).

Die Körpergröße-SDS betrug -1,05, der BMI-SDS 0,91 und die Wachstumsgeschwindigkeit in SDS -0,16 (jeweils im Median) (Tab. 15).

Die Hydrocortison-Tagesdosis lag im Median bei  $11,0 \pm 4,9$  mg/m<sup>2</sup>/d, die Verteilung der HC-Dosis zw. morgens und abends ergab  $1,7 \pm 1,1$ . Die Fludrocortison-Tagesdosis betrug im Median  $75,3 \pm 35,3$  µg/m<sup>2</sup>/d (Tab. 15).

In Bezug auf Alter, Gewicht und Größe gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Clustern. Dabei zeigte sich in Cluster 3 die im Median geringste Körpergröße bei höchstem Gewicht, während die Probanden des Cluster 2 im Vergleich am größten waren, bei jedoch jeweils fehlender Signifikanz (Tab. 15).

Hinsichtlich Größe-SDS, Wachstumsgeschwindigkeit in SDS und BMI-SDS gab es ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Clustern (Tab. 15).

Auch bezüglich der Hydrocortison-Tagesdosis, der Verteilung der morgendlichen und abendlichen HC-Dosis sowie der Fludrocortison-Tagesdosis wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt, wobei Cluster 2 die höchste Fludrocortison-Tagesdosis aller drei Cluster aufwies (p=0,006) (Tab. 15).

Hinsichtlich der Steroidmetabolit-Konzentrationen im Urin zeigten sich signifikante Unterschiede bei den Androgen-Metaboliten Androsteron (An) (p<0,0001), Etiocholanolon (Et) (p<0,0001), 11-Ketoandrosteron (11-O-An) (p<0,0001) und 11β-Hydroxyandrosteron (11-OH-An) (p<0,0001) (Tab. 15).

Auch für die Urinkonzentrationen der 17-OHP-Metabolite 17 $\alpha$ -Hydroxypregnanolon (Po-5b,3a) ( $p < 0,0001$ ), 5 $\alpha$ -17 $\alpha$ -Hydroxypregnanolon (Po-5a,3a) ( $p < 0,0001$ ) und Pregnantriol (PT) ( $p < 0,0001$ ) sowie den 21-Deoxycortisol-Metaboliten 11-Ketopregnanetriol (11-O-PT) ( $p < 0,0001$ ) ergaben sich signifikante Unterschiede (Tab. 15).

Für die Konzentrationen der Cortisol- und Cortison-Metabolite im Urin ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede (Tab. 15).

Für alle der vier gebildeten Verhältnisse (Ratios), aus 11-Ketopregnanetriol (11-O-PT), 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron (11-OH-An), Pregnantriol (PT) und 17 $\alpha$ -Hydroxypregnanolon (Po-5b,3a) (Zähler) zu Tetrahydrocortison (THE) (Nenner) zeigten sich signifikante Unterschiede ( $p < 0,0001$ ) (Tab. 15). Im Cluster 1 ergaben sich die höchsten Werte, während im Cluster 3 die niedrigsten Werte festgestellt wurden (Tab. 15).

**Tab. 15 – Urinsteroidmetabolit-Konzentrationen und Urinsteroid-Ratios der mittels Metabotypisierung in 3 Cluster gruppierten Daten von 60 Probanden mit AGS infolge eines 21-Hydroxylasemangels. (Abkürzungen analog zu Abb. 16)**

<b>Cluster</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>P-Wert</b> zw. den Clustern
<b>Patientenanzahl n (%)</b>	15 (25)	28 (47)	17 (28)	
<b>Anteil weiblicher Patienten in %</b>	47	43	59	
<b><i>Klinische Parameter</i></b> (in Median ± IQR)				
<b>Alter in Jahren</b>	2,9 ± 1,4	3,4 ± 1,9	3,4 ± 0,8	0,64
<b>Gewicht in kg</b>	15,4 ± 6,7	15,6 ± 6,2	15,7 ± 5,8	0,75
<b>Größe in cm</b>	95,6 ± 15,9	98,0 ± 15,9	95,4 ± 10,3	0,68
<b>Größe (SDS)</b>	0,17 ± 2,06	-0,10 ± 2,16	-1,05 ± 2,31	0,21
<b>BMI (SDS)</b>	0,23 ± 1,72	0,61 ± 1,30	0,91 ± 1,49	0,14
<b>HV (SDS)</b>	0,70 ± 4,63	0,93 ± 3,02	-0,16 ± 3,75	0,76
<b><i>Therapieregime</i></b> (in Median ± IQR)				
<b>Hydrocortison-Tagesdosis</b> in mg/m <sup>2</sup> /d	12,2 ± 3,1	12,3 ± 2,4	11,0 ± 4,9	0,55
<b>HC-Ratios morgens vs. abends</b>	2,0 ± 0,9	2,0 ± 1,0	1,7 ± 1,1	0,61
<b>Fludrocortison-Tagesdosis</b> µg/m <sup>2</sup> /d	88,2 ± 94,7	101,6 ± 60,9	75,3 ± 35,3	0,006
<b><u>Androgen-Metabolite</u></b> in µg/l				
<b>An</b>	121,5 ± 100,7	17,8 ± 26,5	7,9 ± 11,1	< 0,0001*
<b>Et</b>	111,9 ± 95,8	15,4 ± 15,9	10,8 ± 11,5	< 0,0001
<b>11-O-An</b>	35,1 ± 30,0	20,5 ± 14,5	12,6 ± 13,8	< 0,0001
<b>11-OH-An</b>	407,9 ± 302,8	191,3 ± 154,6	11,4 ± 7,9	< 0,0001
<b>11-OH-Et</b>	39,7 ± 193,3	27,4 ± 258,1	15,8 ± 29,7	0,03
<b>A5T-16a</b>	0 ± 10,33	0 ± 6,15	0 ± 6,24	0,86

**17-OHP-Metabolite***in µg/l*

<b>Po-5b,3a</b>	1337 ± 1556,8	150,5 ± 273,2	15,6 ± 26,4	< 0,0001
<b>Po-5a,3a</b>	167,2 ± 358,2	26,6 ± 49,3	6,4 ± 2,0	< 0,0001
<b>PT</b>	1891 ± 2005,2	378,6 ± 372,1	94,4 ± 138,4	< 0,0001

**21-Deoxy-Cortisol-Metabolite***in µg/l*

<b>11-O-Pt</b>	989,5 ± 1110,3	102,9 ± 171,3	8,27 ± 13,7	< 0,0001
----------------	----------------	---------------	-------------	----------

**Cortison-Metabolite***in µg/l*

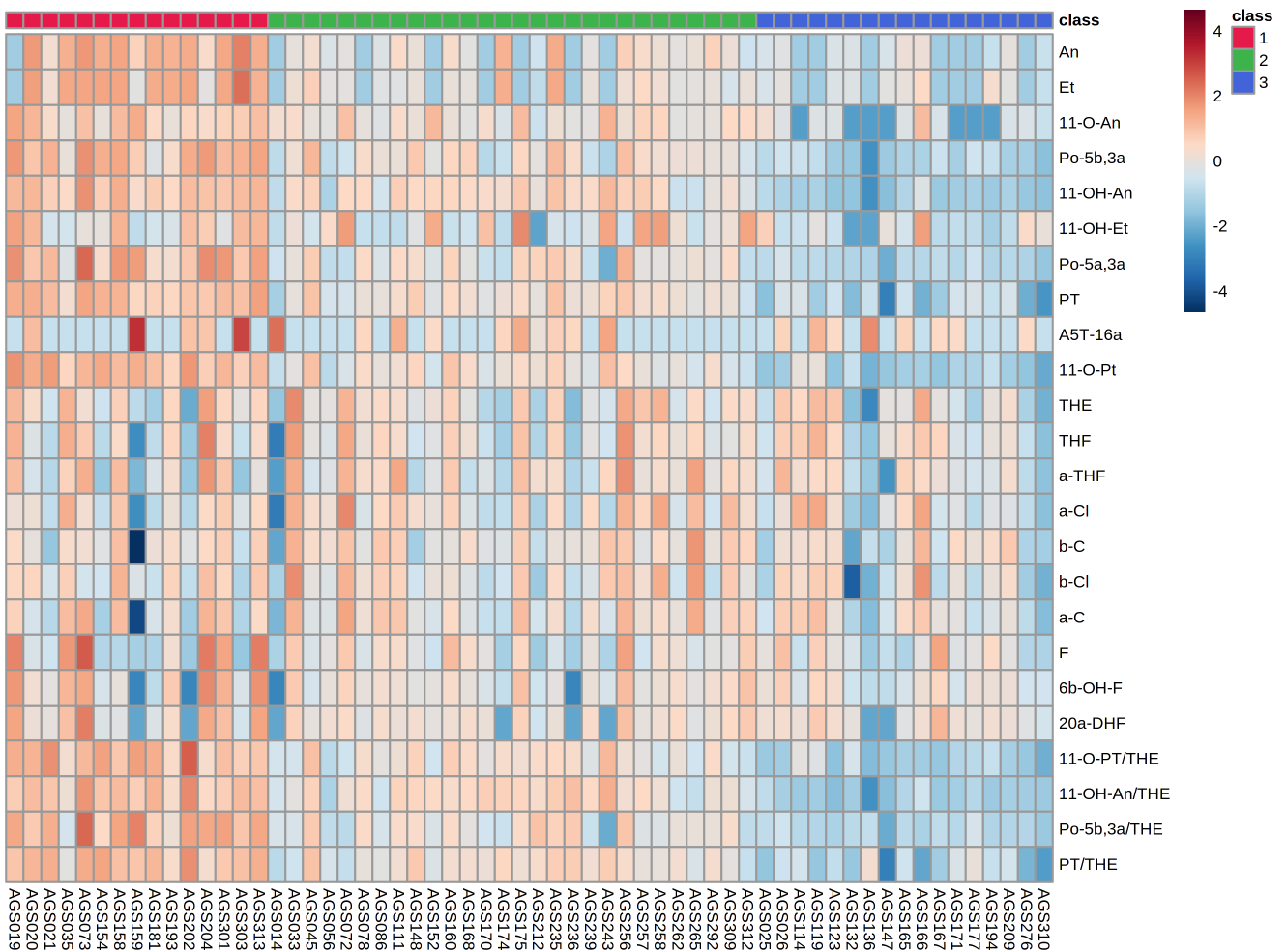
<b>THE</b>	2620 ± 1918	2330 ± 1675	1932 ± 2357,6	0,52
<b>a-Cl</b>	587,5 ± 436,2	672,6 ± 542,2	465,8 ± 377,8	0,38
<b>b-Cl</b>	661,8 ± 342,5	524,2 ± 393,2	509,7 ± 381,6	0,24

**Cortisol-Metabolite***in µg/l*

<b>THF</b>	1067 ± 1067,7	823,2 ± 679,2	775,5 ± 803,2	0,94
<b>a-THF</b>	1047 ± 2748,6	1450 ± 1523,2	896,4 ± 1213	0,41
<b>b-C</b>	325,7 ± 218	299,6 ± 369,8	266,1 ± 303,8	0,35
<b>a-C</b>	149,1 ± 284,6	132,2 ± 171,1	102,0 ± 149,1	0,40
<b>F</b>	55,0 ± 400,3	65,9 ± 54,1	65,9 ± 56,8	0,86
<b>6b-OH-F</b>	188,9 ± 1088,6	138,0 ± 146,1	154,7 ± 128,2	0,32
<b>20a-DHF</b>	30,0 ± 132,8	33,2 ± 22,4	30,5 ± 16,0	0,72

**Ratios**

<b>11-O-PT/THE</b>	0,41 ± 0,91	0,06 ± 0,11	0 ± 0,01	< 0,0001
<b>11-OH-An/THE</b>	0,2 ± 0,13	0,09 ± 0,08	0,01 ± 0,01	< 0,0001
<b>Po-5b,3a/THE</b>	0,11 ± 0,1	0,02 ± 0,02	0 ± 0,01	< 0,0001
<b>PT/THE</b>	0,82 ± 0,77	0,21 ± 0,22	0,03 ± 0,05	< 0,0001



**Abb. 16 – Heatmap-Darstellung der einzelnen Steroidmetabolite inkl. Ratios von 60 Patienten mit AGS infolge eines 21-Hydroxylasemangels.**

Jede Säule entspricht einem Patienten unter Therapie mittels Hydrocortison und Fludrocortison und dessen einzigartige Urinsteroidmetabolit-Konfiguration ( $n = 60$ ). Jede Reihe spiegelt die Metabolit-Konzentration einer von 20 Urinsteroidmetaboliten sowie 4 Ratios wider.

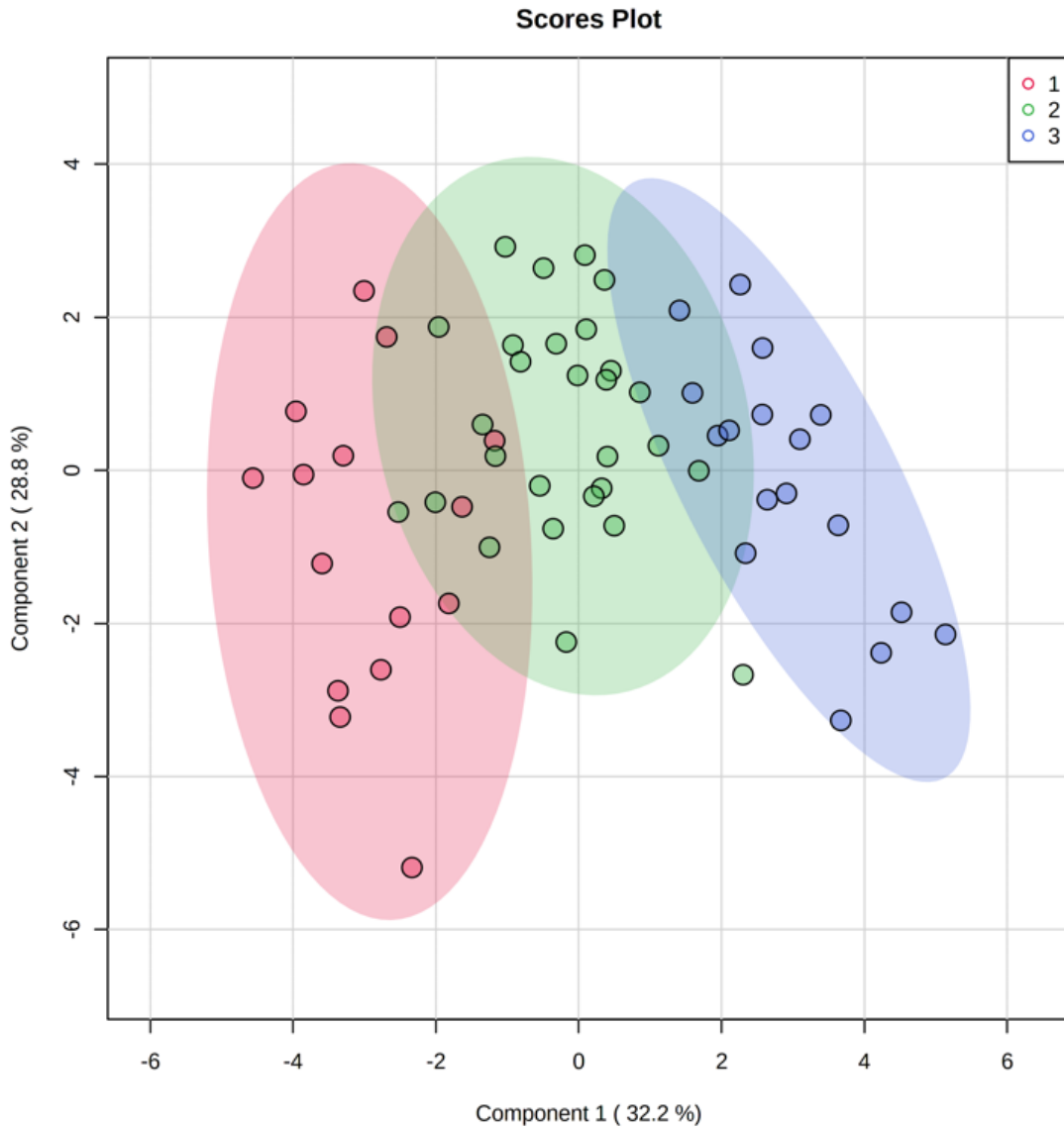
Die Farben der Heatmap verdeutlichen die Metabolit-Konzentration von gering (blau) bis rot (hoch). Die Farben von links (Cluster 1, rot) nach rechts (Cluster 2, grün bis Cluster 3, blau) symbolisieren die drei einzelnen Cluster.

Abkürzungen: An = Androsteron; Et = Etiocholanolon; 11-O-An = 11-Ketoandrosteron; Po-5b,3a = 17 $\alpha$ -Hydroxypregnanolon; 11-OH-An = 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron; 11OH-Et = 11 $\beta$ -Hydroxyetiocholanolon; Po-5a,3a = 5 $\alpha$ -17 $\alpha$ -Hydroxypregnanolon; PT = Pregnantriol; A5T-16a = Androstenetriol-16 $\alpha$ ; 11-O-PT = 11-Ketopregnanetriol; THE = Tetrahydrocortison; THF = Tetrahydrocortisol; a-THF = 5 $\alpha$ -Tetrahydrocortisol; ; a-Cl =  $\alpha$ -Cortolon; b-C =  $\beta$ -Cortol; b-Cl =  $\beta$ -Cortolon; a-C =  $\alpha$ -Cortol; F = Cortisol; 6b-OH-F = 6 $\beta$ -Hydroxycortisol; 20a-DHF = 20 $\alpha$ -Dihydrocortisol.

## **sPLS-DA-Analyse**

Wie im 2-D Scores Plot in Abbildung 17 erkennbar, wurden die Cluster hauptsächlich durch die Komponente 1 (x-Achse) geteilt. Hinsichtlich der Komponente 2 (y-Achse) zeigten sich dagegen deutlich erkennbare Überlappungen zwischen den drei Clustern.

In den in Abbildung 18 und 19 gezeigten Loading Plots von Komponente 1 („Loadings 1“) und Komponente 2 („Loadings 2“) konnten die vier aussagekräftigsten Steroidmetabolite der Komponente 1 selektiert werden. Dabei handelt es sich um den 21-Deoxycortisol-Metaboliten 11-Ketopregnanetriol (11-O-PT), den Urinmetaboliten 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron (11-OH-An) und die 17-OH-P-Metabolite 17 $\alpha$ -Hydroxypregnanolon (Po-5b,3a) und Pregnantriol (PT).

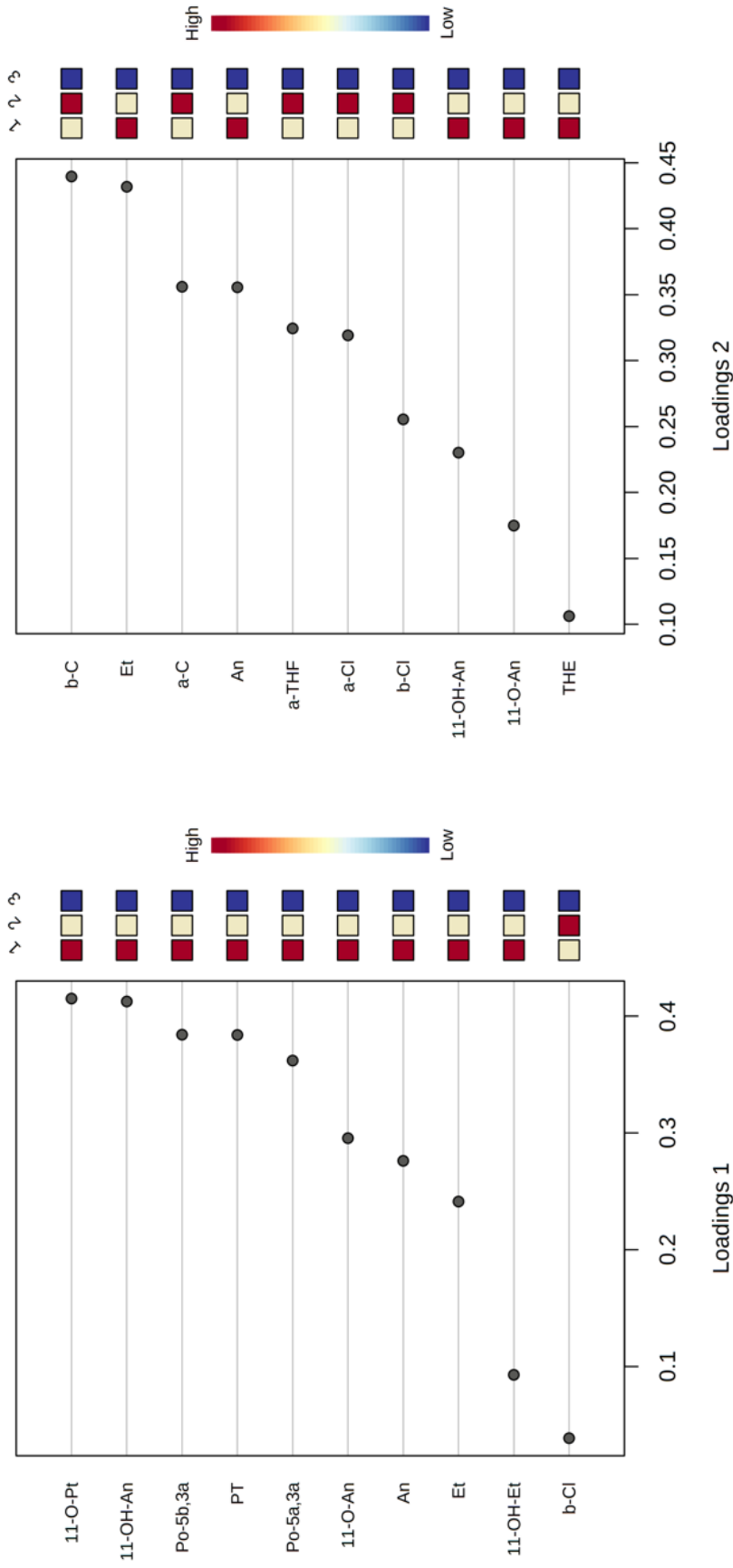


**Abb. 17 - 2-D-Score-Plot der ausgewählten Komponenten, ausgehend von der sPLS-DA Analyse der 3 Cluster.**

*Jeder farbige Punkt entspricht einer Probe ( $n = 60$ ). Projiziert werden diese auf die zwei Hauptebenen, welche durch die Komponente 1 und 2 gebildet werden.*

*Die Farbe der halbtransparenten Punkte wird durch die Zugehörigkeit zum jeweiligen Cluster bestimmt (rot=Cluster 1, grün = Cluster 2, blau = Cluster 3). Umgeben werden diese von gleichfarbigen Punktwolken, welche das 95 %-Konfidenzintervall des jeweiligen Clusters visualisieren. In Klammern angegeben, sind die jeweiligen Varianzen.*

*Die Differenzierung der Cluster erfolgt vornehmlich durch die Komponente 1 (x-Achse), während es deutliche Überlappungen der Cluster hinsichtlich der Komponente 2 (y-Achse) gibt.*



**Abb. 18 - 19 – Loading Plots der Komponente 1 und 2, ausgehend der sPLS-DA gestützten Analyse der 3 Cluster.**

Die Loading Plots stellen die jeweils 10 wichtigsten Metabolite für Komponente 1 und 2 dar, aufgetragen in der Reihenfolge ihrer Gewichtung von  $<0,1$  bis  $>0,4$ , welche anhand des sPLS-DA-Modells ausgewählt wurden. Die farbigen Kästen (rechts) charakterisieren die Konzentrationen der entsprechenden Steroidmetabolite jedes Clusters.

Hierdurch konnten die vier aussagekräftigsten Steroidmetabolite der Komponente 1 mit der höchsten Gewichtung ausgewählt werden: 11-O-PT, 11-OH-An, Po-5b,3a und PT.

Abkürzungen: 11-O-PT = 11-Ketopregnanetriol; 11-OH-An = 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron; Po-5b,3a = 17 $\alpha$ -Hydroxypregnanolon; PT = Pregnantriol; Po-5a,3a = 5 $\alpha$ -17 $\alpha$ -Hydroxypregnanolon; 11-O-An = 11-Ketoandrosteron; An = Androsteron; Et = Etiocolanolon; 11OH-Et = 11 $\beta$ -Hydroxyetiocolanolon; b-Cl =  $\beta$ -Cortolon; b-C =  $\beta$ -Cortol; a-C =  $\alpha$ -Cortol; a-THF = 5 $\alpha$ -Tetrahydrocortisol; a-Cl =  $\alpha$ -Cortolon; THE = T etrahydrocortison.

### 4.3 ROC-Analyse

Für eine präzisere Trennung der Cluster wurden ROC-Analysen durchgeführt (Abb. 20-30). Die effektivste Differenzierung zwischen Cluster 1 und Cluster 2 erfolgte durch den 21-Deoxy-Cortisol-Metaboliten 11-Ketopregnanetriol (11-O-PT) mit einer AUC von 0,967 und einem 95 %-Konfidenzintervall von 0,907-0,998 bei einer Urinkonzentration von 308 µg/l (Abb. 20).

Die zweitbeste Trennung wurde durch den 17-OHP-Metaboliten Pregnantriol (PT) erreicht (Abb. 22). Die AUC lag hier bei 0,936, mit einem 95 %-Konfidenzintervall von 0,851-0,988 bei einer Urinkonzentration von 731 µg/l (Abb. 22).

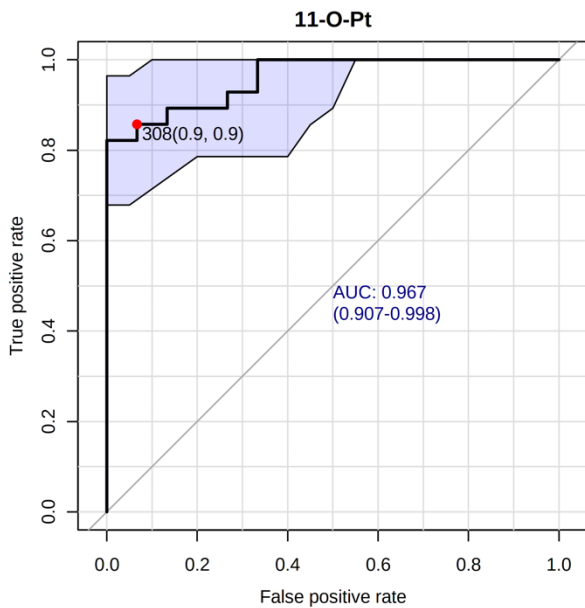
Die drittbeste Separation zeigte die Ratio von 11-Ketopregnanetriol (11-O-PT) zu Tetrahydrocortison (THE) mit einer AUC von 0,899 und einem 95 %-Konfidenzintervall von 0,792-0,968 bei einem optimalen Cut-Off von 0,175 µg/l (Abb. 24).

Die beste Trennung zwischen Cluster 2 und 3 wurde durch den 11-oxygenierten Androgen-Metaboliten 11β-Hydroxyandrosteron (11-OH-An) erreicht, mit einer AUC von 0,983 und einem 95 %-Konfidenzintervall von 0,945-1,00 bei einer Urinkonzentration von 24,2 µg/l (Abb. 26).

Die Ratio von 11β-Hydroxyandrosteron (11-OH-An) zu Tetrahydrocortison (THE) erzielte die zweitbeste Separation der Cluster 2 und 3, mit einer AUC von 0,97 und einem 95 %-Konfidenzintervall zwischen 0,921-0,996. Der optimale Cut-Off lag bei 0,015 µg/l (Abb. 28).

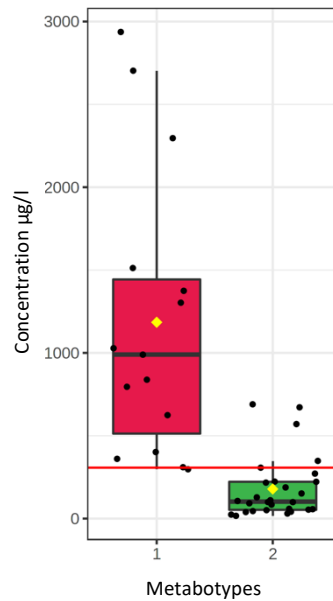
Der 17-OHP-Metabolit Pregnantriol (PT) erwies sich mit einer AUC von 0,956 und einem 95% Konfidenzintervall von 0,889-0,996 bei einer Urinkonzentration von 194 µg/l als drittbester Diskriminator für die Trennung der Cluster 2 und 3 (Abb. 30).

## 11-O-PT (Cluster 1 vs. 2)



**Abb. 20 - ROC Kurve mit AUC-Wert (links) des Steroidmetabolits 11-O-PT.**

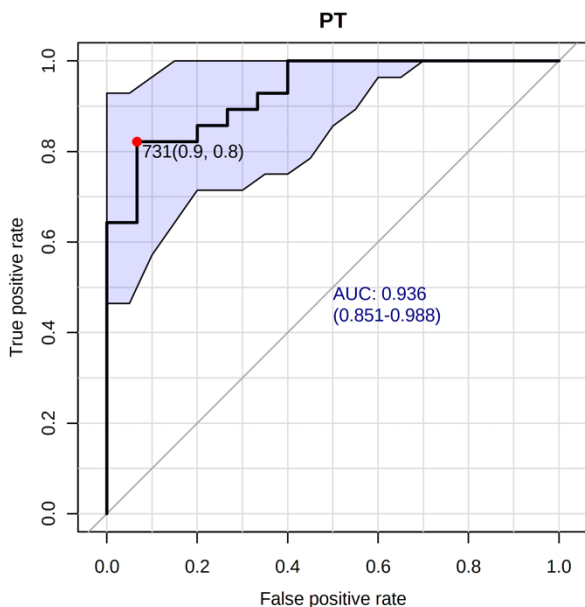
Die Sensitivität ist auf der y-Achse, die Spezifität auf der x-Achse dargestellt. Das 95 %-Konfidenzintervall ist anhand des blauen Bereichs rund um die ROC-Kurve gezeigt. Der optimale Cut-Off beträgt 308 µg/l.



**Abb. 21 - Box-Whisker-Plot der 11-O-PT-Konzentration (rechts) zwischen Cluster 1 (rot) und 2 (grün).**

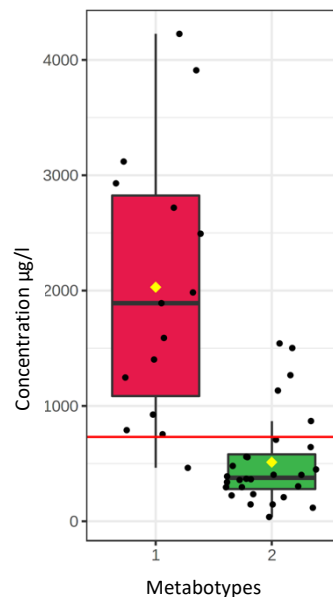
Die rote horizontale Linie zeigt den besten Cut-Off-Wert. x-Achse: Cluster, y-Achse: Konzentration in µg/l

## PT (Cluster 1 vs. 2)



**Abb. 22 - ROC Kurve mit AUC-Wert (links) des Steroidmetabolits Pregnantriol.**

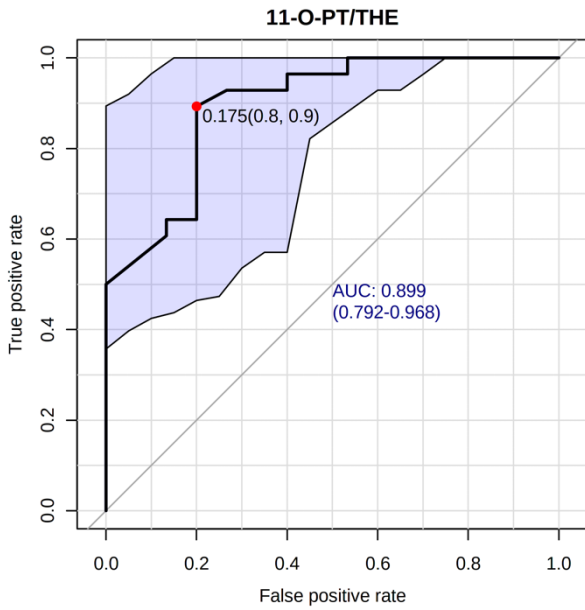
Die Sensitivität ist auf der y-Achse, die Spezifität auf der x-Achse dargestellt. Das 95 %-Konfidenzintervall ist anhand des blauen Bereichs rund um die ROC-Kurve gezeigt. Der optimale Cut-Off beträgt 731 µg/l.



**Abb. 23 - Box-Whisker-Plot der Pregnantriol-Konzentration (rechts) zwischen Cluster 1 (rot) und 2 (grün).**

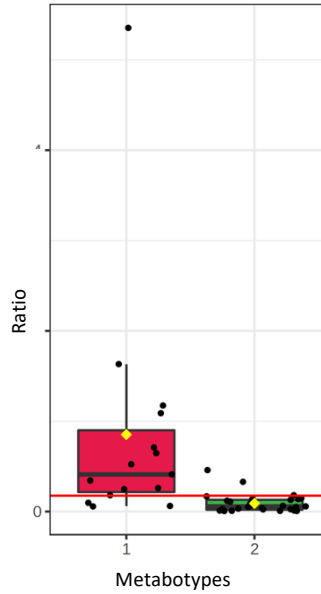
Die rote horizontale Linie zeigt den besten Cut-Off-Wert. x-Achse: Cluster, y-Achse: Konzentration in µg/l

### 11-O-PT/THE (Cluster 1 vs. 2)



**Abb. 24 - ROC Kurve mit AUC-Wert (links) der Ratio 11-O-PT/THE.**

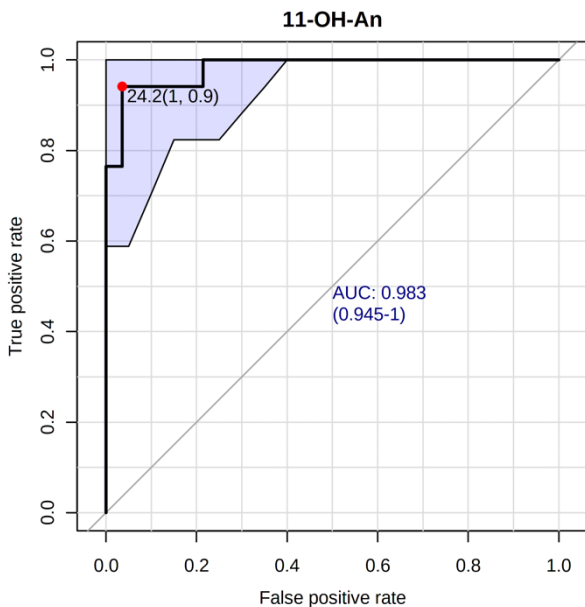
Die Sensitivität ist auf der y-Achse, die Spezifität auf der x-Achse dargestellt. Das 95 %-Konfidenzintervall ist anhand des blauen Bereichs rund um die ROC-Kurve gezeigt. Der optimale Cut-Off beträgt 0,175 µg/l.



**Abb. 25 - Box-Whisker-Plot der 11-O-PT/THE-Konzentration (rechts) zwischen Cluster 1 (rot) und 2 (grün).**

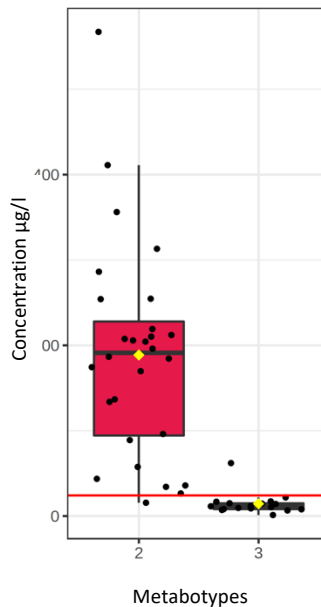
Die rote horizontale Linie zeigt den besten Cut-Off-Wert. x-Achse: Cluster, y-Achse: Konzentration in µg/l

### 11-OH-An (Cluster 2 vs. 3)



**Abb. 26 - ROC Kurve mit AUC-Wert (links) des Steroidmetabolits 11-OH-An.**

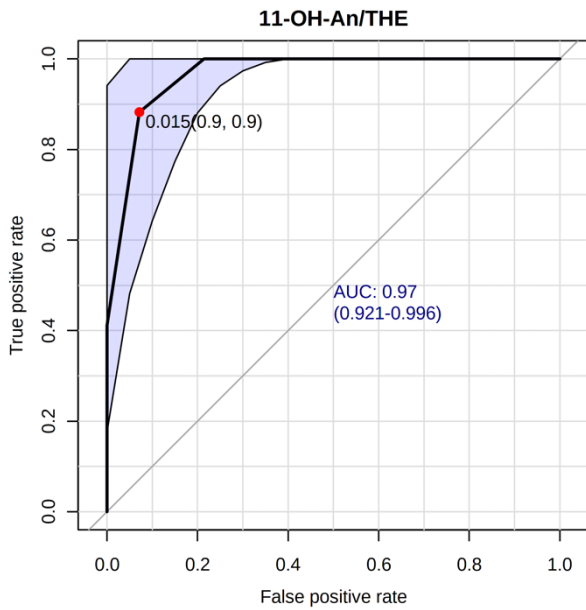
Die Sensitivität ist auf der y-Achse, die Spezifität auf der x-Achse dargestellt. Das 95 %-Konfidenzintervall ist anhand des blauen Bereichs rund um die ROC-Kurve gezeigt. Der optimale Cut-Off beträgt 24,2 µg/l.



**Abb. 27 - Box-Whisker-Plot der 11-OH-An-Konzentration (rechts) zwischen Cluster 2 (rot) und 3 (grün).**

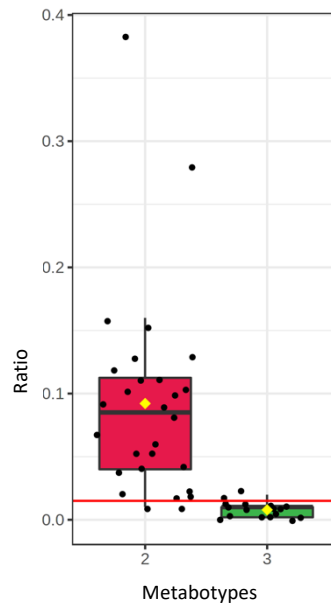
Die rote horizontale Linie zeigt den besten Cut-Off-Wert. x-Achse: Cluster, y-Achse: Konzentration in µg/l

### 11-OH-An/THE (Cluster 2 vs. 3)



**Abb. 28 - ROC Kurve mit AUC-Wert (links) der Ratio 11-OH-An/THE.**

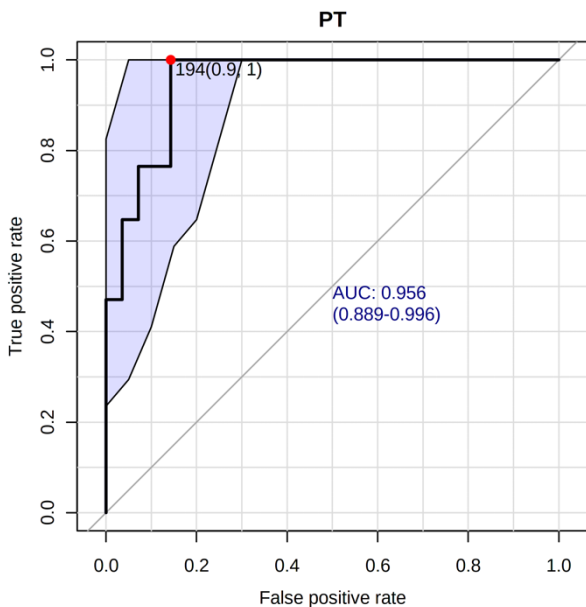
Die Sensitivität ist auf der y-Achse, die Spezifität auf der x-Achse dargestellt. Das 95 %-Konfidenzintervall ist anhand des blauen Bereichs rund um die ROC-Kurve gezeigt. Der optimale Cut-Off beträgt 0,015 µg/l.



**Abb. 29 - Box-Whisker-Plot der 11-OH-An/THE-Konzentration (rechts) zwischen Cluster 2 (rot) und 3 (grün).**

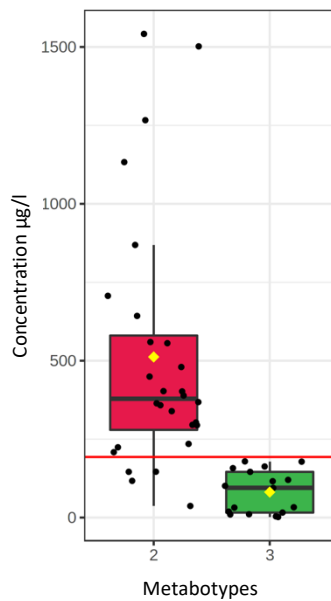
Die rote horizontale Linie zeigt den besten Cut-Off-Wert. x-Achse: Cluster, y-Achse: Konzentration in µg/l

### PT (Cluster 2 vs. 3)



**Abb. 30 - ROC Kurve mit AUC-Wert (links) des Steroidmetabolits PT.**

Die Sensitivität ist auf der y-Achse, die Spezifität auf der x-Achse dargestellt. Das 95 %-Konfidenzintervall ist anhand des blauen Bereichs rund um die ROC-Kurve gezeigt. Der optimale Cut-Off beträgt 194 µg/l.



**Abb. 31 - Box-Whisker-Plot der 11-O-PT-Konzentration (rechts) zwischen Cluster 2 (rot) und 3 (grün).**

Die rote horizontale Linie zeigt den besten Cut-Off-Wert. x-Achse: Cluster, y-Achse: Konzentration in µg/l

#### 4.4 Assoziation zwischen Steroidkonzentration und Wachstumsgeschwindigkeit

Es ergaben sich signifikante Unterschiede der Ratios bzw. der Konzentrationen beim Vergleich der Konzentrationen der Urinsteroidmetabolite 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron (11-OH-An) und Pregnantriol (PT) sowie der Ratio von 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron (11-OH-An) zu Tetrahydrocortison (THE) zwischen Probanden mit einer Wachstumsgeschwindigkeit von  $> -1$  SDS ( $n = 5$ ,  $-0,44 \pm 2,55$  (Median  $\pm$  Range)) und  $< -1$  SDS ( $n = 9$ ,  $-1,51 \pm 0,93$  (Median  $\pm$  Range)) (Abb. 32 - 34).

Diese signifikanten Unterschiede lassen sich wie folgt beschreiben:

##### 11-OH-An/THE

Die Gruppe mit einer Wachstumsgeschwindigkeit  $> -1$  SDS ( $0,23 \pm 0,25$  (Median  $\pm$  Range)) zeigte eine signifikant höhere Ratio von 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron (11-OH-An) zu Tetrahydrocortison (THE) ( $p=0,0005$ ) im Vergleich zur Gruppe mit einer Wachstumsgeschwindigkeit von  $< -1$  SDS ( $0,01 \pm 0,03$  (Median  $\pm$  Range)) (Abb. 32).

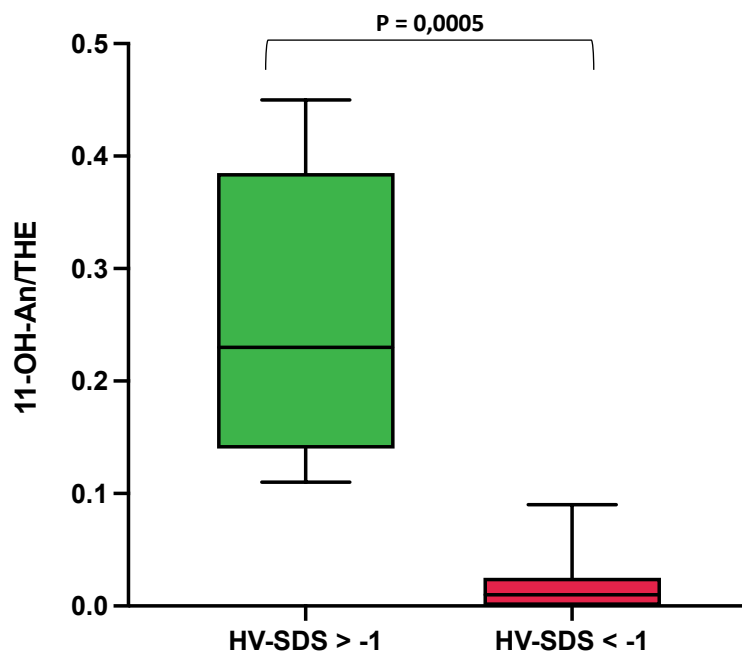


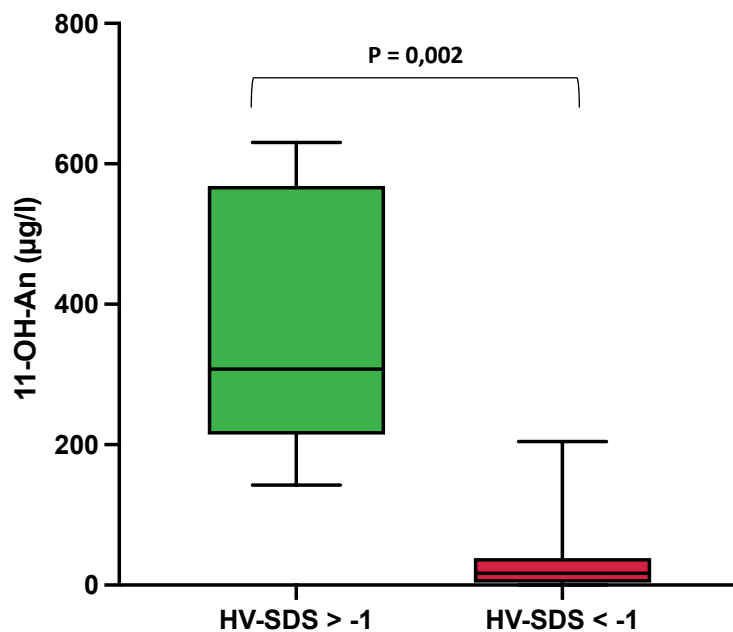
Abb. 32 - Box-Whisker-Plot zu 11-OH-An/THE, unabhängig des Geschlechts in der Altersgruppe von 1 Jahr, unterschieden nach der Wachstumsgeschwindigkeit (HV-SDS) ( $n = 14$ ).

Signifikanter Unterschied der Ratio 11-OH-An/THE zw. Gruppen mit HV-SDS  $> -1$  und HV-SDS  $< -1$ .

Strich innerhalb der Box: Median, Begrenzung durch unteres bzw. oberes Quartil; Whisker: Minimum bzw. Maximum

## 11-OH-An

Der Vergleich zwischen der Gruppe mit einer Wachstumsgeschwindigkeit  $> -1$  SDS ( $307,5 \pm 353,8 \mu\text{g/l}$  (Median  $\pm$  Range)) und der Gruppe mit einer Wachstumsgeschwindigkeit  $< -1$  SDS ( $16,77 \pm 34,93 \mu\text{g/l}$  (Median  $\pm$  Range)) ergab signifikant höhere Konzentrationen des Androgen-Metaboliten 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron (11-OH-An) in der Gruppe mit einer Wachstumsgeschwindigkeit  $> -1$  SDS ( $p=0,002$ ) (Abb. 33).



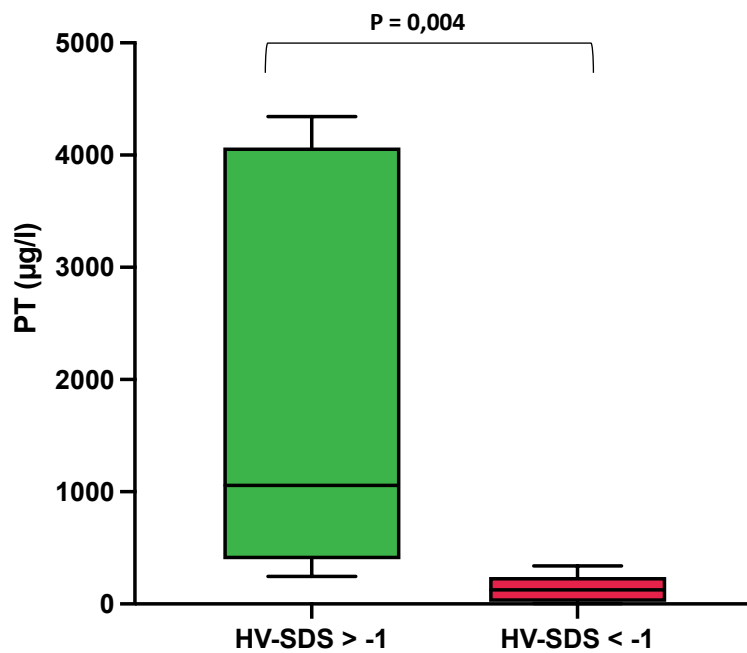
**Abb. 33 - Box-Whisker-Plot zu 11-OH-An (in  $\mu\text{g/l}$ ), unabhängig des Geschlechts in der Altersgruppe von 1 Jahr, unterschieden nach der Wachstumsgeschwindigkeit (HV-SDS) ( $n = 14$ ).**

*Signifikant höhere Konzentration des Androgen-Metaboliten 11-OH-An in der Gruppe mit HV-SDS  $> -1$  im Vergleich zur Gruppe mit HV-SDS  $< -1$ .*

*Strich innerhalb der Box: Median, Begrenzung durch unteres bzw. oberes Quartil; Whisker: Minimum bzw. Maximum*

## PT

Bei Gegenüberstellung der Gruppe mit einer Wachstumsgeschwindigkeit  $> -1$  SDS ((1056  $\pm$  3666,8  $\mu\text{g/l}$  (Median  $\pm$  Range)) waren die Konzentrationen des 17-OHP-Metaboliten Pregnantriol (PT) signifikant höher ( $p=0,004$ ) als in der Gruppe mit einer Wachstumsgeschwindigkeit  $< -1$  SDS (125,2  $\pm$  221,12 (Median  $\pm$  Range) (Abb. 34).



**Abb. 34 - Box-Whisker-Plot zu PT (in  $\mu\text{g/l}$ ), unabhängig des Geschlechts in der Altersgruppe von 1 Jahr, unterschieden nach der Wachstumsgeschwindigkeit (HV-SDS) ( $n = 14$ ).**

*Signifikant höhere Konzentration des 17-OHP-Metaboliten PT in der Gruppe mit HV-SDS  $> -1$  im Vergleich zur Gruppe mit HV-SDS  $< -1$ .*

*Strich innerhalb der Box: Median, Begrenzung durch unteres bzw. oberes Quartil; Whisker: Minimum bzw. Maximum*

## 5 DISKUSSION

Ein wesentliches Ziel der Therapie des Adrenogenitalen Syndroms besteht darin, ein im Vergleich zum Gesunden so weit wie möglich normales Wachstum zu ermöglichen (70).

Damit einher geht eine für den Therapeuten häufig anspruchsvolle Therapieeinstellung zwischen Unter- und Überdosierung mit Hydrocortison (15, 33, 70). Neuere Daten zeigen, dass Steroidmetabolite von 21-Deoxycortisol oder 11-oxygenierten-Androgenen präzisere Informationen zur Produktion adrenaler Androgen-Vorstufen liefern könnten (82, 83). Dennoch richtet sich die Therapieeinstellung bisher nicht nur nach Laborergebnissen, sondern vielmehr nach dem spezifischen klinischen Bild (70, 82, 83). Es braucht folglich spezifische Biomarker mit konkreten Referenzwerten, um das Therapiemonitoring zu optimieren und die Wahrscheinlichkeit einer Fehldosierung zu verringern.

Zunächst wurden im Rahmen dieser Arbeit Wachstums- und Therapieparameter sowie die wichtigsten Steroidmetabolite der Patienten analysiert. Durch die anschließende Clusteranalyse konnten die Probanden in drei Cluster für unter-, über- und adäquat behandelte Patienten eingeteilt werden. Diese Einteilung ermöglichte es, wie im Folgenden näher erläutert, insbesondere die 11-oxygenierten Androgene, allen voran 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron, als die wichtigsten Diskriminatoren zwischen den Clustern herauszustellen und deren potenzielle Bedeutung als mögliche Biomarker zur Therapie-Kontrolle zu erkennen.

## **5.1 Probanden und Methoden**

### **5.1.1 Probanden und Probematerial**

Mit 68 Patienten der Gruppe „AGS-Steroide“ und einer 60 Patienten umfassenden Gruppe „AGS-Wachstum“ handelte es sich um vergleichsweise große Gruppen von Patienten. Insbesondere im Vergleich zu ähnlichen Studien hinsichtlich der Therapie und des Wachstums von Kindern mit AGS (41, 63, 87).

Anzumerken ist hierbei, dass einzelne Untergruppen, unterschieden nach dem Alter im halbjährlichen Intervall, zum Teil über geringe Probandenzahlen verfügten, insbesondere in der Patientengruppe „AGS-Wachstum“.

### **5.1.2 Analysemethoden**

#### **Messwerte**

Zur Berechnung der Körpergröße und des BMI in SDS wurden Daten der KiGGS-Studie aus dem Jahr 2010 verwendet, einer Langzeitstudie des Robert Koch-Instituts zur gesundheitlichen Lage der Kinder und Jugendlichen in Deutschland (49). Diese erschien vor allem aufgrund der ausreichenden Aktualität der Daten, der gegebenen Populationsspezifität und der großen Probandenzahl als geeignet.

#### **Gaschromatographie-Massenspektrometrie**

Die Urinsteroidprofile wurden mittels des Verfahrens der qualitativen und quantitativen GC-MS erhoben.

Bei einem hohen Maß an Spezifität, Nicht-Selektivität und schneller Durchführbarkeit, besitzt dieses Verfahren einen sehr hohen diagnostischen Stellenwert (97, 98). Auch aufgrund des Umstands, dass eine Auswertung mittels GC-MS ein umfangreiches repräsentatives Spektrum an Steroidmetaboliten in einer Probe detektieren kann, ist dieses Verfahren derzeit ein exzellentes Instrument und damit der Goldstandard, um Störungen im Steroidstoffwechsel zu diagnostizieren (38).

Zudem ist die Methode der Harnsteroidanalytik nicht invasiv (38, 97). Aus diesem Grund ist die GC-MS insbesondere für den Einsatz bei Säuglingen und Kleinkindern sehr gut geeignet (38).

Dabei können nicht nur klassische Metabolite und ihre Vorstufen, wie beispielsweise Testosteron oder DHEA, bestimmt werden (33). Zusätzlich lassen sich auch Steroidmetabolite erfassen, die nicht im Zentrum der Untersuchung standen (33, 97). So ist es auch möglich, bis dahin unbekannte Zusammenhänge erkennbar zu machen und

das vollständige Steroidmetabolom eines Patienten zu beurteilen (33, 97). Ein Beispiel hierfür ist der Androgen-Metabolit 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron, welcher sich in der vorliegenden Arbeit als der bedeutendste Urinmetabolit herausstellte.

Allerdings erschwert die komplexe Darstellung der in einer Probe enthaltenen Steroidmetabolite häufig das Verständnis in der klinischen Praxis (38). Aufgrund der Vielzahl von Urinsteroidmetaboliten ist es mitunter schwierig, klare therapeutische Konsequenzen aus den Analyseergebnissen abzuleiten (38).

Vergleichend dazu verfügt auch das Verfahren der LC-MS/MS über eine hohe Spezifität und ist ebenfalls in der Lage, auch geringe Steroidkonzentration zu erfassen (38). Daneben können mit Hilfe dieses Verfahrens voll automatisiert eine große Anzahl an Proben in einer kurzen Zeit verarbeitet werden (38). LC-MS kann jedoch keine solche Bandbreite an Harnsteroidmetabolite detektieren (38). Auch besitzt dieses Verfahren eine stärkere Abhängigkeit von der circadianen Nebennieren-Aktivität. Daher ergeben sich für die Verwendung von LC-MS/MS andere Einsatzzwecke als für die GC-MS. So können mittels LC-MS/MS insbesondere weniger seltene Erkrankungen mit bekannten Stoffwechselwegen analysiert werden (38). Außerdem können ebenfalls sehr geringe Konzentrationen eines Metabolits gemessen werden, was vor allem bei pädiatrischen Patienten von Bedeutung ist (38).

Ebenso bedeutend in der klinischen Praxis sind Immunoassays, da sie einfach erhältlich und weit verbreitet sind (38). Jedoch sind sie nicht für Harnsteroidmetabolite verfügbar (38). Zudem sind sie aufgrund der problematischen Kreuzreaktivität weniger spezifisch und durch die Verwendung von Plasma invasiv (38). Ihr großer Stellenwert liegt daher vor allem in Screening-Tests (38).

Die genannten Vorteile der qualitativen und quantitativen Gaschromatographie-Massenspektrometrie ermöglichen einen nahezu vollumfänglichen Überblick über den Hormonstatus der Probanden. Insbesondere die Nicht-Selektivität und hohe Spezifität der Ergebnisse sind hierfür entscheidend. Zudem ermöglichte die nicht-selektive Herangehensweise neue Erkenntnisse.

## 5.2 Wachstum im Kontext der Therapie

Anhand der für die Gruppe „AGS-Wachstum“ ausgewerteten Daten für die Körpergröße und den BMI war kein spezifischer Wachstumstrend ersichtlich. Es gab weder Hinweise auf generellen Klein- oder Hochwuchs noch auf eine generelle Wachstumsverzögerung in den untersuchten Gruppen.

Jedoch zeigte sich bei einem Großteil der Probanden, besonders mit einem Jahr, ein Wachstumsknick bei einer Körpergröße von in etwa -1 (Median) SDS. Mädchen erschienen dabei über die erfassten Altersgruppen hinweg tendenziell stärker wachstumsretardiert als Jungen. Diese Erkenntnis deckt sich mit den Daten von Jääskeläinen & Voutilainen (1997), welche in ihrer Arbeit ebenfalls im Alter von einem Jahr eine Wachstumsretardierung von -1 SDS sahen (24). Auch in der Studie von Sellick et al. aus dem Jahr 2018 zeigten sich in der Gruppe der 1-Jährigen mit -1,23 SDS ein ähnlicher Wert für die Körpergröße in SDS (63).

Die Daten von Kamrath et al. (2017) stellten ergänzend dazu dar, dass die untersuchten Probanden im Alter von 3 Jahren bei einer Größe von -0,05 SDS über keine Wachstumsretardierung verfügten (33). Zudem wiesen sie infolge eines präpubertären Hyperandrogenismus eine gesteigerte Wachstumsgeschwindigkeit im präpubertären Alter auf, welche dann in der Pubertät wieder deutlich abfiel (33).

Es zeigte sich weiterhin, dass die initiale Hydrocortison Dosierung mit 0 Jahren ohne Unterscheidung des Geschlechts mit 14,9 mg/m<sup>2</sup>/d (Tab. 8) deutlich über der Hydrocortison-Dosierung nachfolgender Altersgruppen lag.

Die vor allem bei Mädchen verminderte Wachstumsgeschwindigkeit resultierte demnach am ehesten als Folge der hohen initialen Hydrocortison-Anfangsdosis der Mädchen von 15,4 mg/m<sup>2</sup>/d. Auch die Daten von Jääskeläinen & Voutilainen (1997) mit Hydrocortison-Dosen im ersten Lebensjahr von bis zu 37,3 mg/m<sup>2</sup>/d lassen diesen Zusammenhang vermuten (24).

Darüber hinaus ließ sich anhand der Daten zum Body-Mass-Index in SDS erkennen, dass vor allem Jungen im Alter von einem halben Jahr einen BMI von 1 SDS (Median) aufwiesen. Es erschien so, als ob Jungen mit 0,5 Jahren übertherapiert waren. Dies ist am ehesten als Folge der hohen Hydrocortison-Initialdosis von 14,6 mg/m<sup>2</sup>/d (Tab. 9) und im Sinne einer Nebenwirkung der Hydrocortison-Therapie zu sehen.

Die aus dem BMI-SDS und der Hydrocortison-Initialdosis abgeleitete Überbehandlung mit Hydrocortison deckt sich mit den Daten von Neumann et al. aus dem Jahr 2022 (50). In dieser retrospektiven Untersuchung von AGS-Patienten im Alter von 0 bis 3 Jahren

zeigte sich ein BMI-Anstieg in den ersten 3 Lebensjahren, mit der Schlussfolgerung, dass dieser am ehesten durch die initial supraphysiologische Hydrocortison-Dosis von im Mittel über 15 mg/m<sup>2</sup>/d zu begründen ist (50).

Manoli et al. (2002) veranschaulichte anhand ihrer Daten dagegen, dass ihre Probanden, trotz der im Mittel deutlich höheren Hydrocortison-Dosis in der Altersgruppe von 0 bis 2 Jahren von 19,6 (♂) bzw. 30,5 mg/m<sup>2</sup>/d (♀), keine relevant erhöhten BMI-SDS-Werte aufzeigten (0,1 (♂) bzw. -0,26 SDS (♀)) (41).

Die Hydrocortison-Dosis in der hier vorliegenden Untersuchung befand sich mit Werten zwischen 11,4 bis 14,9 mg/m<sup>2</sup>/d innerhalb der von der Endocrine Society Clinical Practice Guideline (2018) empfohlenen Tagesdosis von 10 – 15 mg/m<sup>2</sup>/d (70).

In der Publikation von Sellick et al. aus dem Jahr 2018 präsentierten sich ähnliche durchschnittliche Hydrocortison-Tagesdosen mit Werten von in etwa 10 mg/m<sup>2</sup>/d (63). Sellick et al. schlussfolgerten daraus, dass die Empfehlung der Endocrine Society Clinical Practice Guideline für eine Hydrocortison-Tagesdosis zwischen 10 – 15 mg/m<sup>2</sup>/d potenziell zu hoch sei (63). Ursächlich sehen sie zum einen die sich zum Hydrocortison addierende Glukokortikoid-Aktivität des Fludrocortisons und zum anderen die „Minipubertät“ des Säuglings in den ersten Lebensmonaten (63). Bei dieser sogenannten „Minipubertät“ handelt es sich um eine an die Pubertät erinnernde postnatale physiologische Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse mit messbaren Konzentrationen an Gonadotropinen (LH, FSH) und Sexualhormonen (Testosteron, Östradiol, Progesteron) (94).

Für die erhöhten Hydrocortison-Dosen in den ersten Lebensmonaten gibt es verschiedene weitere Erklärungsansätze. Zum einen werden in der klinischen Praxis zu Therapiebeginn häufig Stressdosen von Hydrocortison eingesetzt, um die erhöhten 17-OHP- und Androstendion-Werte möglichst schnell zu normalisieren (50). Zum anderen ist die Verfügbarkeit von Präparaten in ausreichender Dosierung für sehr junge pädiatrische Patienten begrenzt (50). In den USA war Hydrocortison beispielsweise lange Zeit nur in 5 mg-Tabletten und in Europa lediglich in 10 mg-Tabletten verfügbar (50).

### 5.3 Das Steroidmetabolom von Kindern mit AGS

Die statistische Auswertung der Urinsteroidmetabolite zeigte, dass insbesondere die 11-oxygenierten Androgene die quantitativ dominierenden Androgen-Metabolite bei Patienten mit AGS darstellen. Übereinstimmend mit der Arbeit von Kamrath et al. (2018) war 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron (11-OH-An) das quantitativ vorherrschende Androgen-Metabolit im untersuchten Patientenkollektiv (28, 34). Analog dazu konnten Turcu et al. (2016) zeigen, dass Patienten mit AGS im Vergleich zu alters- und geschlechtsangepassten Kontrollgruppen eine in Summe drei bis vierfach höhere Konzentration an 11-oxygenierten Androgenen aufweisen (83).

Daraus ist abzuleiten, dass 11-oxygenierte Androgene bei Kindern mit AGS der Altersgruppe bis 4 Jahren routinemäßig im Urin mitbestimmt werden sollten, um einen Androgen-Exzess hinreichend erkennen zu können (49).

Zwar wäre auch eine Bestimmung im Blut denkbar, jedoch unterliegt die Konzentration der 11-oxygenierten Androgene einer ausgeprägten Tagesrhythmik (55). Die höchsten Konzentrationen werden demnach am frühen Morgen erreicht und nehmen im Laufe des Tages ab (55). Daher ist eine Bestimmung im Urin, als 24h-Sammelurinprobe, vorzuziehen, da diese die Tagesausscheidung des jeweiligen Metaboliten erfasst.

Aufgrund ihres adrenalen Ursprungs scheinen insbesondere die 11-oxygenierten Androgene dazu geeignet, als Biomarker für einen Androgen-Exzess zu dienen (84).

So konnten Turcu et al. im Jahr 2017 belegen, dass die vier im Rahmen der Studie untersuchten 11-oxygenierten Androgene, 11 $\beta$ -Hydroxyandrostendion, 11-Ketoandrostendion, 11 $\beta$ -Hydroxytestosteron und 11-Ketotestosteron, neben 21-Deoxycortisol, am besten mit dem Nebennierenvolumen und dem ACTH-Spiegel korrelieren (82).

Übereinstimmend mit Kamrath et al. (2017) und Turcu et al. (2016) ist dabei davon auszugehen, dass 11-oxygenierte Androgene, wie 11 $\beta$ -Hydroxyandrostendion, eine Hauptursache für die Entwicklung eines Hyperandrogenismus bei Kindern mit AGS unter Hydrocortison-Therapie darstellen (33, 83).

Testosteron zeigte sich in allen untersuchten Altersgruppen mit Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze. Speiser et al. (2000) und Krone et al. (1992) schlussfolgerten übereinstimmend, dass ein Androgen-Überschuss nicht durch Testosteron als Marker feststellbar ist (36, 74). Dies führte zu der Vermutung, dass in der Nebenniere zusätzlich Androgene gebildet werden (24). Dafür sind vor allem 11-oxygenierte Androgene von Bedeutung, da sie ausschließlich von den Nebennieren synthetisiert werden und nicht, wie beispielsweise Testosteron, auch aus den

Keimdrüsen stammen können (60, 83). Insbesondere 11 $\beta$ -Hydroxyandrostendion und 11-Ketotestosteron erscheinen als am besten geeignet, den Anteil der Nebennieren an zirkulierenden Androgenen einzuschätzen (81).

Es gibt zudem Hinweise dafür, dass Effekte, welche bisher Testosteron zugeordnet wurden, möglicherweise auf 11-Ketotestosteron zurückzuführen sind (84). Ursächlich hierfür wird unter anderem die ähnliche androgene Potenz von 11-Ketotestosteron im Vergleich zu Testosteron gesehen (84).

Die Urinmetabolite der „klassischen“ Androgene, wie Androsteron oder Etiocholanolon, waren in den ersten 1 - 1,5 Lebensjahren im untersuchten Patientenkollektiv nicht in relevanten Konzentrationen im Urin nachweisbar. Auch in der Arbeit von Kamrath et al. aus dem Jahr 2018 stellte sich bei Kindern mit AGS eine Dominanz von 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron im Vergleich zu den übrigen Androgen-Steroidmetaboliten dar (34). 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron zeigte dabei auch, im Vergleich zu Androsteron bzw. Etiocholanolon, deutlich höhere Konzentrationen über alle untersuchten Altersgruppen hinweg. Kamrath et al. leiteten daraus ab, dass es aufgrund der Therapie mit Hydrocortison zu einer Supprimierung von Androsteron bzw. Etiocholanolon kommt (28). Dies macht sie zu ungeeigneten Biomarkern zur Erkennung eines Androgen-Exzesses bzw. zur Therapie-Kontrolle bei Kindern mit AGS (28).

Dhom konnte übereinstimmend dazu in seiner Arbeit aus dem Jahr 1973 veranschaulichen, dass die Zona reticularis der NNR im 1. Lebensjahr noch gänzlich fehlt und die Ausbildung dieser erst im 2. Lebensjahr beginnt (16). Dies legt die relative Unreife der Zona reticularis in den ersten Lebensjahren nahe, denn erst nach entsprechender Reifung der Zona reticularis lassen sich messbare Konzentrationen der konventionellen Androgen-Metabolite nachweisen. Auch zeigt sich hierdurch der vermutliche Ursprungsort der „klassischen“ Androgene: die Zona reticularis der Nebennierenrinde. Im Gegensatz dazu lässt sich feststellen, dass 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron als Vertreter der 11-oxygenierten Androgen-Steroidmetabolite trotz der relativen Unreife der Zona reticularis bereits im Neugeborenenalter in relevanten Konzentrationen im Urin nachweisbar ist (34). 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron wird dabei nicht in der Zona reticularis hergestellt, sondern hauptsächlich im peripheren Gewebe, einschließlich der Leber, als Metabolit von 11-Hydroxyandrostendion, welches adrenalen Ursprungs ist. (84)

Der Nachweis der Urinsteroidmetabolite Androsteron- und Etiocholanolon über die Zeit steht dabei sinnbildlich für die Reifung der Nebennierenrinde, im Besonderen der Zona reticularis.

Passend zu diesem Reifungsprozess zeigten sich auch in der vorliegenden Studie erst mit 1, respektive 1,5 Lebensjahren messbare Konzentrationen (Median) an Androsteron- und Etiocholanolon, welche bis zur Gruppe der 4-Jährigen kontinuierlich zunahmen.

Eine mögliche Erklärung für die bereits im ersten Lebensjahr relevanten 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron-, nicht jedoch Androsteron-Konzentrationen im Urin, ist ein weiterer Syntheseweg des 11-oxygenierten Androgens 11 $\beta$ -Hydroxyandrostendion (25).

Dazu stellten Jailer et al. im Jahr 1955 erstmalig dar, dass die Gabe von 17-Hydroxyprogesteron beim Gesunden zu einem Anstieg der Androsteron-, nicht jedoch der 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron-Ausscheidung führte (25). Demgegenüber zeigte sich bei der Gabe von 21-Deoxycortisol eine signifikante Erhöhung der 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron-Ausscheidung (25). Kamrath et al. konnten ergänzend in ihrer Untersuchung aus dem Jahr 2018 zeigen, dass 11 $\beta$ -Hydroxyandrostendion unter Umgehung der üblichen Vorstufen direkt aus 21-Deoxycortisol gebildet werden kann (34). Dies zeigt, dass 11 $\beta$ -Hydroxyandrostendion, als Vertreter der 11-oxygenierten Androgene, sowohl über Androstendion als auch unter Umgehung direkt aus 21-Deoxycortisol gebildet werden kann (34).

Aufgrund der in der vorliegenden Untersuchung, ähnlich zu Etiocholanolon, insgesamt niedrigen Androsteron-Konzentrationen über die untersuchten Altersgruppen hinweg, ist nicht anzunehmen, dass ein alternativer Androgen-Syntheseweg im Sinne des Backdoor-Pathways involviert ist (32). Der Backdoor-Pathway kann folglich in der vorliegenden Untersuchung vernachlässigt werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Kamrath et al. (2017) in Bezug auf die Untersuchung von AGS-Patienten im Alter von 3 bis 11 Jahren, wonach der Backdoor-Pathway im untersuchten Patientenkollektiv ebenfalls keine Rolle spielte (33).

Jedoch konnte durch In-vitro-Studien in den letzten Jahren eine potenzielle Verbindung zwischen dem Syntheseweg der 11-oxygenierten Androgene und dem Backdoor-Pathway gezeigt werden (4, 17, 89, 90). Dieser mögliche Einstieg in den Syntheseweg, welcher als C11-Oxy-Backdoor-Pathway bezeichnet wird, könnte entweder über Progesteron oder über 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron erfolgen (4, 17, 89, 90).

Erste Schritte dieses C11-Oxy-Backdoor-Pathways beinhalten die Umwandlung von Progesteron bzw. 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron (17-OHP) zu 11 $\beta$ -hydroxylierten Verbindungen durch *CYP11B* (4, 17, 89, 90). Darauf folgen mehrere Umwandlungen durch Enzyme, welche auch am Backdoor-Pathway beteiligt sind und letztendlich zu 11-Ketodihydrotestosteron führen, einem potenten Androgen (4, 17, 89, 90). Der

potenzielle Einfluss dieses Syntheseweges ist Gegenstand der aktuellen Forschung (4, 17, 89, 90).

Auch für Dehydroepiandrosteron (DHEA) ergaben sich entlang der untersuchten Altersgruppen in der vorliegenden Untersuchung Werte unterhalb der Nachweisgrenze. Rezvani et al. (1983) stellten analog dazu fest, dass die DHEA-Werte untersuchter AGS-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe sechs bis sieben Mal niedriger waren (61). Nach Kamrath et al. (2017) und Turcu et al. (2016) resultierte dies aus einer starken Supprimierung, am ehesten infolge der Hydrocortison-Therapie (33, 83).

Wie Rezvani et al. (1983) und auch Völkl et al. (2011) jedoch feststellten, fungiert DHEA nicht als valider Indikator eines Hyperandrogenismus bei Patienten mit AGS (61, 91). Dies macht ihn zu einem unzuverlässigen Parameter der Therapiekontrolle (84). Er dient aufgrund seiner eigenen geringen androgenen Aktivität viel mehr als Vorläufer aktiver Androgene, wie Testosteron oder Dihydrotestosteron (81).

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich außerdem, dass die Urinsteroidmetabolit-Konzentrationen von Tetrahydrocortisol in der Gruppe der 0-Jährigen gegenüber der 0,5-Jährigen stark erniedrigt waren (57,5 vs. 414,4 ug/l). Dies lässt sich durch die relative Unreife von Leber und Nieren bei Neugeborenen erklären, welche unter anderem in einer geringeren glomerulären Filtrationsrate der Nieren resultiert (3). Dadurch ist auch ihre Fähigkeit zur Entgiftung (Clearance) von Tetrahydrocortisol, einem über den Harn ausgeschiedenen Steroidmetaboliten, vermindert (3).

#### **5.4 Beurteilung der Therapie mittels Clusteranalyse**

Die durchgeführte Clusteranalyse ermöglichte es, das untersuchte Patientenkollektiv in drei verschiedene Cluster mit jeweils markanter Steroidmetabolit-Signatur zu unterteilen. Durch die Analyse konnten drei verschiedene Patientengruppen herausgebildet werden: eine Gruppe von unterbehandelten Patienten (Cluster 1), eine Gruppe von am ehesten adäquat therapierten Patienten (Cluster 2) und eine Gruppe von überbehandelten Patienten (Cluster 3).

Hinsichtlich der Hydrocortison-Tagesdosis zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den drei Clustern ( $p=0,55$ ). Die Hydrocortison-Tagesdosis befand sich dabei im Median im Bereich von 11,0 – 12,3 mg/m<sup>2</sup>/d und damit in dem gemäß dem in der Endocrine Society Clinical Practice Guideline empfohlenen Bereich zwischen 10 – 15 mg/m<sup>2</sup>/d (70).

Auch in der im Jahr 2022 von Neumann et al. publizierten multizentrischen retrospektiven Kohortenstudie mit mehr als 300 Probanden mit AGS im Alter von 0 – 3

Jahren zeigte sich eine ähnliche Hydrocortison-Tagesdosis im untersuchten Patientenkollektiv von im Mittel 11,5 mg/m<sup>2</sup>/d (50).

In Anbetracht der unterschiedlichen Charakteristiken der Cluster wird deutlich, dass die empfohlene therapeutische Dosis nicht mit einer adäquaten Stoffwechseleinstellung gleichzusetzen ist (28).

Auch hinsichtlich der Wachstumsparameter stellten sich in der vorliegenden Untersuchung keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Clustern der betrachteten Altersgruppen bis 4 Jahren dar. Anzumerken ist, dass die Anzahl an Patienten pro Cluster begrenzt war und zudem die anthropometrischen Daten eine erhebliche Varianz aufwiesen.

Die fehlenden signifikanten Unterschiede könnten auf dem Umstand beruhen, dass Veränderungen der Steroidmetabolit-Signatur vor körperlichen Veränderungen, wie einer Wachstumsretardierung oder einer starken Gewichtszunahme, sichtbar sind (28, 41).

Im ersten Cluster zeigten sich insgesamt stark erhöhte und damit unsupprimierte Androgen- und 17-OHP-Konzentrationen, bei jedoch ebenfalls leicht erhöhten Cortisol-Konzentrationen. Diese Konstellation ist mit einer Hydrocortison-Unterbehandlung vereinbar. Die leicht erhöhten Cortisol-Konzentrationen sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Patienten in den Wochen vor der Vorstellung zur Routineuntersuchung kein Hydrocortison einnahmen, jedoch wenige Tage vor der Vorstellung damit begannen.

Die Größe sowie der BMI in SDS entsprachen in Näherung 0 (Median). Die Hydrocortison- als auch die Fludrocortison-Tagesdosis lag zwischen denen von Cluster 2 und 3.

Die Kombination aus unsupprimierten Androgen-Konzentrationen, bei jedoch gleichzeitig erhöhten Cortisol-Konzentrationen und durchschnittlicher Hydrocortison-Dosis, lässt an ein Therapieversagen im Sinne einer Compliance-Problematik denken. Ähnlich wie es Kamrath et al. in ihrer Studie (2020) mit über 100 AGS-Patienten bei einem durchschnittlichen Alter von 7 Jahren beschrieben haben, konnte im Rahmen einer Clusteranalyse ein Cluster des Therapieversagens identifiziert werden (30). In diesem zeigte sich eine erhöhte Ausscheidung von Cortisol- und Cortison-Metaboliten im Urin, im Sinne unsupprimierter Nebennieren (30). Mögliche Ursachen für das Versagen der Hydrocortison-Behandlung könnten in intraindividuellen Unterschieden in der Absorption und Halbwertszeit von oralem Hydrocortison oder einer mangelnden Compliance begründet sein (22, 42).

Das Cluster 2 der vorliegenden Untersuchung war hingegen durch mittlere Androgen-, 17-OHP- und Cortisol-Konzentrationen charakterisiert, vereinbar mit einer am ehesten adäquaten Therapie- und damit angemessenen Stoffwechseleinstellung.

Die glukokortikoide Eigenschaft bzw. Aktivität des Fludrocortisons, dessen Glukokortikoid-einsparender Effekt und/ oder eine bessere Compliance der Probanden könnten dazu beigetragen haben, dass die ermittelten Androgen-Konzentrationen bei nahezu gleicher Hydrocortison-Tagesdosis (12,3 vs. 12,2 mg/m<sup>2</sup>/d) im Vergleich zu Cluster 1 deutlich supprimiert waren (6, 63).

Insgesamt zeigte sich also bei nahezu gleicher Hydrocortison-Tagesdosis (12,3 vs. 12,2 mg/m<sup>2</sup>/d) und trotz signifikant höherer Fludrocortison-Dosis (101,6 vs. 88,2 µg/m<sup>2</sup>/d) eine deutlich bessere Stoffwechseleinstellung, verglichen zum Cluster 1. Dies verdeutlicht insbesondere die Bedeutung der Compliance der Patienten zur Therapie. Die signifikant höhere Fludrocortison-Dosis des Cluster 2 eröffnet die Frage, inwiefern Patienten des Cluster 2 eine schwerere AGS-Verlaufsform, insbesondere einen schwereren Salzverlust, aufwiesen. Aufgrund des Studiendesigns und fehlender Angaben für Renin und Blutdruck kann diese Frage nicht abschließend beantwortet werden.

Bonfig und Schwarz (2014) ermittelten beim Vergleich von normotensiven zu iatrogen hypertensiven Probanden mit AGS eine Fludrocortison Dosierung von im Mittel >250 µg/m<sup>2</sup>/d (6). Bei einem Wert der Fludrocortison-Dosis im Cluster 2 von im Median 101,6 µg/m<sup>2</sup>/d ist eine parallel vorliegende iatrogene Hypertonie daher eher nicht anzunehmen. Zudem stellten Bonfig und Schwarz in ihrer Untersuchung aus dem Jahr 2014 von 33 Patienten fest, dass mehr als 50 % der untersuchten AGS-Patienten im Alter von 1,5 Jahren einen hypertensiven systolischen Blutdruck aufwiesen (6). Im Alter von 4 Jahren betrug die Prävalenz noch 15 %, kongruent mit einer Abnahme der Fludrocortison Dosierung (6). Auch zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem systolischen und diastolischen Blutdruck sowie der Fludrocortison Dosierung (6). Es gibt dabei klare Hinweise, dass die Langzeitanwendung von Fludrocortison, insbesondere bei älteren Kindern, mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Hypertonie einhergeht (5, 6, 40).

Die niedrigsten Androgen- und 17-OHP-Konzentrationen prägten das Cluster 3.

Anhand der Wachstumsparameter war erkennbar, dass die Probanden des Cluster 3 mit einer Körpergröße in SDS von im Median -1,05 am langsamsten wuchsen, am kleinsten waren und über den höchsten BMI in SDS von 0,91 (Median) verfügten (statistisch

jeweils nicht signifikant). Diese typische Konstellation aus Wachstumsparametern und Steroidmetaboliten spricht für eine Überbehandlung mit Supprimierung der Nebenniere. Anhand der im Vergleich zu den übrigen Clustern jedoch zugleich niedrigsten Hydrocortison-, als auch Fludrocortison-Tagesdosis ist anzunehmen, dass eine Überbehandlung nicht allein anhand der Hydrocortison-Dosierung festzustellen ist, sondern diese eher eine Orientierung hinsichtlich der Therapieeinstellung ermöglicht. Die Therapieeinstellung ist vielmehr anhand des jeweiligen Urinprofils individuell vorzunehmen (30).

Die Ergebnisse der Clusteranalyse mit mehr als 50 % inadäquat therapierten Patienten (Summe der Cluster 1 und 3 = 32 von 60 Probanden), im Sinne einer Unter- oder Überbehandlung mit Hydrocortison, verdeutlichen die Notwendigkeit, geeignete Marker zum Therapiemonitoring zu ermitteln. Insbesondere aus dem Grund, dass bislang keine konkreten Behandlungsziele für Kleinkinder und Säuglinge definiert sind.

Ausgehend von den gebildeten Ratios, bestehend aus 17-OHP- bzw. Androgen-Metaboliten (Zähler) zu Tetrahydrocortison (THE) (Nenner) als wichtigsten Cortisol-Metaboliten, stellten sich die höchsten Werte in Cluster 1, Werte zwischen Cluster 1 und 3 in Cluster 2 und gegen null tendierende Werte in Cluster 3 dar.

Diese Ergebnisse sind somit analog zur Zuordnung der Cluster in unter- (Cluster 1), adäquat (Cluster 2), und übertherapierte (Cluster 3) Patienten zu betrachten. Dies veranschaulicht die fehlende (Cluster 1), ausgewogene (Cluster 2) als auch verstärkte Supprimierung der Nebenniere (Cluster 3).

Die Ergebnisse der ROC-Analyse zeigten, dass der 11-oxygenierte Androgen-Metabolit 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron und der 17-OHP-Metabolit 11-Ketopregnanetriol am geeignetsten sind, die einzelnen Cluster voneinander zu separieren.

Bei der Analyse des Clusters der am ehesten adäquat behandelten Patienten gegen das Cluster der überbehandelten Patienten zeigte sich zudem, dass der 11-oxygenierte Androgen-Metabolit 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron mit einer Konzentration von 24,2  $\mu\text{g/l}$  am besten geeignet für die Trennung der jeweiligen Cluster war. Überbehandelte Patienten (Cluster 3) besaßen dabei, im Sinne einer Androgen-Supprimierung, ein beinahe 17-fach erniedrigtes 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron im Vergleich zum Cluster der am ehesten adäquat behandelten Patienten (Cluster 2).

Dies verdeutlicht erneut die Bedeutung der 11-oxygenierten Androgene im Verständnis um die pathophysiologischen Prozesse bei Patienten mit AGS und die Rolle als potenzieller Biomarker zum Therapiemonitoring (28).

## **5.5 Vergleich der Steroidkonzentration unter dem Kriterium der Wachstumsgeschwindigkeit in SDS**

Der Vergleich der drei besten Diskriminatoren, 11-OH-An zu THE, 11-OH-An und PT, hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit ergab jeweils signifikante Unterschiede unter dem Kriterium der Wachstumsgeschwindigkeit über -1 bzw. unter -1 (SDS).

Bei AUC-Werten der ausgewählten Diskriminatoren von jeweils über 0,9 ist von einer hohen Testgüte auszugehen. Das bedeutet, dass nur wenige falsch-negative oder falsch-positive Ergebnisse zu erwarten sind.

Probanden mit verlangsamtem Wachstum und einer Wachstumsgeschwindigkeit von weniger als -1 (SDS) verfügten, als Zeichen der Überbehandlung, über signifikant niedrigere Werte für 11-OH-An zu THE, 11-OH-An bzw. PT.

Dies verdeutlicht, dass Probanden mit schlechterem Wachstum als Ausdruck einer Überbehandlung deutlich stärker supprimierte Androgene aufweisen. Dies zeigte sich insbesondere bei 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron- bzw. 17-OHP-Metaboliten, entsprechend den Werten dieser Metabolite im Cluster 3.

Am ehesten normal wachsende Patienten mit einer Wachstumsgeschwindigkeit von größer als -1 (SDS) zeigten dagegen, im Sinne von weniger stark supprimierten Androgenen, signifikant höhere 11-OH-An zu THE, 11-OH-An bzw. PT-Werte. Dieses Erkenntnis deckt sich mit den Werten der Cluster der unter-, als auch der adäquat behandelten Probanden.

Eine Unterbehandlung birgt insbesondere das Risiko eines beschleunigten Körperwachstums, verbunden mit einem akzelerierten Knochenalter und vorzeitigem Epiphysenfugenschluss (76).

Diese Erkenntnisse verdeutlichen, dass die Wachstumsgeschwindigkeit von -1 SDS ein signifikantes Unterscheidungsmerkmal darstellt, welches zwischen einer Überbehandlung bei einer signifikant stärkeren Supprimierung und einer adäquaten Therapie differenzieren kann.

## 5.6 Limitationen der Arbeit

Nachfolgend wird auf einige Limitationen der Studie eingegangen, welche die Art der Datenerhebung, die Verwendung von Spontanurinproben, den Umfang der Wachstumscharakterisierung und die nicht vorhandene Vergleichsgruppe umfassen.

Genutzt wurden retrospektiv erhobene Daten. Hierbei wurden mittels des Probenbegleitscheins anthropometrische bzw. therapierelevante Daten erfasst und vor allem extern durch Zuweiser erhoben. Dabei bestand das Risiko einer mangelhaften und unvollständigen Dateneingabe.

Aufgrund des jungen Alters der untersuchten Patienten war es nicht möglich, auf Ergebnisse von 24-Stunden-Sammelurinproben zurückzugreifen. Diese hätten die Erfassung der Urin-Tagesausscheidung des jeweiligen Metabolits ermöglicht.

Gerade die Urinsammlung gestaltet sich bei insbesondere sehr jungen Patienten äußerst schwierig. Aufgrund dessen war es notwendig, im untersuchten Patientenkollektiv Spontanurinproben unter Angabe der Konzentration des jeweils untersuchten Urinsteroidmetabolits (in  $\mu\text{g/l}$ ) zu verwenden.

Die Bildung von Ratios, aus Androgen-, bzw. 17-OHP-Metaboliten zum wichtigsten Cortisol-Metabolit THF, diente daher dazu, die methodisch bedingten Unterschiede in der Konzentration der einzelnen Urinproben auszugleichen und die Proben besser miteinander vergleichbar zu machen (28).

Unter Verwendung von 24-Stunden-Sammelurinproben konnte Kamrath et al. in der Untersuchung einer Gruppe von Patienten mit AGS im Alter von 3 bis 9 Jahren zeigen, dass sich bei Anwendung einer Clusteranalyse ein viertes Cluster herausbildete (30). Dieses Cluster, welches einen Anteil von etwa 30 % besaß, war durch sowohl erhöhte Androgen- als auch Cortisol-Metabolite gekennzeichnet (30). Dies wurde im Sinne eines Therapieversagens gedeutet (30).

Gründe für das Therapieversagen waren gemäß Kamrath et al. eine Nicht-Kompatibilität des jeweiligen Hydrocortison-Dosisregimes zur circadianen Rhythmik der Nebenniere, sowie Unterschiede in der intra-individuellen Aufnahme, der Halbwertszeit des Hydrocortisons und einem Mangel an Compliance (30).

Infolge einer zu geringen Datenfülle für die Angabe der Wachstumsgeschwindigkeit in SDS (81 Werte bei 158 Datensätzen, entsprechend einem Anteil von 51 %) und einer somit zu geringen Aussagekraft, konnte eine Auswertung der

Wachstumsgeschwindigkeit in SDS für die Gruppe „AGS-Wachstum“ nicht vorgenommen werden.

Auch bedingt durch die Art der Studie als retrospektive Untersuchung und durch den Umstand, dass Parameter wie der genetische Zielgrößenbereich oder auch das Skeletalter nicht miterfasst worden sind, waren allgemeingültige Aussagen zum Wachstum der Gruppe „AGS-Wachstum“ nur eingeschränkt möglich.

Außerdem war ein Vergleich zu physiologischen Steroidmetabolom-Werten aufgrund einer fehlenden gesunden Vergleichskohorte der untersuchten Altersgruppe nicht möglich.

## **5.7 Ausblick**

Durch Herausstellen von drei charakteristischen Cluster, welche unter-, adäquat und übertherapierten Patienten zugeordnet werden konnten, ergeben sich unmittelbare Konsequenzen für die klinische Praxis hinsichtlich der Notwendigkeit zur Erhöhung, Beibehaltung sowie Reduktion der jeweiligen Hydrocortison-Dosis (30). Auch ermöglicht die Identifizierung dieser unterschiedlichen Stoffwechsellmuster einen personalisierten diagnostischen und therapeutischen Ansatz (28).

Der zugrundeliegende Ansatz der Metabotypisierung könnte in der klinischen Praxis helfen, junge Patienten mit AGS anhand ihres Steroidprofils einer der drei Gruppen zuzuordnen und die Hydrocortison-Therapie entsprechend zu adjustieren (28).

Resultierend aus den dargestellten Ergebnissen ist dabei festzustellen, dass eine adäquate Nebennieren-Supprimierung und damit eine Reduktion von Unter- bzw. Überbehandlung bei Patienten mit AGS eine Individualisierung der jeweiligen Hydrocortison-Einstellung erfordert (28). Dies ist dabei ungeachtet der Empfehlungen der Endocrine Society Clinical Practice Guideline (2018) zur Höhe der zu verordnenden Hydrocortison-Tagesdosis zwischen 10 – 15 mg/m<sup>2</sup>/d zu betrachten (70).

Darüber hinaus wäre durch eine individuelle, mittels konkreter Biomarker unterstützte, Hydrocortison-Therapie eine Einschätzung möglich, welcher Grad der Therapie-Anpassung angestrebt werden sollte, um das Therapieziel eines im Vergleich zum Gesunden normalen Wachstums zu erreichen.

Für eine individuelle Hydrocortison-Therapie spricht zudem, dass die bisherigen Hydrocortison-Dosierungs-Schemata die circadiane Rhythmik der Nebenniere nicht berücksichtigen (9, 58).

Auch bestehen Unterschiede in der intraindividuellen Aufnahme und der Halbwertszeit von Hydrocortison (22). Des Weiteren kann eine problematische Therapieadhärenz von Patienten einen Grund darstellen, die Hydrocortison-Einstellung zu individualisieren (30).

Eine individualisierte Therapieeinstellung kann einer ansonsten möglicherweise vorschnellen Therapieanpassung im Sinne einer Erhöhung der Hydrocortison-Dosis, welche entsprechend potenziell negativen Langzeitfolgen mit sich bringt, entgegenwirken (30). Als mögliche Langzeitfolgen gelten eine Wachstumsretardierung, eine starke Gewichtszunahme und eine reduzierte Knochenmasse (19, 24, 41, 46).

Die mittels Metabotypisierung gefundenen Biomarker könnten perspektivisch in der klinischen Praxis zum Zweck des Therapiemonitorings der Gruppe der bis 4-Jährigen Einzug halten und die Basis weiterer notwendiger Forschung bilden. Auf deren Grundlage könnten konkrete Handlungsanweisungen für die klinische Praxis entwickelt und so der langfristige Therapie-Outcome von Patienten mit AGS verbessert werden.

Das Zeitalter der personalisierten Biomarker hat gerade erst begonnen und so wird der Erkenntnisgewinn in den kommenden Jahren aller Voraussicht nach rasant voranschreiten (83). Auch da die Möglichkeiten, die sich beispielsweise durch die Anwendung Künstlicher Intelligenz auf Forschung und klinische Praxis eröffnen, nur schwer zu überblicken sind.

Bereits jetzt konnten durch die Anwendung von Massenspektrometrie zur Erstellung von Steroidprofilen bisher vernachlässigte Steroidmetabolite, wie die in dieser Arbeit thematisierten 11-oxygenierten Androgene, mehr in den Fokus gerückt werden (83).

Hierbei sind klinische Studien ein unerlässliches Mittel, um auch zukünftig möglicherweise bislang vernachlässigte Steroidmetabolite als Biomarker in das Therapiemonitoring von AGS-Patienten integrieren zu können (83).

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

**Hintergrund:** Das Adrenogenitale Syndrom, ausgelöst durch eine Mutation im *CYP21A2*-Gen, ist eine gravierende Erkrankung. Insbesondere wenige Wochen nach Geburt sind potenziell lebensgefährliche Verläufe mit schweren Elektrolytentgleisungen bis hin zum Schock möglich. Auch die schwerwiegenden Auswirkungen der Erkrankung, gerade bei ausbleibender bzw. insuffizienter Therapie, verdeutlichen die Gefahren dieser Erkrankung. Die adäquate Therapie mittels Fludrocortison und Hydrocortison ist aufgrund des schmalen Grades zwischen Unter- und Überbehandlung, gerade bei sehr jungen Patienten, schwierig. Zusätzlich ist der Therapieerfolg bei aktuell fehlenden verlässlichen Monitoring-Parametern zum großen Teil vom Behandler abhängig.

**Die Intention** dieser Arbeit bestand darin, das Patientenkollektiv anhand einer retrospektiven Metabotypisierung in einzelne Behandlungsgruppen einzuteilen, das Wachstum und das Harnsteroidmetabolom zu analysieren und mittels konkreter Biomarker das Therapiemonitoring im Sinne einer möglichst individualisierten Therapie zu verbessern.

**Methoden:** Die Studie nutzte, bei hoher Spezifität und Nicht-Selektivität, das Verfahren der GC-MS zur Analyse der Harnsteroidprofile in Kombination mit einer Clusteranalyse zur Metabotypisierung derer.

**Ergebnisse:** Anhand der in der Arbeit ausgewerteten Daten konnte einerseits gezeigt werden, dass die Patienten mit einem Jahr über ein vermindertes Wachstum verfügten und somit in den ersten Lebensmonaten überbehandelt waren. Mit Hilfe der in dieser Studie durchgeführten Clusteranalyse war es außerdem möglich, die Probanden in drei verschiedene Cluster, für unter-, über- und adäquat behandelte Patienten, einzuteilen. Es stellten sich die 11-oxygenierten Androgene, allen voran 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron, als die dominierenden Androgene bei Patienten im Alter von 0 bis 4 Jahren mit AGS heraus. Es zeigte sich, dass 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron und 11-Ketopregnanetriol die wichtigsten Differenzierungsmerkmale zwischen den Clustern bildeten und daher perspektivisch als Biomarker zum Therapiemonitoring genutzt werden könnten.

**Schlussfolgerung:** Die mittels Metabotypisierung erfolgte Einteilung in unter-, über- und adäquat behandelte Patienten ermöglicht eine differenzierte Therapiekontrolle und ein individualisiertes diagnostisches und therapeutisches Vorgehen. Es bedarf jetzt weiterer Forschung, um auf Grundlage dessen noch spezifischere Handlungsanweisungen für die klinische Praxis zu schaffen und das Therapie-Outcome von Patienten mit AGS zu verbessern.

## 7 SUMMARY

**Background:** Congenital adrenal hyperplasia (CAH), due to a mutation in the CYP21A2 gene, is a serious disease.

Especially in the first few weeks after birth, potentially life-threatening courses with severe electrolyte imbalances and even shock are possible. The serious consequences of the disease, particularly in the absence of or insufficient therapy, illustrate its dangers. Adequate therapy with fludrocortisone and hydrocortisone is challenging, especially in very young patients, due to the fine balance between under-treatment and over-treatment. Additionally, in the absence of reliable monitoring parameters, the success of therapy currently relies very much on the practitioner's expertise.

**The aim** of this study was to divide the group of patients into individual treatment groups through retrospective metabotyping, to analyze growth and the urinary steroid metabolome, and to improve therapy monitoring by identifying concrete biomarkers to enable the most individualized therapy possible.

**Methods:** The study utilized the method of GC-MS, known for its high specificity and non-selectivity, to analyze the urinary steroid profiles. This was combined with cluster analysis to metabotype the profiles.

**Results:** Based on the data analysed in the paper, it was shown that, on the one hand, the patients had reduced growth at one year of age and were also over-treated in the first months of life. On the other hand, the 11-oxygenated androgens, foremost 11 $\beta$ -hydroxyandrosterone, turned out to be the dominant androgens in patients aged 0 to 4 years with AGS. With the help of the GC-MS-based cluster analysis performed in this study, it was possible to divide the subjects into three different clusters, for under-, over- and adequately treated patients. It was shown that 11 $\beta$ -hydroxyandrosterone and 11-ketopregnanetriol were the most important differentiating features between the clusters and could therefore be used in the future as biomarkers for therapy monitoring.

**Conclusion:** The classification into under-, over-, and adequately treated patients by means of metabotyping enables differentiated therapy monitoring and an individualised diagnostic as well as therapeutic approach. Further research is now needed to create even more specific guidelines for clinical practice and to improve the therapy outcome of patients with AGS.

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Amor M, Parker KL, Globerman H, New MI, White PC. Mutation in the CYP21B gene (Ile-172----Asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(5):1600-4.
2. Antonelli J, Claggett BL, Henglin M, Kim A, Ovsak G, Kim N, et al. Statistical Workflow for Feature Selection in Human Metabolomics Data. *Metabolites*. 2019;9(7).
3. Aranoff G, Rosier A. Urinary tetrahydrocortisone and tetrahydrocortisol glucosiduronates in normal newborns, children and adults. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1980;94(3):371-5.
4. Barnard L, Gent R, van Rooyen D, Swart AC. Adrenal C11-oxy C21 steroids contribute to the C11-oxy C19 steroid pool via the backdoor pathway in the biosynthesis and metabolism of 21-deoxycortisol and 21-deoxycortisone. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2017;174:86-95.
5. Bonfig W, Roehl FW, Riedl S, Dörr HG, Bettendorf M, Brämwig J, et al. Blood Pressure in a Large Cohort of Children and Adolescents With Classic Adrenal Hyperplasia (CAH) Due to 21-Hydroxylase Deficiency. *Am J Hypertens*. 2016;29(2):266-72.
6. Bonfig W, Schwarz HP. Blood pressure, fludrocortisone dose and plasma renin activity in children with classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency followed from birth to 4 years of age. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014;81(6):871-5.
7. Brandt I, Reinken L. Die Wachstumsgeschwindigkeit gesunder Kinder in den ersten 16 Lebensjahren: Longitudinale Entwicklungsstudie Bonn Dortmund. *Klin Padiatr*. 1988;200:451-6.
8. Brosnan PG, Brosnan CA, Kemp SF, Domek DB, Jelley DH, Blackett PR, et al. Effect of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1999;153(12):1272-8.
9. Charmandari E, Matthews DR, Johnston A, Brook CG, Hindmarsh PC. Serum cortisol and 17-hydroxyprogesterone interrelation in classic 21-hydroxylase deficiency: is current replacement therapy satisfactory? *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(10):4679-85.
10. Cheng TQ, Speiser PW. Treatment outcomes in congenital adrenal hyperplasia. *Adv Pediatr*. 2012;59(1):269-81.
11. Chong J, Soufan O, Li C, Caraus I, Li S, Bourque G, et al. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(W1):W486-w94.
12. Chun H, Keleş S. Sparse partial least squares regression for simultaneous dimension reduction and variable selection. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol*. 2010;72(1):3-25.

13. Cole TJ, Green PJ. Smoothing reference centile curves: the LMS method and penalized likelihood. *Stat Med*. 1992;11(10):1305-19.
14. Coulm B, Coste J, Tardy V, Ecosse E, Roussey M, Morel Y, et al. Efficiency of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in children born in mainland France between 1996 and 2003. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2012;166(2):113-20.
15. Dauber A, Kellogg M, Majzoub JA. Monitoring of therapy in congenital adrenal hyperplasia. *Clin Chem*. 2010;56(8):1245-51.
16. Dhom G. The prepuberal and puberal growth of the adrenal (adrenarche). *Beitr Pathol*. 1973;150(4):357-77.
17. du Toit T, Swart AC. The 11 $\beta$ -hydroxyandrostenedione pathway and C11-oxy C21 backdoor pathway are active in benign prostatic hyperplasia yielding 11keto-testosterone and 11keto-progesterone. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2020;196:105497.
18. du Toit T, Swart AC. The 11 $\beta$ -hydroxyandrostenedione pathway and C11-oxy C(21) backdoor pathway are active in benign prostatic hyperplasia yielding 11keto-testosterone and 11keto-progesterone. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2020;196:105497.
19. Eugster EA, Dimeglio LA, Wright JC, Freidenberg GR, Seshadri R, Pescovitz OH. Height outcome in congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency: a meta-analysis. *J Pediatr*. 2001;138(1):26-32.
20. Fachgesellschaften AdWM, -diabetologie DGfKu. S1-Leitlinie Adrenogenitales Syndrom (AGS) im Kindes- und Jugendalter [Internet]. Version 2.0. 2021. Zitiert am 05.08.2023. URL: [https://register.awmf.org/assets/guidelines/174-003l\\_S1\\_Adrenogenitales-Syndrom-AGS-im-Kindes-und-Jugendalter\\_2022-03\\_1.pdf](https://register.awmf.org/assets/guidelines/174-003l_S1_Adrenogenitales-Syndrom-AGS-im-Kindes-und-Jugendalter_2022-03_1.pdf)2021.
21. Flück CE, Miller WL, Auchus RJ. The 17, 20-lyase activity of cytochrome p450c17 from human fetal testis favors the delta5 steroidogenic pathway. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(8):3762-6.
22. Hindmarsh PC, Charmandari E. Variation in absorption and half-life of hydrocortisone influence plasma cortisol concentrations. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015;82(4):557-61.
23. Hird BE, Tetlow L, Tobi S, Patel L, Clayton PE. No evidence of an increase in early infant mortality from congenital adrenal hyperplasia in the absence of screening. *Arch Dis Child*. 2014;99(2):158-64.
24. Jaaskelainen J, Voutilainen R. Growth of patients with 21-hydroxylase deficiency: an analysis of the factors influencing adult height. *Pediatr Res*. 1997;41(1):30-3.
25. Jailer JW, Gold JJ, Vande Wiele R, Lieberman S. 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone and 21-desoxyhydrocortisone; their metabolism and possible role in congenital adrenal virilism. *J Clin Invest*. 1955;34(11):1639-46.
26. Jha S, Turcu AF. Nonclassic Congenital Adrenal Hyperplasia: What Do Endocrinologists Need to Know? *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2021;50(1):151-65.

27. KA LC, Boitard S, Besse P. Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinformatics*. 2011;12:253.
28. Kamrath C, Friedrich C, Hartmann MF, Wudy SA. Metabotypes of congenital adrenal hyperplasia in infants determined by gas chromatography-mass spectrometry in spot urine. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2023;231:106304.
29. Kamrath C, Hartmann MF, Boettcher C, Zimmer KP, Wudy SA. Diagnosis of 21-hydroxylase deficiency by urinary metabolite ratios using gas chromatography-mass spectrometry analysis: Reference values for neonates and infants. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016;156:10-6.
30. Kamrath C, Hartmann MF, Pons-Kuhnemann J, Wudy SA. Urinary GC-MS steroid metabotyping in treated children with congenital adrenal hyperplasia. *Metabolism*. 2020;112:154354.
31. Kamrath C, Hartmann MF, Wudy SA. The balance of cortisol-cortisone interconversion is shifted towards cortisol in neonates with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;143:386-91.
32. Kamrath C, Hochberg Z, Hartmann MF, Remer T, Wudy SA. Increased activation of the alternative "backdoor" pathway in patients with 21-hydroxylase deficiency: evidence from urinary steroid hormone analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(3):367-75.
33. Kamrath C, Wettstaedt L, Boettcher C, Hartmann MF, Wudy S, A. The urinary steroidome of treated children with classic 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2017;165:396-406.
34. Kamrath C, Wettstaedt L, Boettcher C, Hartmann MF, Wudy SA. Androgen excess is due to elevated 11-oxygenated androgens in treated children with congenital adrenal hyperplasia. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018;178:221-8.
35. Kohn B, Levine LS, Pollack MS, Pang S, Lorenzen F, Levy D, et al. Late-onset steroid 21-hydroxylase deficiency: a variant of classical congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 1982;55(5):817-27.
36. Krone N, Braun A, Roscher AA, Knorr D, Schwarz HP. Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(3):1059-65.
37. Krone N, Dhir V, Ivison HE, Arlt W. Congenital adrenal hyperplasia and P450 oxidoreductase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007;66(2):162-72.
38. Krone N, Hughes BA, Lavery GG, Stewart PM, Arlt W, L. SCH. Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) remains a preeminent discovery tool in clinical steroid investigations even in the era of fast liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2010;121(3-5):496-504.

39. Lamberts SW, Bruining HA, de Jong FH. Corticosteroid therapy in severe illness. *N Engl J Med*. 1997;337(18):1285-92.
40. Maccabee-Ryaboy N, Thomas W, Kyllö J, Lteif A, Petryk A, Gonzalez-Bolanos MT, et al. Hypertension in children with congenital adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2016;85(4):528-34.
41. Manoli I, Kanaka-Gantenbein C, Voutetakis A, Maniati-Christidi M, Dacou-Voutetakis C. Early growth, pubertal development, body mass index and final height of patients with congenital adrenal hyperplasia: factors influencing the outcome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002;57(5):669-76.
42. McGrady ME, Hommel KA. Medication adherence and health care utilization in pediatric chronic illness: a systematic review. *Pediatrics*. 2013;132(4):730-40.
43. Merke DP, Auchus RJ. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to 21-Hydroxylase Deficiency. *N Engl J Med*. 2020;383(13):1248-61.
44. Moran C, Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Fruzzetti F, Ibanez L, et al. 21-Hydroxylase-deficient nonclassic adrenal hyperplasia is a progressive disorder: a multicenter study. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183(6):1468-74.
45. Mosteller RD. Simplified calculation of body-surface area. *N Engl J Med*. 1987;317(17):1098.
46. Muirhead S, Sellers EAC, Guyda H. Indicators of adult height outcome in classical 21-hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *The Journal of Pediatrics*. 2002;141(2):247-52.
47. Naamneh Elzenaty R, du Toit T, Flück CE. Basics of androgen synthesis and action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2022;36(4):101665.
48. Nennstiel U, Genzel-Boroviczény O, Odenwald B, Ensenauer R, Rossi R, Hoffmann GF, et al. Neugeborenen-Screening auf angeborene Stoffwechselstörungen, Endokrinopathien, schwere kombinierte Immundefekte (SCID) und Mukoviszidose. AWMF online. Das Portal der wissenschaftlichen Medizin: Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin e.V. (GNPI); 2020. Report No.: 024 - 012.
49. Neuhauser H, Schienkiewitz A, Rosario AS, Dortschy R, Kurth B-M. Referenzperzentile für anthropometrische Maßzahlen und Blutdruck aus der Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland (KiGGS). Robert Koch-Institut; 2013.
50. Neumann U, van der Linde A, Krone RE, Krone NP, Güven A, Güran T, et al. Treatment of congenital adrenal hyperplasia in children aged 0-3 years: a retrospective multicenter analysis of salt supplementation, glucocorticoid and mineralocorticoid medication, growth and blood pressure. *Eur J Endocrinol*. 2022;186(5):587-96.
51. New MI. Extensive clinical experience: nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(11):4205-14.
52. New MI, Tong YK, Yuen T, Jiang P, Pina C, Chan KC, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(6):E1022-30.

53. Nimkarn S, Lin-Su K, New MI. Steroid 21 hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Clin North Am.* 2011;58(5):1281-300, xii.
54. Nordenström A, Ahmed S, Jones J, Coleman M, Price DA, Clayton PE, et al. Female preponderance in congenital adrenal hyperplasia due to CYP21 deficiency in England: implications for neonatal screening. *Horm Res.* 2005;63(1):22-8.
55. Nowotny HF, Auer MK, Lottspeich C, Schmidt H, Dubinski I, Bidlingmaier M, et al. Salivary Profiles of 11-oxygenated Androgens Follow a Diurnal Rhythm in Patients With Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021;106(11):e4509-e19.
56. Pang S, Shook MK. Current status of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Curr Opin Pediatr.* 1997;9(4):419-23.
57. Pina A, Macedo MP, Henriques R. Clustering Clinical Data in R. *Methods Mol Biol.* 2020;2051:309-43.
58. Porter J, Blair J, Ross RJ. Is physiological glucocorticoid replacement important in children? *Arch Dis Child.* 2017;102(2):199-205.
59. Prader A. [Genital findings in the female pseudo-hermaphroditism of the congenital adrenogenital syndrome; morphology, frequency, development and heredity of the different genital forms]. *Helv Paediatr Acta.* 1954;9(3):231-48.
60. Rege J, Garber S, Conley AJ, Elsey RM, Turcu AF, Auchus RJ, et al. Circulating 11-oxygenated androgens across species. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2019;190:242-9.
61. Rezvani I, Garibaldi LR, Digeorge AM, Artman HG. Disproportionate suppression of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) in treated patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatr Res.* 1983;17(2):131-4.
62. Rubin RT, Phillips JJ. Adrenal Gland Volume Determination by Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging in Normal Subjects. *Invest Radiol.* 1991;26(5).
63. Sellick J, Aldridge S, Thomas M, Cheetham T. Growth of patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase in infancy, glucocorticoid requirement and the role of mineralocorticoid therapy. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2018;31(9):1019-22.
64. Shackleton CHL. Congenital adrenal hyperplasia caused by defect in steroid 21-hydroxylase. Establishment of definitive urinary steroid excretion pattern during first week of life. *Clin Chim Acta.* 1976;67:287-98.
65. Shackleton CHL. Mass spectrometry in the diagnosis of steroid-related disorders and in hypertension research. *J Steroid Biochem Molec Biol.* 1993;45:127-40.
66. Shiota M, Endo S, Blas L, Fujimoto N, Eto M. Steroidogenesis in castration-resistant prostate cancer. *Urol Oncol.* 2023;41(5):240-51.

67. Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev.* 1994;15(3):342-55.
68. Speiser PW. Growth and development: congenital adrenal hyperplasia-glucocorticoids and height. *Nature Reviews Endocrinology.* 2010;6(1):14-5.
69. Speiser PW. Congenital Adrenal Hyperplasia. *F1000Res.* 2015;4(F1000 Faculty Rev):601.
70. Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, Baskin LS, Conway GS, Merke DP, et al. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(11):4043-88.
71. Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, Merke DP, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(9):4133-60.
72. Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, Merke DP, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2010;95(9):4133-60.
73. Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A, New MI. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet.* 1985;37(4):650-67.
74. Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusie-Luna MT, et al. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest.* 1992;90(2):584-95.
75. Speiser PW, New MI. Genotype and hormonal phenotype in nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;64(1):86-91.
76. Speiser PW, White PC. Congenital Adrenal Hyperplasia. *N Engl J Med.* 2003;349:776-88.
77. Storbeck K-H, Bloem LM, Africander D, Schloms L, Swart P, Swart AC. 11 $\beta$ -Hydroxydihydrotestosterone and 11-ketodihydrotestosterone, novel C19 steroids with androgenic activity: A putative role in castration resistant prostate cancer? *Mol Cell Endocrinol.* 2013;377(1):135-46.
78. Therrell BL. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2001;30(1):15-30.
79. Thil'en A, Nordenström A, Hagenfeldt L, von Döbeln U, Guthenberg C, Larsson A. Benefits of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in Sweden. *Pediatrics.* 1998;101(4):E11.
80. Tsuji-Hosokawa A, Kashimada K. Thirty-Year Lessons from the Newborn Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) in Japan. *Int J Neonatal Screen.* 2021;7(3).
81. Turcu AF, Auchus RJ. Clinical significance of 11-oxygenated androgens. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2017;24(3):252-9.

82. Turcu AF, Mallappa A, Elman MS, Avila NA, Marko J, Rao H, et al. 11-Oxygenated Androgens Are Biomarkers of Adrenal Volume and Testicular Adrenal Rest Tumors in 21-Hydroxylase Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(8):2701-10.
83. Turcu AF, Nanba AT, Chomic R, Upadhyay SK, Giordano TJ, Shields JJ, et al. Adrenal-derived 11-oxygenated 19-carbon steroids are the dominant androgens in classic 21-hydroxylase deficiency. *Eur J Endocrinol*. 2016;174(5):601-9.
84. Turcu AF, Rege J, Auchus RJ, Rainey WE. 11-Oxygenated androgens in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2020;16(5):284-96.
85. Tusie-Luna MT, Speiser PW, Dumic M, New MI, White PC. A mutation (Pro-30 to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. *Mol Endocrinol*. 1991;5(5):685-92.
86. Van der Kamp HJ, Noordam K, Elvers B, Van Baarle M, Otten BJ, Verkerk PH. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in the Netherlands. *Pediatrics*. 2001;108(6):1320-4.
87. Van der Kamp HJ, Otten BJ, Buitenweg N, De Muinck Keizer-Schrama SM, Oostdijk W, Jansen M, et al. Longitudinal analysis of growth and puberty in 21-hydroxylase deficiency patients. *Arch Dis Child*. 2002;87(2):139-44.
88. van der Kamp HJ, Wit JM. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol*. 2004;151 Suppl 3:U71-5.
89. van Rooyen D, Gent R, Barnard L, Swart AC. The in vitro metabolism of 11 $\beta$ -hydroxyprogesterone and 11-ketoprogesterone to 11-ketodihydrotestosterone in the backdoor pathway. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2018;178:203-12.
90. van Rooyen D, Yadav R, Scott EE, Swart AC. CYP17A1 exhibits 17 $\alpha$ hydroxylase/17,20-lyase activity towards 11 $\beta$ -hydroxyprogesterone and 11-ketoprogesterone metabolites in the C11-oxy backdoor pathway. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2020;199:105614.
91. Völkl TM, Öhl L, Rauh M, Schöfl C, Dörr HG. Adrenarche and puberty in children with classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Horm Res Paediatr*. 2011;76(6):400-10.
92. White PC, W. SP. Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency. *Endocr Rev*. 2000;21(3):245-91.
93. Wilson JD, Griffin JE, Russell DW. Steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *Endocr Rev*. 1993;14(5):577-93.
94. Wölfle J, Holterhus PM, Oppelt PG, Wünsch L, Semler JO, Schönau E, et al. Endokrinologie interdisziplinär. *Pädiatrie*. 2019:645-701.
95. World Health O. WHO child growth standards : growth velocity based on weight, length and head circumference : methods and development. Geneva: World Health Organization; 2009.
96. Wudy SA, Dorr HG, Solleder C, Djalali M, Homoki J. Profiling steroid hormones in amniotic fluid of midpregnancy by routine stable isotope dilution/gas

chromatography-mass spectrometry: reference values and concentrations in fetuses at risk for 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(8):2724-8.

97. Wudy SA, F. HM, J. H. Hormonal diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in plasma and urine of neonates using benchtop gas chromatography–mass spectrometry. *J Endocrinol.* 2000;165:679-83.

98. Wudy SA, Hartmann MF. Gas chromatography-mass spectrometry profiling of steroids in times of molecular biology. *Horm Metab Res.* 2004;36(6):415-22.

99. Wudy SA, Hartmann MF, Remer T. Sexual dimorphism in cortisol secretion starts after age 10 in healthy children: urinary cortisol metabolite excretion rates during growth. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293(4):E970-6.

100. Wudy SA, Schuler G, Sanchez-Guijo A, Hartmann MF. The art of measuring steroids: Principles and practice of current hormonal steroid analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018;179:88-103.

101. Yanase T, Simpson ER, Waterman MR. 17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase deficiency: from clinical investigation to molecular definition. *Endocr Rev.* 1991;12(1):91-108.

102. Yu AC, Grant DB. Adult height in women with early-treated congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase type): relation to body mass index in earlier childhood. *Acta Paediatr.* 1995;84(8):899-903.

# ANHANG

## ANHANGSVERZEICHNIS

Anhang 1: Tabellarische Auswertung der Wachstumsparameter.....XX

Anhang 2: Übersicht aller erfasster Steroidmetabolite.....XXVII

### Anhang 1: Tabellarische Auswertung der Wachstumsparameter

**Tab. 1 - Entwicklung der Körpergröße (in cm) mit dem Alter der untersuchten männlichen Probanden.**

Alter (Jahren)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
n Probanden	5	6	7	5	7	4	14	15	18
Minimum	48,8	62,8	68,5	77,2	79,1	88,3	90,3	93,7	96,2
25 % Perzentile	50,5	63,9	70,2	79	83,9	88,4	91	95,6	100,5
<b>Median</b>	<b>54,5</b>	<b>68,2</b>	<b>73,8</b>	<b>84,5</b>	<b>86,7</b>	<b>89</b>	<b>97,5</b>	<b>97,3</b>	<b>104</b>
75 % Perzentile	56,9	69,9	75,5	88,8	94,1	92,3	99,3	103,5	108,9
Maximum	58,3	70,9	85,5	89,2	95,5	93,3	102,6	107,2	113
<b>IQR</b>	<b>6,4</b>	<b>5,9</b>	<b>5,3</b>	<b>9,8</b>	<b>10,2</b>	<b>3,9</b>	<b>8,3</b>	<b>7,9</b>	<b>8,4</b>
Unteres 95 %- Konfidenzintervall	49,4	64,0	69,0	77,7	82,4	86,2	93,6	96,9	102,2
Oberes 95 %- Konfidenzintervall	58,3	70,6	79,3	90,3	93,1	93,6	98,8	101,9	106,9

**Tab. 2 - Entwicklung der Körpergröße (in cm) mit dem Alter der untersuchten weiblichen Probanden.**

Alter (Jahren)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
n Probanden	5	8	7	8	9	9	7	9	15
Minimum	53,4	57,2	69,9	73,3	75,4	86,3	88,1	90,5	90,4
25 % Perzentile	54	62,3	71,2	74,9	79,5	87,5	91,6	91,4	96,5
<b>Median</b>	<b>56,1</b>	<b>64,4</b>	<b>71,8</b>	<b>79</b>	<b>82,8</b>	<b>92,2</b>	<b>96,9</b>	<b>95,2</b>	<b>100,7</b>
75 % Perzentile	58,8	70,8	72,7	81,2	84,3	95,8	100,7	105	105
Maximum	60,8	72,7	79,4	83,2	87,4	97,7	100,9	108,2	110,6
<b>IQR</b>	<b>4,8</b>	<b>8,5</b>	<b>1,5</b>	<b>6,3</b>	<b>4,8</b>	<b>8,3</b>	<b>9,1</b>	<b>13,6</b>	<b>8,5</b>
Unteres 95 %- Konfidenzintervall	52,8	61,1	69,8	75,4	79,2	88,5	91,6	92,3	97,9
Oberes 95 %- Konfidenzintervall	59,8	69,7	75,5	81,5	84,7	94,9	100,8	102,7	104,4

**Tab. 3 - Entwicklung der Height-SDS mit dem Alter der untersuchten männlichen Probanden.**

Alter (Jahren)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
Anzahl	5	6	7	5	7	4	14	15	18
Minimum	0	-2,33	-3,36	-2,08	-3,11	-1,4	-1,95	-1,95	-2,13
25 % Perzentile	0	-1,85	-2,62	-1,41	-1,43	-1,37	-1,76	-1,43	-1,02
<b>Median</b>	<b>0</b>	<b>-0,09</b>	<b>-1,13</b>	<b>0,57</b>	<b>-0,49</b>	<b>-1,18</b>	<b>0,1</b>	<b>-0,97</b>	<b>-0,14</b>
75 % Perzentile	0	0,59	-0,44	2,02	1,83	-0,18	0,57	0,63	1,02
Maximum	0	1	3,28	2,15	2,25	0,12	1,46	1,54	1,97
<b>IQR</b>	<b>0</b>	<b>2,44</b>	<b>2,18</b>	<b>3,43</b>	<b>3,26</b>	<b>1,19</b>	<b>2,33</b>	<b>2,06</b>	<b>2,04</b>
Unteres 95 %-Konfidenzintervall	0	-1,83	-3,06	-1,86	-1,95	-2,02	-1,01	-1,1	-0,6
Oberes 95 %-Konfidenzintervall	0	0,91	0,96	2,57	1,52	0,21	0,43	0,2	0,55

**Tab. 4 - Entwicklung der Height-SDS mit dem Alter der untersuchten weiblichen Probanden.**

Alter (Jahren)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
Anzahl	5	8	7	8	9	9	7	9	15
Minimum	0	-3,68	-2,01	-2,94	-3,67	-1,52	-2,15	-2,46	-3,29
25 % Perzentile	0	-1,66	-1,51	-2,38	-2,36	-1,16	-1,17	-2,22	-1,76
<b>Median</b>	<b>0</b>	<b>-0,85</b>	<b>-1,27</b>	<b>-0,92</b>	<b>-1,27</b>	<b>0,26</b>	<b>0,32</b>	<b>-1,21</b>	<b>-0,71</b>
75 % Perzentile	0	1,72	-0,93	-0,14	-0,79	1,33	1,39	1,38	0,37
Maximum	0	2,47	1,67	0,57	0,22	1,91	1,45	2,22	1,78
<b>IQR</b>	<b>0</b>	<b>3,38</b>	<b>0,58</b>	<b>2,24</b>	<b>1,57</b>	<b>2,48</b>	<b>2,56</b>	<b>3,6</b>	<b>2,13</b>
Unteres 95 %-Konfidenzintervall	0	-2,16	-2,06	-2,18	-2,45	-0,92	-1,18	-1,99	-1,41
Oberes 95 %-Konfidenzintervall	0	1,27	0,16	-0,03	-0,65	1,04	1,42	0,77	0,21

**Tab. 5 - Entwicklung des Körpergewichts (in kg) mit dem Alter der untersuchten männlichen Probanden.**

Alter (Jahren)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
Anzahl	5	6	7	5	7	4	14	15	18
Minimum	3,2	6,8	7,4	8,6	10,4	10,6	11,4	12,3	15,1
25 % Perzentile	3,7	7,5	7,8	9,5	11,1	11,1	13,3	14,1	16,3
<b>Median</b>	<b>4,5</b>	<b>8,3</b>	<b>8,8</b>	<b>12,1</b>	<b>12,6</b>	<b>12,8</b>	<b>15,1</b>	<b>15,8</b>	<b>17,9</b>
75 % Perzentile	5,7	9,8	10,1	12,8	13,9	14,8	16,5	18,5	22
Maximum	5,8	9,9	12,1	12,8	15,5	15,4	20,4	20,9	26,5
<b>IQR</b>	<b>2</b>	<b>2,3</b>	<b>2,4</b>	<b>3,4</b>	<b>2,8</b>	<b>3,7</b>	<b>3,2</b>	<b>4,4</b>	<b>5,8</b>
Unteres 95 %- Konfidenzintervall	3,3	7,2	7,6	9	11,1	9,7	13,6	14,6	17,3
Oberes 95 %- Konfidenzintervall	6	9,7	10,5	13,6	14,2	16	16,7	17,7	20,7

**Tab. 6 - Entwicklung des Körpergewichts (in kg) mit dem Alter der untersuchten weiblichen Probanden.**

Alter (Jahren)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
Anzahl	5	8	7	8	9	9	7	9	15
Minimum	4,3	4,8	6,1	7,9	8,9	10,8	12,5	12,2	11,8
25 % Perzentile	4,5	5,8	7,7	8,5	10,4	11,5	14,2	13,8	14,2
<b>Median</b>	<b>5</b>	<b>6,7</b>	<b>8,4</b>	<b>10,4</b>	<b>11,3</b>	<b>14,1</b>	<b>15,8</b>	<b>16,4</b>	<b>16,2</b>
75 % Perzentile	5,5	8,2	9,9	11,4	12,7	15,9	17,1	18,4	18,3
Maximum	6	9,2	10,1	11,9	13,2	17,4	18,2	19,4	21,7
<b>IQR</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>	<b>2,2</b>	<b>2,9</b>	<b>2,3</b>	<b>4,4</b>	<b>2,9</b>	<b>4,6</b>	<b>4,1</b>
Unteres 95 %- Konfidenzintervall	4,2	5,6	7,2	8,8	10,3	12	13,9	14,2	14,9
Oberes 95 %- Konfidenzintervall	5,7	8,1	9,7	11,4	12,4	15,6	17,3	18,1	18,1

**Tab. 7 - Entwicklung des BMI (in kg/m<sup>2</sup>) mit dem Alter der untersuchten männlichen Probanden.**

Alter (Jahren)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
Anzahl	5	6	7	5	7	4	14	15	17
Minimum	13,3	17,2	14,9	14,4	15,1	13,6	13,9	13,7	14,7
25 % Perzentile	13,6	17,3	15	15,1	15,7	14,2	14,9	15,3	15,4
<b>Median</b>	<b>15,2</b>	<b>18,6</b>	<b>16,5</b>	<b>16,1</b>	<b>16,6</b>	<b>16,1</b>	<b>16,1</b>	<b>15,9</b>	<b>16,2</b>
75 % Perzentile	19	19,8	17,4	16,7	17	17,3	16,7	17,3	18,4
Maximum	21,4	20,1	17,7	16,9	17,4	17,7	20,4	20,4	20,5
<b>IQR</b>	<b>5,4</b>	<b>2,5</b>	<b>2,4</b>	<b>1,6</b>	<b>1,3</b>	<b>3,1</b>	<b>1,9</b>	<b>2</b>	<b>3,1</b>
Unteres 95 %- Konfidenzintervall	12,1	17,3	15,4	14,8	15,6	13,2	15,2	15,2	16
Oberes 95 %- Konfidenzintervall	20,1	19,8	17,4	17,1	17,2	18,6	17,3	17,2	17,8

**Tab. 8 - Entwicklung des BMI (in kg/m<sup>2</sup>) mit dem Alter der untersuchten weiblichen Probanden.**

Alter (Jahren)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
Anzahl	5	8	7	8	9	9	7	9	15
Minimum	14,6	14,3	12,1	14,3	14,7	14,4	15	14,9	13,8
25 % Perzentile	14,6	14,8	15,1	15,3	15,7	15,1	15,9	15,9	14,7
<b>Median</b>	<b>15,5</b>	<b>15,7</b>	<b>16,2</b>	<b>16,7</b>	<b>16,5</b>	<b>15,7</b>	<b>16,8</b>	<b>16,4</b>	<b>16,4</b>
75 % Perzentile	16,9	17,3	17,1	17,3	18,2	17,2	17,9	17,6	16,9
Maximum	17,7	17,9	18,7	17,3	20	20,5	19,3	21,1	17,7
<b>IQR</b>	<b>2,3</b>	<b>2,5</b>	<b>2</b>	<b>1,9</b>	<b>2,5</b>	<b>2,1</b>	<b>2</b>	<b>1,7</b>	<b>2,2</b>
Unteres 95 %- Konfidenzintervall	14,1	14,8	14,1	15,3	15,6	14,9	15,5	15,6	15,4
Oberes 95 %- Konfidenzintervall	17,3	17	17,8	17,2	18,1	17,8	18,2	18,3	16,7

**Tab. 9 - Entwicklung des BMI-SDS mit dem Alter der untersuchten männlichen Probanden.**

Alter (Jahren)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
Anzahl	5	6	7	5	7	4	14	15	18
Minimum	0	0,17	-1,56	-1,77	-1	-2,38	-1,93	-2,11	-0,86
25 % Perzentile	0	0,22	-1,54	-1,21	-0,5	-1,8	-0,9	-0,43	-0,26
<b>Median</b>	<b>0</b>	<b>0,96</b>	<b>-0,43</b>	<b>-0,41</b>	<b>0,21</b>	<b>-0,02</b>	<b>0,12</b>	<b>0,12</b>	<b>0,51</b>
75 % Perzentile	0	1,67	0,11	0,01	0,5	0,86	0,63	1,1	2,04
Maximum	0	1,83	0,34	0,21	0,73	1,13	2,72	2,75	4,07
<b>IQR</b>	<b>0</b>	<b>1,45</b>	<b>1,65</b>	<b>1,21</b>	<b>1,01</b>	<b>2,66</b>	<b>1,53</b>	<b>1,53</b>	<b>2,3</b>
Unteres 95 %- Konfidenzintervall	0	0,24	-1,25	-1,49	-0,6	-2,67	-0,62	-0,55	0,27
Oberes 95 %- Konfidenzintervall	0	1,68	0,12	0,36	0,59	2,03	0,85	0,9	1,61

**Tab. 10 - Entwicklung des BMI-SDS mit dem Alter der untersuchten weiblichen Probanden.**

Alter (Jahren)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
Anzahl	5	8	7	8	9	9	7	9	14
Minimum	0	-1,56	-3,99	-1,64	-1,06	-1,26	-0,61	-0,58	-1,58
25 % Perzentile	0	-1,24	-1,19	-0,73	-0,25	-0,63	0,12	0,25	-0,71
<b>Median</b>	<b>0</b>	<b>-0,51</b>	<b>-0,31</b>	<b>0,26</b>	<b>0,37</b>	<b>-0,37</b>	<b>0,8</b>	<b>0,57</b>	<b>0,47</b>
75 % Perzentile	0	0,52	0,29	0,69	1,44	0,97	1,46	1,29	0,91
Maximum	0	0,9	1,32	0,72	2,41	2,65	2,14	2,77	1,17
<b>IQR</b>	<b>0</b>	<b>1,76</b>	<b>1,47</b>	<b>1,42</b>	<b>1,69</b>	<b>1,6</b>	<b>1,34</b>	<b>1,05</b>	<b>1,62</b>
Unteres 95 %- Konfidenzintervall	0	-1,2	-2,19	-0,78	-0,29	-0,71	-0,11	0,06	-0,32
Oberes 95 %- Konfidenzintervall	0	0,33	0,88	0,66	1,36	1,14	1,56	1,53	0,71

**Tab. 11 - Entwicklung der Hydrocortison Dosierung pro Tag (in mg/m<sup>2</sup>/d) mit dem Alter der untersuchten männlichen Probanden.**

Alter (Jahren)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
Anzahl	10	13	13	8	12	17	17	17	19
Minimum	10,4	7,6	7,6	8	9,8	5,9	7	9,2	9,5
25 % Perzentile	11,5	9,2	9,2	11,5	10,6	10,2	9,9	10,7	10,9
<b>Median</b>	<b>14,6</b>	<b>13,7</b>	<b>13,7</b>	<b>12</b>	<b>12,8</b>	<b>11,2</b>	<b>11,2</b>	<b>12,3</b>	<b>11,7</b>
75 % Perzentile	18,3	14,8	14,8	14,2	13,3	13,3	12,9	13,1	12,9
Maximum	23	16,3	16,3	14,7	13,8	15	15,4	16,1	18,8
<b>IQR</b>	<b>6,8</b>	<b>5,6</b>	<b>5,6</b>	<b>2,7</b>	<b>2,7</b>	<b>3,2</b>	<b>3</b>	<b>2,4</b>	<b>2,0</b>
Unteres 95 %- Konfidenzintervall	12,3	10,6	10,6	10,4	11,1	10,2	10	11,2	11,1
Oberes 95 %- Konfidenzintervall	18,1	14,2	14,2	13,9	13	12,5	12,4	13	13,2

**Tab. 12 - Entwicklung der Hydrocortison Dosierung pro Tag (in mg/m<sup>2</sup>/d) mit dem Alter der untersuchten weiblichen Probanden.**

Alter (Jahren)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
Anzahl	9	13	11	13	9	11	11	15	19
Minimum	10,7	10,9	8,5	9,2	10,8	8,4	7,0	7,0	7,4
25 % Perzentile	13,6	12,1	10,0	10,1	11,9	9,6	9,0	9,0	9,9
<b>Median</b>	<b>15,4</b>	<b>13,3</b>	<b>12,0</b>	<b>11,5</b>	<b>13,0</b>	<b>12,4</b>	<b>11,7</b>	<b>12,0</b>	<b>11,6</b>
75 % Perzentile	18,6	15,4	13,6	12,7	14,2	13,1	12,9	13,2	14,4
Maximum	20,0	18,6	16,0	13,9	14,9	15,0	13,7	18,4	18,4
<b>IQR</b>	<b>5,0</b>	<b>3,3</b>	<b>3,6</b>	<b>2,6</b>	<b>2,3</b>	<b>3,5</b>	<b>3,9</b>	<b>4,2</b>	<b>4,5</b>
Unteres 95 %- Konfidenzintervall	13,4	12,4	10,4	10,5	12,0	10,4	9,7	10,2	10,8
Oberes 95 %- Konfidenzintervall	18,0	15,0	13,5	12,4	14,1	13,2	12,5	13,8	13,4

**Tab. 13 - Entwicklung der Fludrocortison Dosierung pro Tag (in  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{d}$ ) mit dem Alter der untersuchten männlichen Probanden.**

Alter (Jahren)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
Anzahl	10	13	11	8	11	16	17	16	17
Minimum	134,6	115,5	65,95	89,18	47,41	0,000	38,94	40,43	36,36
25 % Perzentile	243,0	137,1	97,53	92,21	79,75	72,58	75,00	72,39	70,79
<b>Median</b>	<b>380,0</b>	<b>225,9</b>	<b>119,9</b>	<b>99,79</b>	<b>98,31</b>	<b>88,97</b>	<b>91,90</b>	<b>87,76</b>	<b>91,98</b>
75 % Perzentile	574,9	411,7	195,3	253,5	182,6	142,6	138,1	103,0	118,0
Maximum	724,8	543,5	311,2	355,1	274,7	172,6	169,8	165,0	156,4
<b>IQR</b>	<b>331,9</b>	<b>274,6</b>	<b>97,8</b>	<b>161,3</b>	<b>102,9</b>	<b>70,0</b>	<b>63,1</b>	<b>30,6</b>	<b>47,2</b>
Unteres 95 %- Konfidenzintervall	274,9	179,2	99,55	65,94	90,07	73,51	82,81	74,33	72,96
Oberes 95 %- Konfidenzintervall	540,9	350,3	195,0	245,3	190,9	123,2	124,7	109,9	110,9

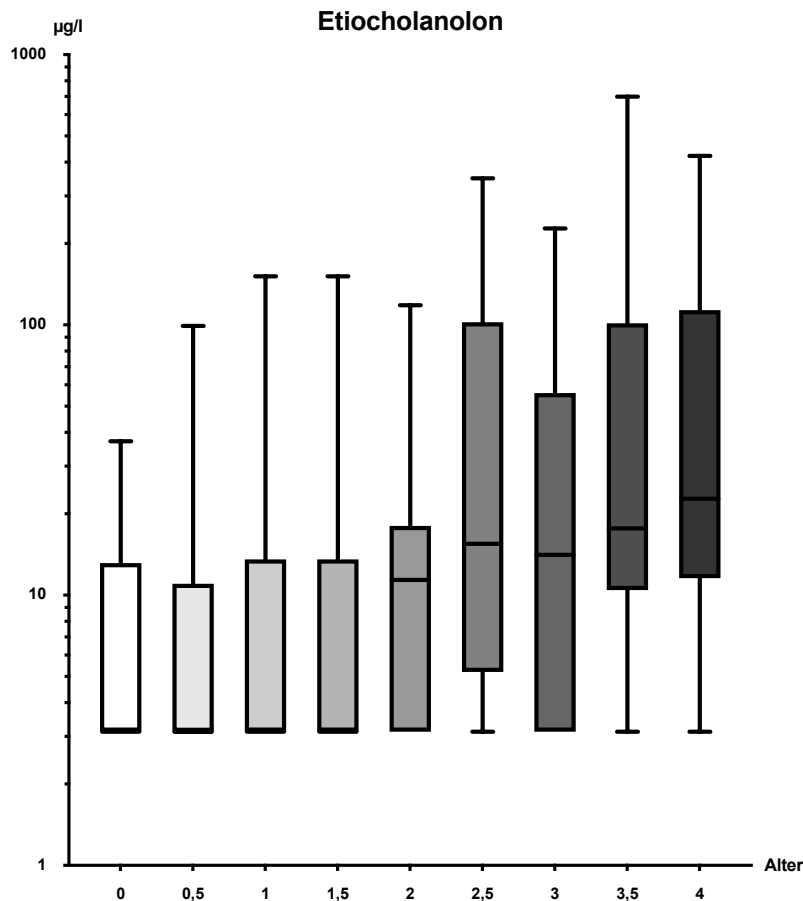
**Tab. 14 - Entwicklung der Fludrocortison Dosierung pro Tag (in  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{d}$ ) mit dem Alter der untersuchten weiblichen Probanden.**

Alter (Jahren)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
Anzahl	9	12	10	12	8	11	10	15	19
Minimum	236,6	121,4	52,97	60,81	57,44	46,64	35,04	33,00	30,62
25 % Perzentile	361,1	181,0	103,4	104,5	91,03	74,90	38,25	45,14	43,86
<b>Median</b>	<b>384,6</b>	<b>242,1</b>	<b>159,7</b>	<b>145,7</b>	<b>145,7</b>	<b>88,20</b>	<b>76,58</b>	<b>75,69</b>	<b>75,29</b>
75 % Perzentile	504,0	353,3	268,0	227,5	194,0	136,2	96,32	122,2	111,9
Maximum	560,3	543,4	361,3	324,3	203,7	192,1	152,0	145,6	149,3
<b>IQR</b>	<b>148,0</b>	<b>120,7</b>	<b>106,7</b>	<b>84,9</b>	<b>88,3</b>	<b>41,6</b>	<b>41,5</b>	<b>42,7</b>	<b>44,7</b>
Unteres 95 %- Konfidenzintervall	338,4	193,3	108,1	114,6	91,36	75,67	50,45	63,82	62,74
Oberes 95 %- Konfidenzintervall	491,4	343,9	260,9	221,8	188,6	133,4	106,9	105,0	96,68

## Anhang 2: Übersicht alle erfasster Steroidmetabolite

Tab. 15 – An (Androsteron) (5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on) (in  $\mu\text{g/l}$ ).

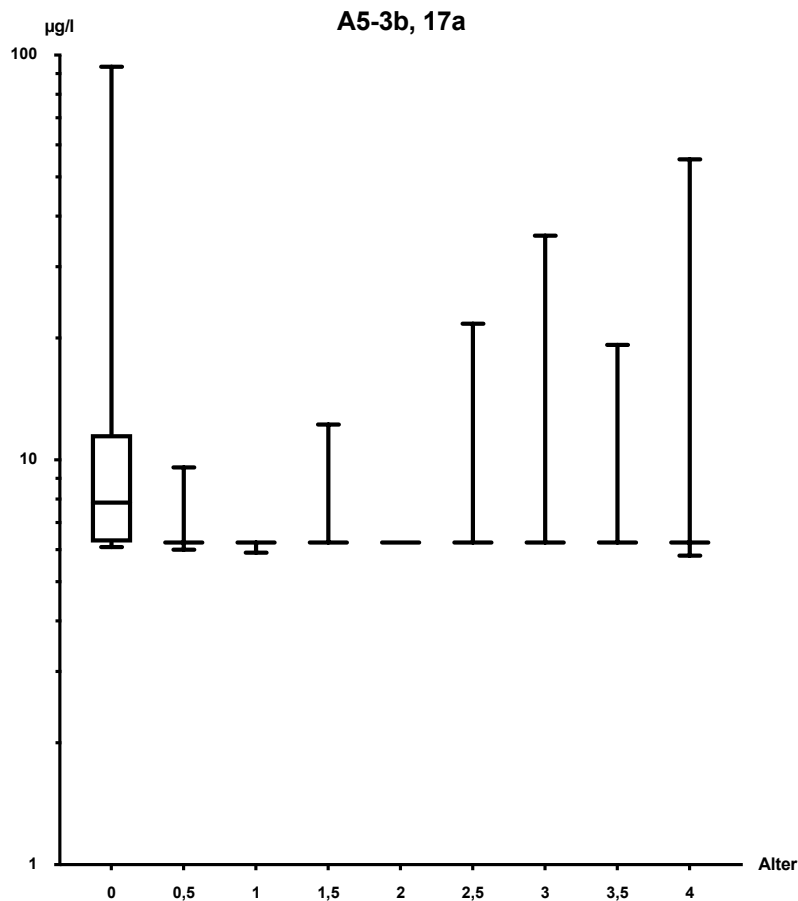
Alter (Jahre)	P5	P25	P50 (Median)	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	< LOD	< LOD	< LOD	23,81	238,2	23,81	0,882*	0,6568*
0,5	< LOD	< LOD	< LOD	15,27	118,2	15,27	0,8819*	0,5524*
1	< LOD	< LOD	< LOD	16,87	555,8	16,87	0,7939	0,4496
1,5	< LOD	< LOD	15,18	34,61	211,3	34,61	1,18	0,6399
2	< LOD	< LOD	12,92	32,03	196,1	32,03	1,165	0,6243
2,5	< LOD	5,574	15,98	119,5	265,2	119,5	1,329	0,6515
3	< LOD	< LOD	15,52	80,35	350,9	80,35	1,264	0,6724
3,5	< LOD	8,463	17,49	116,7	291,1	116,7	1,329	0,6366
4	< LOD	11,02	21,88	132,4	347,8	132,4	1,437	0,6799



**Abb. 1 - Box-Whisker-Plot zu Et (Etiocolanolon) ( $5\beta$ -Androstan- $3\alpha$ -ol-17-on) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

**Tab. 16 - Et (Etiocolanolon) ( $5\beta$ -Androstan- $3\alpha$ -ol-17-on) (in  $\mu\text{g/l}$ ).**

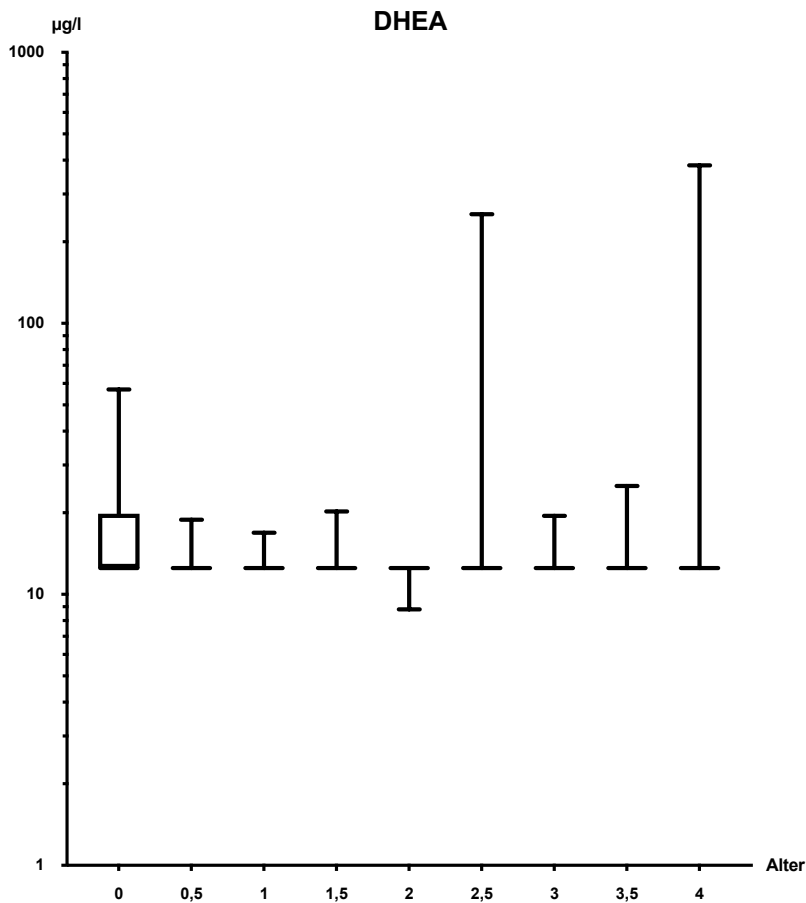
Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	< LOD	< LOD	< LOD	13,15	36,24	13,15	0,712	0,3603
0,5	< LOD	< LOD	< LOD	11,04	98,8	11,04	0,7874*	0,4933*
1	< LOD	< LOD	< LOD	13,55	119,2	13,55	0,7213*	0,3288*
1,5	< LOD	< LOD	< LOD	13,55	119,2	13,55	1,07	0,5671
2	< LOD	< LOD	11,39	18,03	117,8	18,03	1,096	0,5775
2,5	< LOD	5,196	15,48	102,2	251,4	97,004	1,275	0,6142
3	< LOD	< LOD	14,1	55,96	198,5	55,96	1,205	0,6142
3,5	< LOD	10,44	17,66	101,4	276,3	90,96	1,317	0,6072
4	< LOD	11,55	22,74	113,4	271	101,85	1,403	0,6128



**Abb. 2 - Box-Whisker-Plot zu A5-3b,17a (5-Androsten-3β,17α-diol) (in µg/l), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

**Tab. 17 - A5-3b,17a (5-Androsten-3β,17α-diol) (in µg/l).**

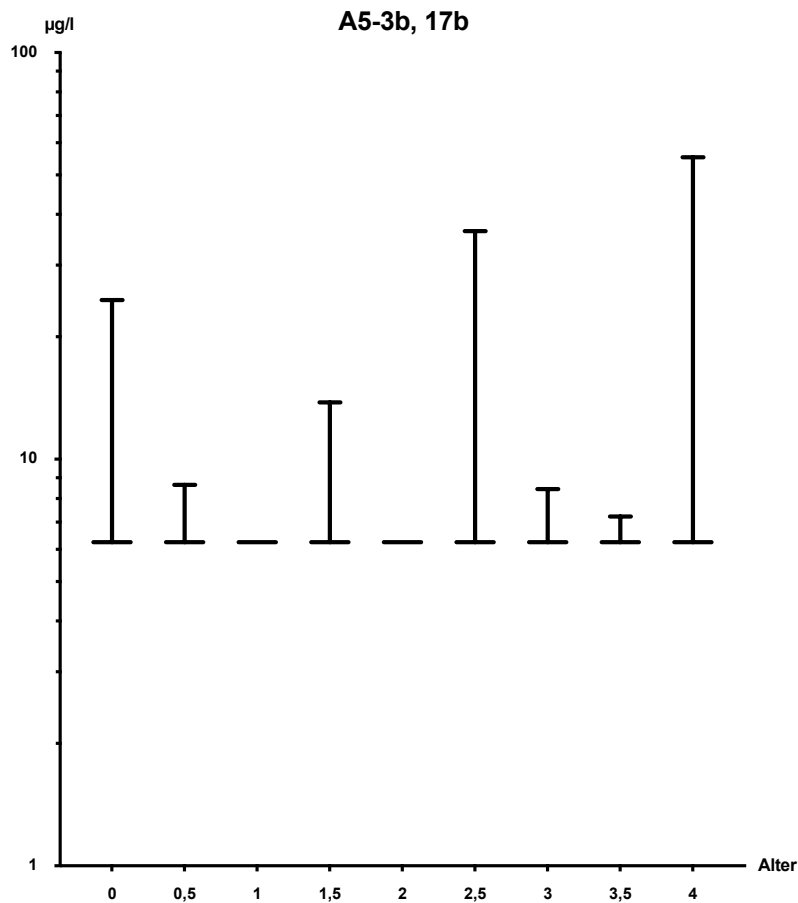
Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	6,097	< LOD	7,845	11,58	91,46	11,58		
0,5	6,1	< LOD	< LOD	< LOD	8,496			
1	5,988	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
1,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	11,33			
2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
2,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	14,76			
3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	23,65			
3,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	10,61			
4	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	18,56			



**Abb. 3 - Box-Whisker-Plot zu DHEA (Dehydroepiandrosteron) (5-Androsten-3 $\beta$ -ol-17-on) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

**Tab. 18 - DHEA (Dehydroepiandrosteron) (5-Androsten-3 $\beta$ -ol-17-on) (in  $\mu\text{g/l}$ ).**

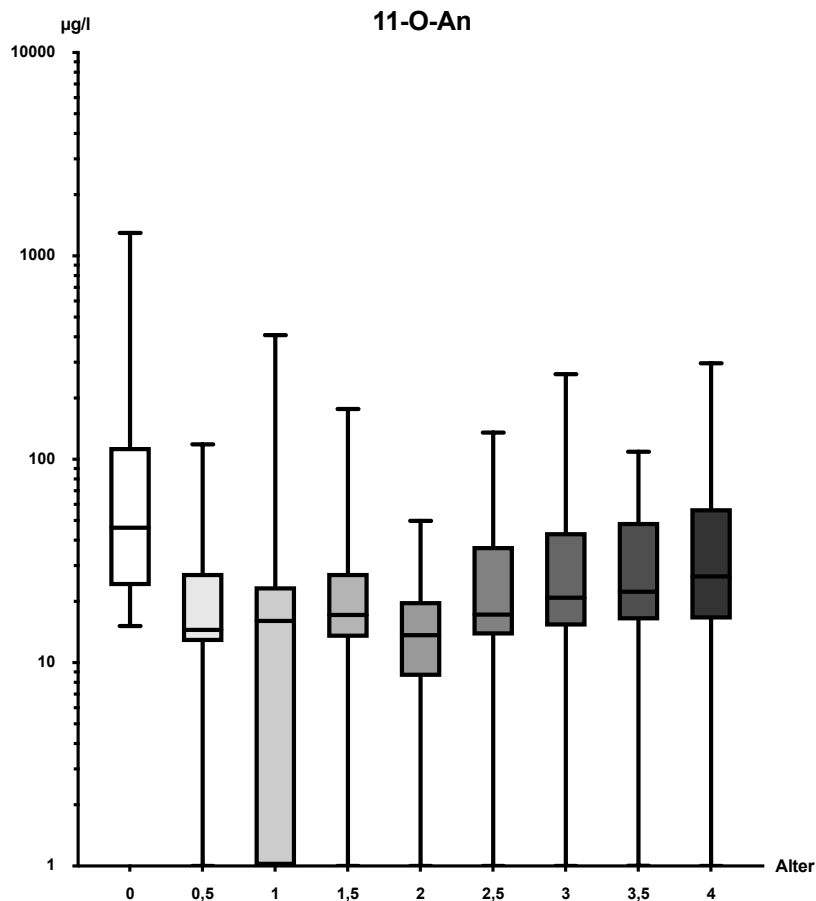
Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	< LOD	< LOD	< LOD	19,84	56,14	19,84		
0,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	16,65			
1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	16,05			
1,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	19,54			
2	9,54	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
2,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	144,7			
3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	16			
3,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	19,63			
4	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	15,75			



**Abb. 4 - Box-Whisker-Plot zu A5-3b,17b (Androstendiol-17 $\beta$ ) (5-Androsten-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

**Tab. 19 - A5-3b,17b (Androstendiol-17 $\beta$ ) (5-Androsten-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol) (in  $\mu\text{g/l}$ ).**

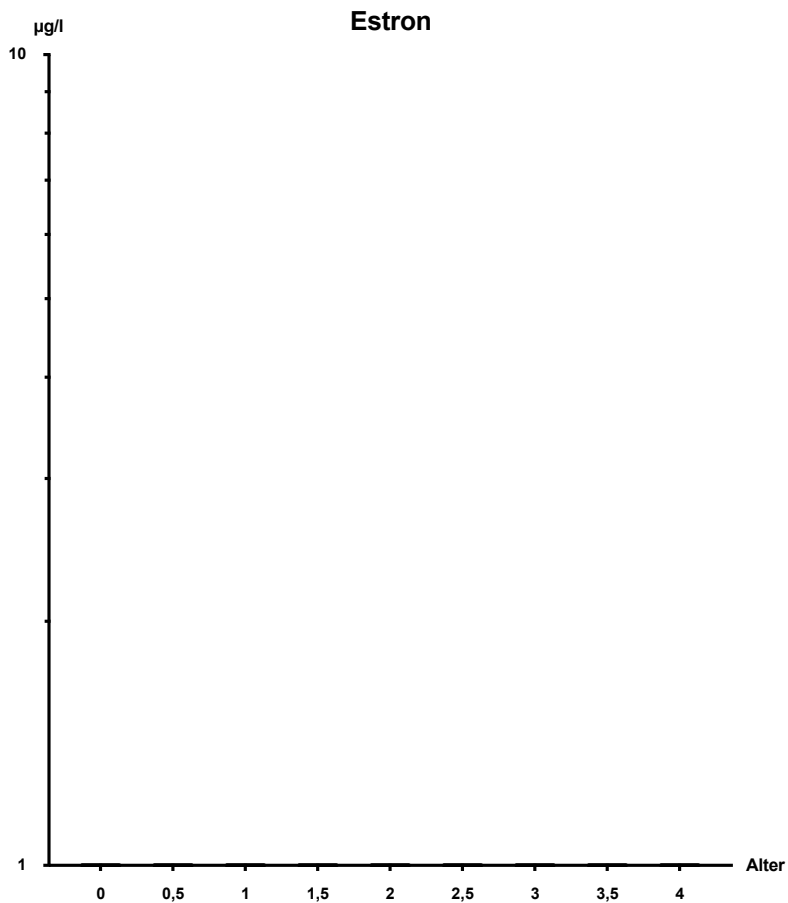
Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	24,09			
0,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	7,69			
1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
1,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	12,74			
2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
2,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	22,82			
3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	7,345			
3,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	6,495			
4	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	9,442			



**Abb. 5 - Box-Whisker-Plot zu 11-O-An (5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ -ol-11,17-dion) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

**Tab. 20 - 11-O-An (5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ -ol-11,17-dion) (in  $\mu\text{g/l}$ ).**

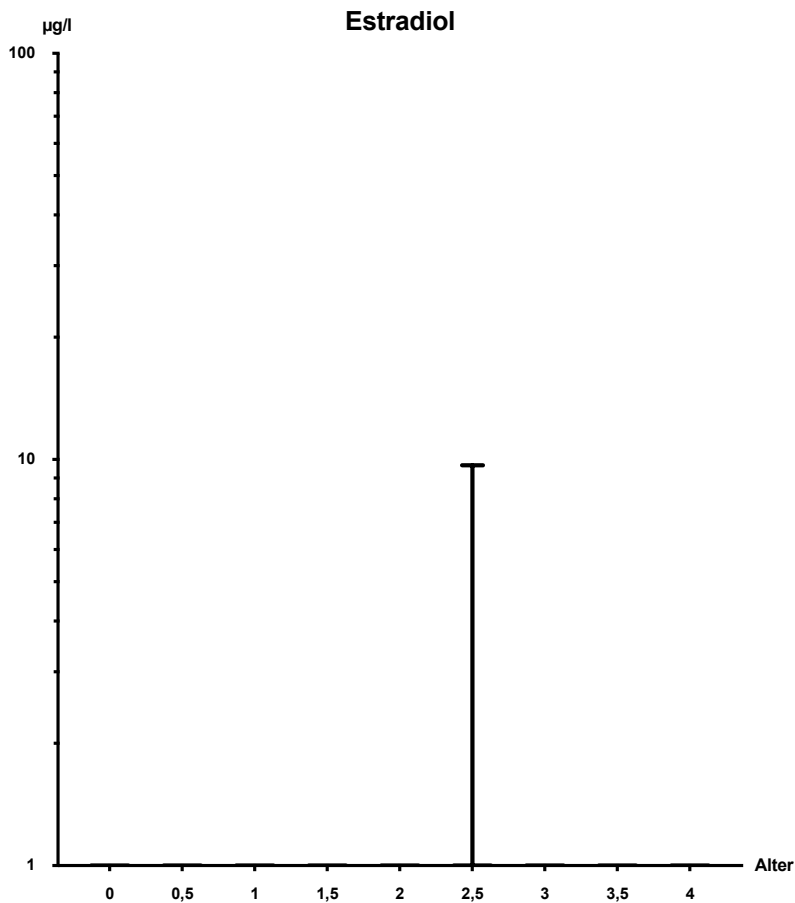
Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	15,17	23,79	46,1	115	1280	91,21	1,784*	0,5436*
0,5	< LOD	12,63	14,5	27,64	90,4	15,01	1,285	0,2941
1	< LOD	< LOD	16,05	23,76	316,2	23,76	1,289	0,15
1,5	0,435	13,25	17,18	27,61	157,5	14,36	1,294	0,17
2	< LOD	8,51	13,65	20,08	45,82	11,57	1,243	0,1801
2,5	< LOD	13,6	17,24	37,5	105,2	23,9	1,394	0,2762
3	< LOD	15,04	20,86	43,89	224,7	28,85	1,522*	0,354*
3,5	6,383	16,11	22,28	49,12	96,29	33,01	1,43	0,2847
4	7,459	16,3	26,57	57,43	109	41,13	1,554	0,3837



**Abb. 6 - Box-Whisker-Plot zu E1 (Estron) (in µg/l), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

**Tab. 21 - E1 (Estron) (in µg/l).**

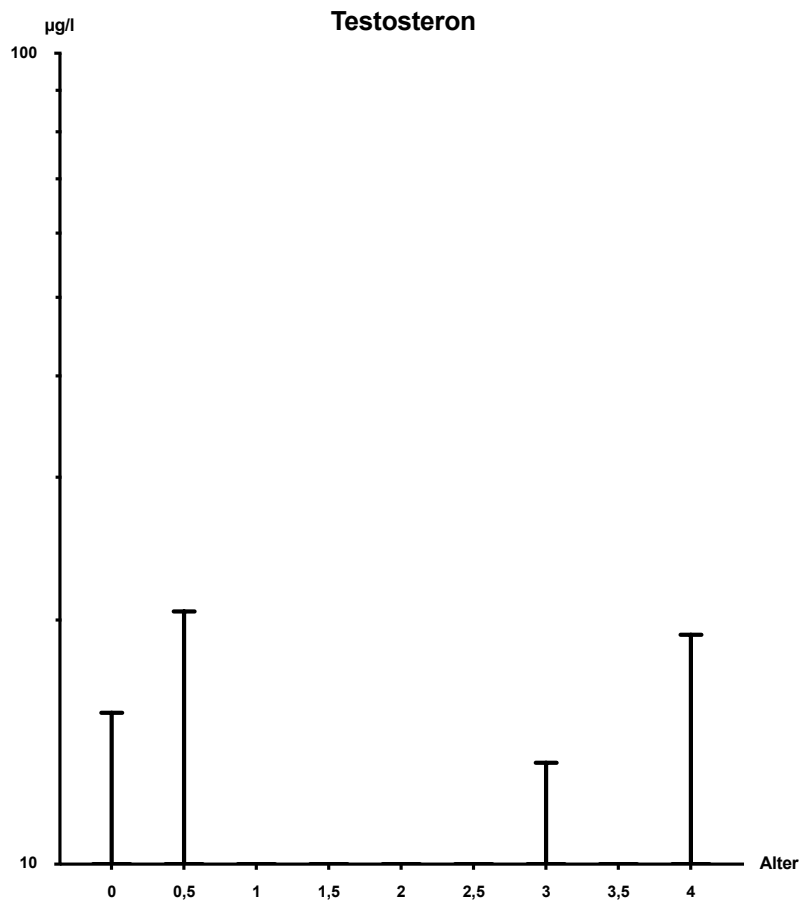
Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
0,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
1,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
2,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
3,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
4	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			



**Abb. 7 - Box-Whisker-Plot zu E2 (Estradiol) (in µg/l), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

**Tab. 22 - E3 (Estradiol) (in µg/l).**

Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
0,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
1,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
2,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	5,324			
3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
3,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
4	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			



**Abb. 8 - Box-Whisker-Plot zu T (Testosteron) (in µg/l), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

**Tab. 23 - T (Testosteron) (in µg/l).**

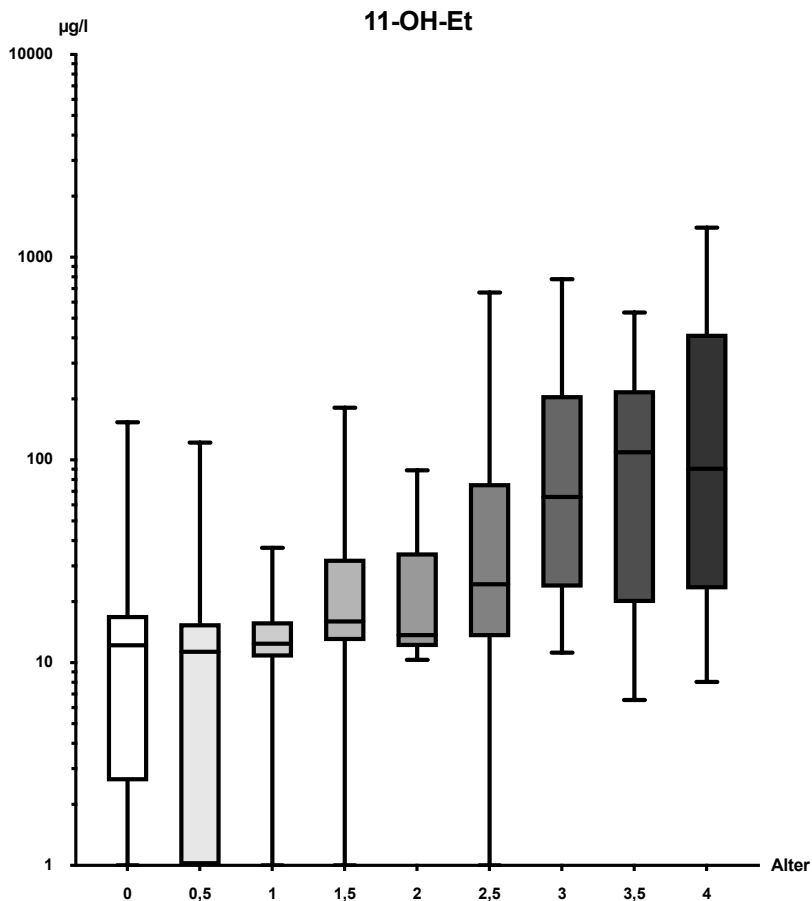
Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	15,28			
0,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	12,30			
1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
1,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
2,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	6,67			
3,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
4	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			

**Tab. 24 - Po-5b,3a (17 $\alpha$ -OH-Pregnanolon) (5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -diol-20-on) (in  $\mu$ g/l).**

<b>Alter (Jahre)</b>	<b>P5</b>	<b>P25</b>	<b>P50</b>	<b>P75</b>	<b>P95</b>	<b>IQR</b>	<b>MW (log)</b>	<b>SD (log)</b>
0	12,31	28,28	335	849	6305	820,72	2,335	0,8286
0,5	2,416	15,9	71,92	475,5	2293	459,6	1,955	0,8082
1	2,628	12,28	42,4	274,8	6348	262,52	1,824	0,879
1,5	10,13	28,21	150,1	297,7	6224	269,49	2,126	0,7816
2	9,688	16,99	47,07	340,1	3330	323,11	1,883	0,7376
2,5	9,071	33,59	102,5	607,6	2430	574,01	2,132	0,7281
3	9,38	29,54	97,88	1048	7909	1018,46	2,187	9,9159
3,5	11,22	42,17	107,6	624,6	6939	582,43	2,171	0,7384
4	8,678	45,06	167,3	1164	8871	1118,94	2,387	0,9299

**Tab. 25 - 11-OH-An (11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron) (5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -diol-17-on) (in  $\mu$ g/l).**

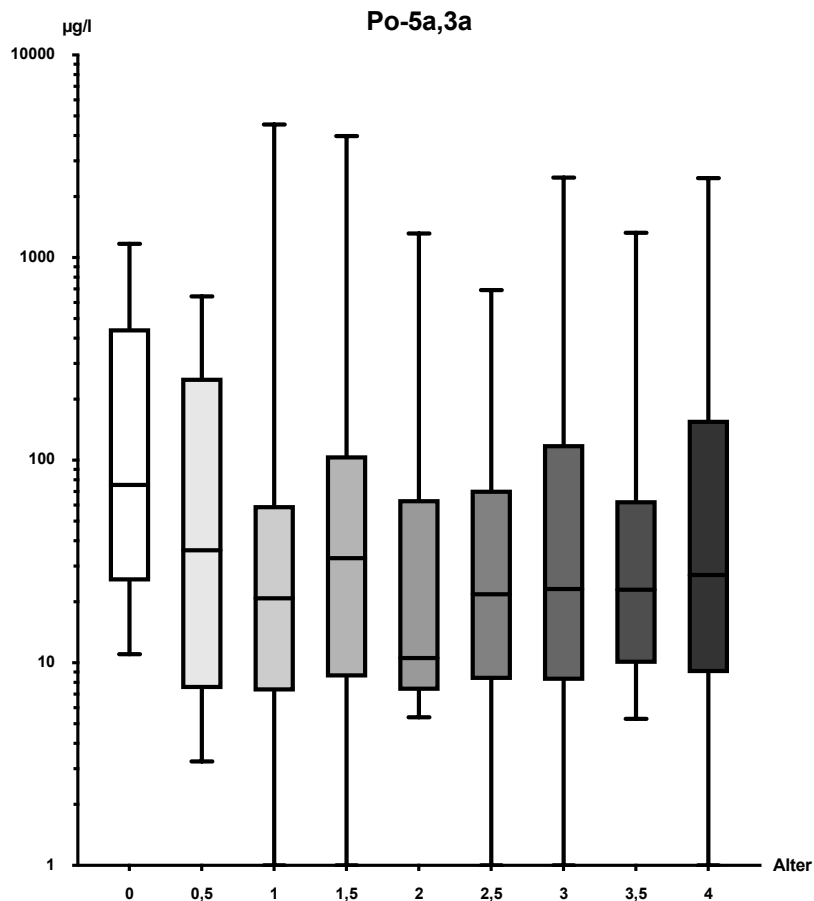
<b>Alter (Jahre)</b>	<b>P5</b>	<b>P25</b>	<b>P50</b>	<b>P75</b>	<b>P95</b>	<b>IQR</b>	<b>MW (log)</b>	<b>SD (log)</b>
0	6,143	21,89	92,51	178,6	2890	156,71	1,895	0,6767
0,5	6,056	11,27	96,16	282	614,7	270,73	1,767*	0,7021*
1	< LOD	7,38	38,37	235	3349	227,62	1,886	0,7814
1,5	6,664	32,32	169,4	296,3	1704	263,98	2,057	0,6514
2	5,726	14,3	136,7	218,4	1379	204,1	1,794	0,6994
2,5	6,83	19,46	177,8	250,3	765,9	230,84	1,993	0,6819
3	6,58	21,75	181,1	364,5	1912	342,75	2,047	0,739
3,5	10,1	37,69	170,5	363	1456	325,31	2,101	0,6041
4	8,766	59,44	254,2	474,8	2634	415,36	2,282	0,6857



**Abb. 9 - Box-Whisker-Plot zu 11-OH-Et (5 $\beta$ -Androstan-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -diol-17-on) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

**Tab. 26 - 11-OH-Et (5 $\beta$ -Androstan-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -diol-17-on) (in  $\mu\text{g/l}$ ).**

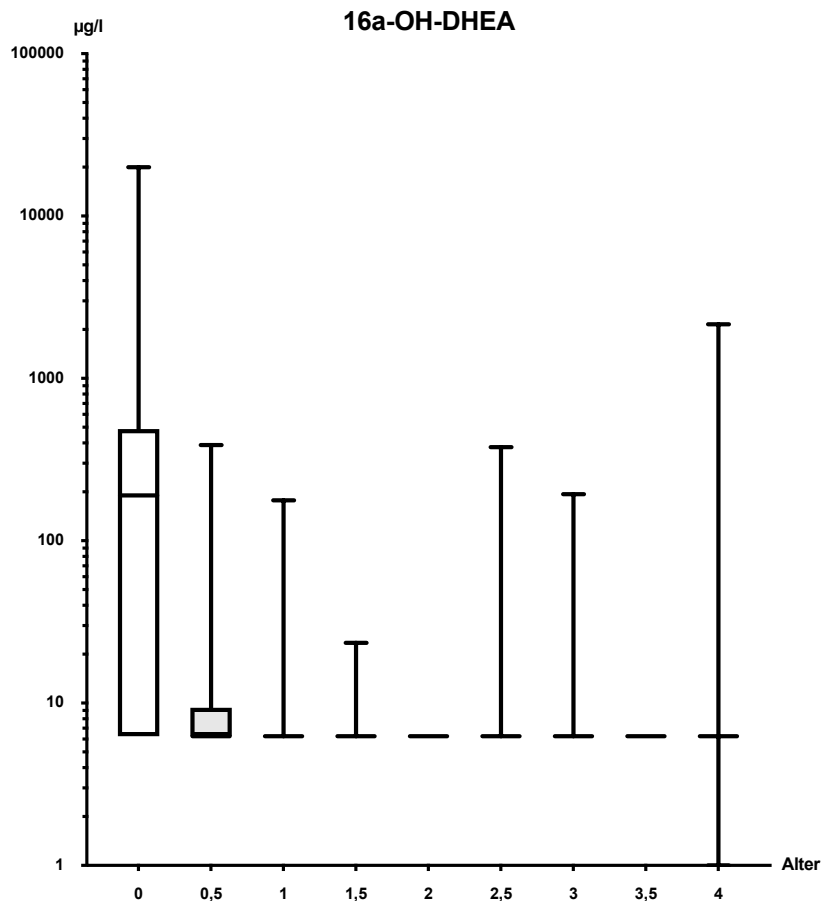
Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	< LOD	2,598	12,2	17,21	151,6	14,612	1,315*	0,3775*
0,5	< LOD	< LOD	11,33	15,67	81,24	15,67	1,11	0,1296
1	< LOD	10,59	12,42	16,02	34,76	5,43	1,16*	0,1527*
1,5	1,59	12,79	15,99	32,6	169,4	19,81	1,351*	0,3264*
2	10,37	11,95	13,67	35,02	86,95	23,07	1,302	0,3019
2,5	0	13,37	24,36	76,92	527,3	63,55	1,586	0,5085
3	11,55	23,48	65,73	209	730,9	185,52	1,883	0,5701
3,5	8,335	19,71	109,1	220,9	523,5	201,19	1,885*	0,5638*
4	12,22	22,99	90,6	419,2	1291	396,21	2,005*	0,6635*



**Abb. 10 - Box-Whisker-Plot zu Po-5a,3a (5 $\alpha$ -Pregnan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -diol-20-on) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

**Tab. 27 - Po-5a,3a (5 $\alpha$ -Pregnan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -diol-20-on) (in  $\mu\text{g/l}$ ).**

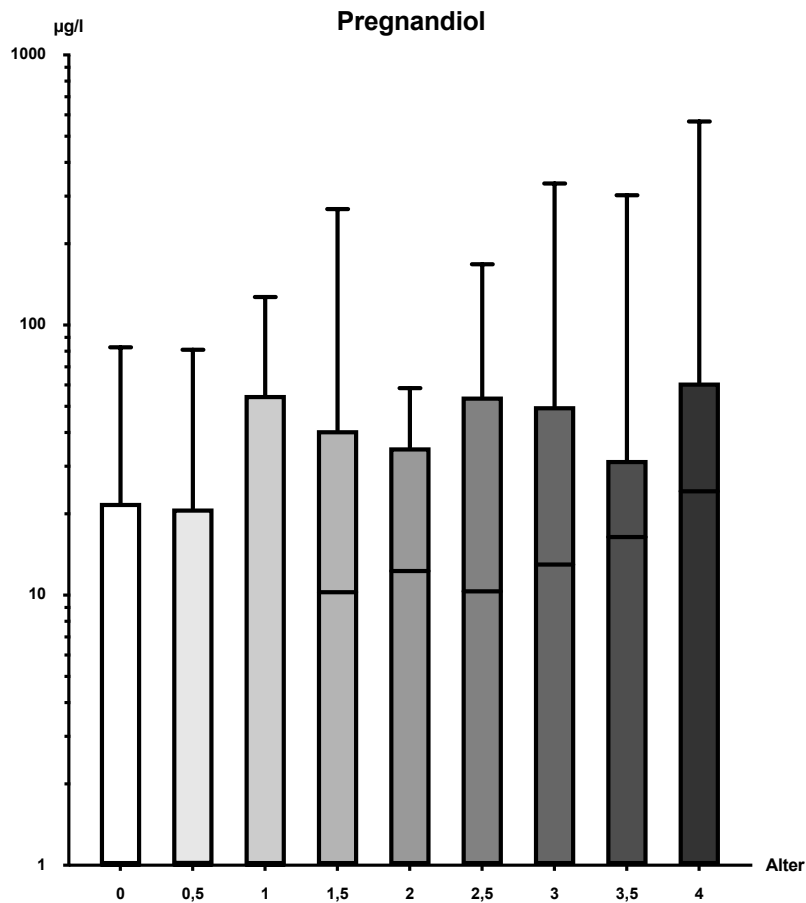
Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	11,03	25,2	75,56	447,7	1152	422,5	2,006*	0,7011*
0,5	3,816	7,42	35,94	255,3	610,7	247,88	1,618*	0,7672*
1	1,323	7,22	20,84	60,08	3536	52,86	1,397	0,5618
1,5	0,8325	8,46	32,83	105,7	3556	97,24	1,66	0,7365
2	5,48	7,28	10,56	64,29	1098	57,01	1,253	0,4814
2,5	2,511	8,238	21,79	71,54	530,1	63,302	1,485	0,5818
3	0	8,145	23,14	120,1	1595	111,955	1,583	0,729
3,5	5,545	9,895	22,96	63,52	638,1	53,625	1,458*	0,575*
4	3,454	8,89	27,13	158,4	1560	149,51	1,674	0,7483



**Abb. 11 - Box-Whisker-Plot zu 16a-OH-DHEA (5-Androsten-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -diol-17-on) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

**Tab. 28 – 16a-OH-DHEA (5-Androsten-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -diol-17-on) (in  $\mu\text{g/l}$ ).**

Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	< LOD	< LOD	190,2	487,2	19506	487,2		
0,5	< LOD	< LOD	< LOD	9,37	315,5	9,37		
1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	138,5			
1,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	20,91			
2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
2,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	220,2			
3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	184,8			
3,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
4	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			



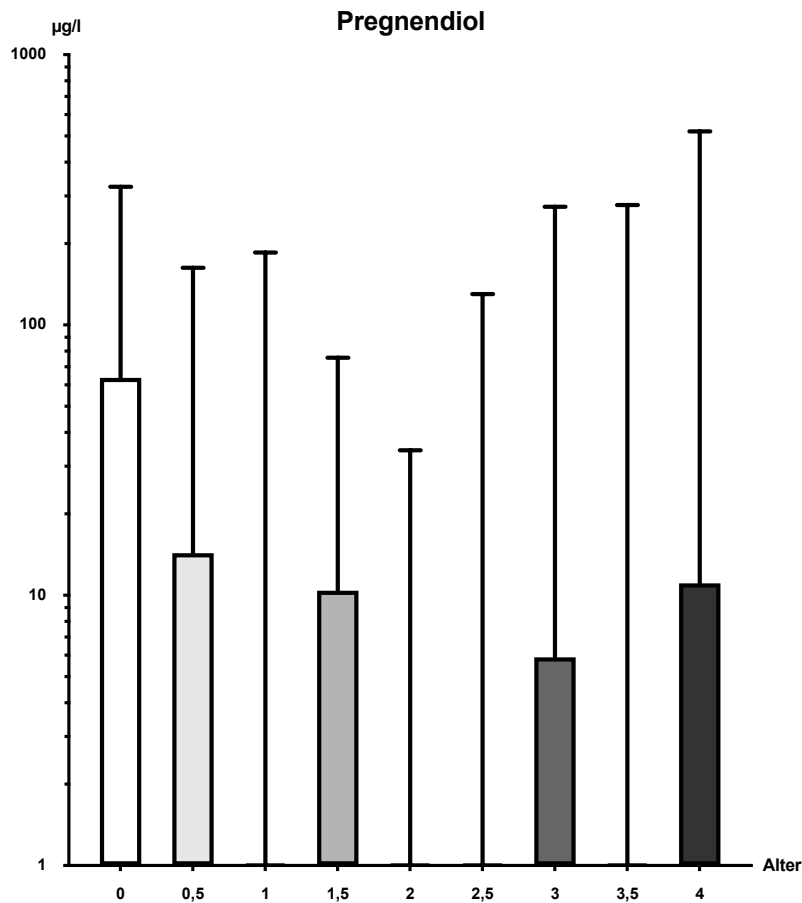
**Abb. 12 - Box-Whisker-Plot zu PD (Pregnanediol) (5b-Pregnan-3a,20a-diol) (in µg/l), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

**Tab. 29 - PD (Pregnanediol) (5b-Pregnan-3a,20a-diol) (in µg/l).**

Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	< LOD	< LOD	< LOD	21,98	80,79	21,98	2,020	1,111
0,5	< LOD	< LOD	< LOD	20,92	73,24	20,92	1,104*	0,6019*
1	< LOD	< LOD	< LOD	55,12	114,3	55,12	0,8833*	0,3120*
1,5	< LOD	< LOD	10,25	40,80	244,1	40,80	0,8259*	0,1215*
2	< LOD	< LOD	12,29	35,24	56,00	35,24	0,8000*	0,000*
2,5	< LOD	< LOD	10,34	54,42	140,5	54,42	0,9179*	0,3639*
3	< LOD	< LOD	12,98	50,07	292,4	50,07	0,9014*	0,3791*
3,5	< LOD	< LOD	16,43	31,69	175,1	31,69	0,8000*	0,000*
4	< LOD	< LOD	24,23	61,31	219,8	61,31	0,8588*	0,3858*

**Tab. 30 - PT (Pregnantriol) (5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -triol) (in  $\mu\text{g/l}$ ).**

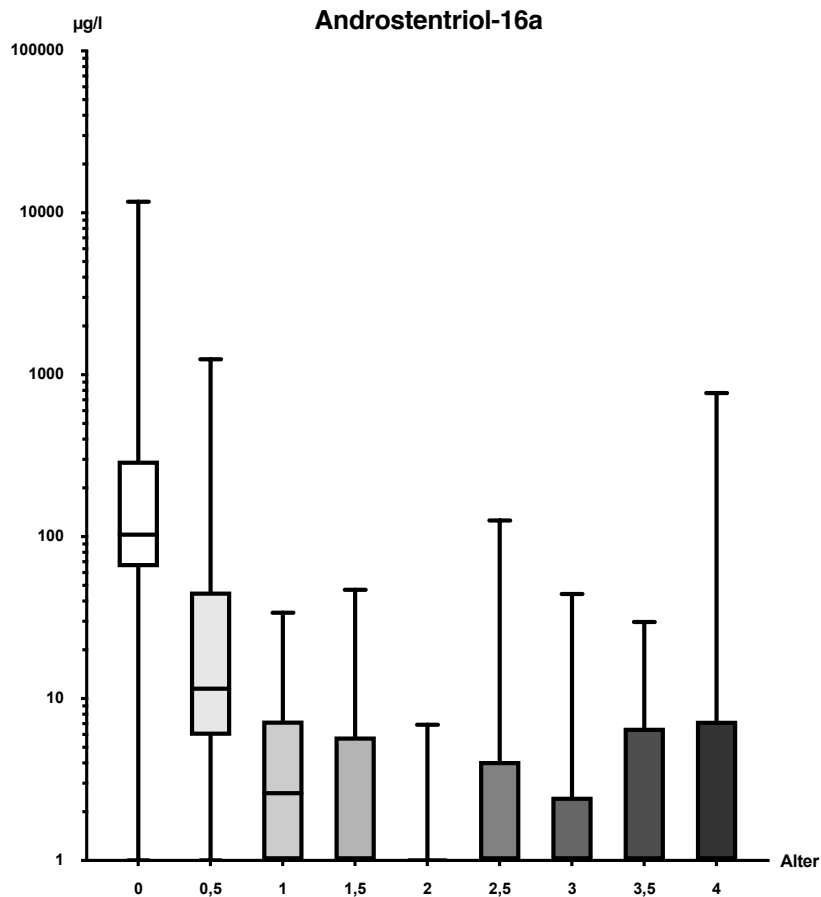
<b>Alter (Jahre)</b>	<b>P5</b>	<b>P25</b>	<b>P50</b>	<b>P75</b>	<b>P95</b>	<b>IQR</b>	<b>MW (log)</b>	<b>SD (log)</b>
0	26,3	72,67	327,7	951,6	2298	878,93	2,416	0,6346
0,5	5,83	31,83	252,4	935,8	1895	903,97	2,181	0,8143
1	4,525	44,95	214	560,4	10287	515,45	2,265	0,8978
1,5	6,681	171,1	363,1	946,6	11644	775,5	2,549	0,7756
2	4,902	126,2	179,1	706,8	3359	580,6	2,321	0,6902
2,5	13,25	141,1	290	930,5	7527	789,4	2,52	0,744
3	1,86	95,35	403,1	1821	16525	1725,65	2,454	1,101
3,5	16,62	184,8	325	1217	8566	1032,2	2,625	0,6496
4	8,242	167,8	851,9	1981	11872	1813,2	2,766	0,856



**Abb. 13 - Box-Whisker-Plot zu P5D (Pregnendiol) (5-Pregnen-3 $\beta$ ,20 $\alpha$ -diol) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

**Tab. 31 - P5D (Pregnendiol) (5-Pregnen-3 $\beta$ ,20 $\alpha$ -diol) (in  $\mu\text{g/l}$ ).**

Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	< LOD	< LOD	< LOD	63,72	316,3	63,72		
0,5	< LOD	< LOD	< LOD	14,31	150,5	14,31		
1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	153,9			
1,5	< LOD	< LOD	< LOD	10,39	72,75	10,39		
2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	31,06			
2,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	122,8			
3	< LOD	< LOD	< LOD	5,890	172,1	5,890		
3,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	99,3			
4	< LOD	< LOD	< LOD	11,07	183,8	11,07		



**Abb. 14 - Box-Whisker-Plot zu A5T-16a (Androstentriol-16 $\alpha$ ) (5-Androsten-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

**Tab. 32 - A5T-16a (Androstentriol-16 $\alpha$ ) (5-Androsten-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol) (in  $\mu\text{g/l}$ ).**

Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	2,555	64,77	103	294,6	11324	229,83	2,087	0,2987
0,5	1,324	5,89	11,5	45,86	839	39,97	1,314*	0,6249*
1	< LOD	< LOD	2,605	7,323	29,47	7,323	0,851	0,07992
1,5	< LOD	< LOD	< LOD	5,838	45,47	5,838	1,097*	0,4112*
2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	6,83	0	0,79	0,06782
2,5	< LOD	< LOD	< LOD	4,118	78,45	4,118	0,79	0,06782
3	< LOD	< LOD	< LOD	2,48	39,13	2,48	1,141	0,3484
3,5	< LOD	< LOD	< LOD	6,603	27,22	6,603	0,985*	0,2467*
4	< LOD	< LOD	< LOD	7,29	20,56	7,29	0,9843	0,2078

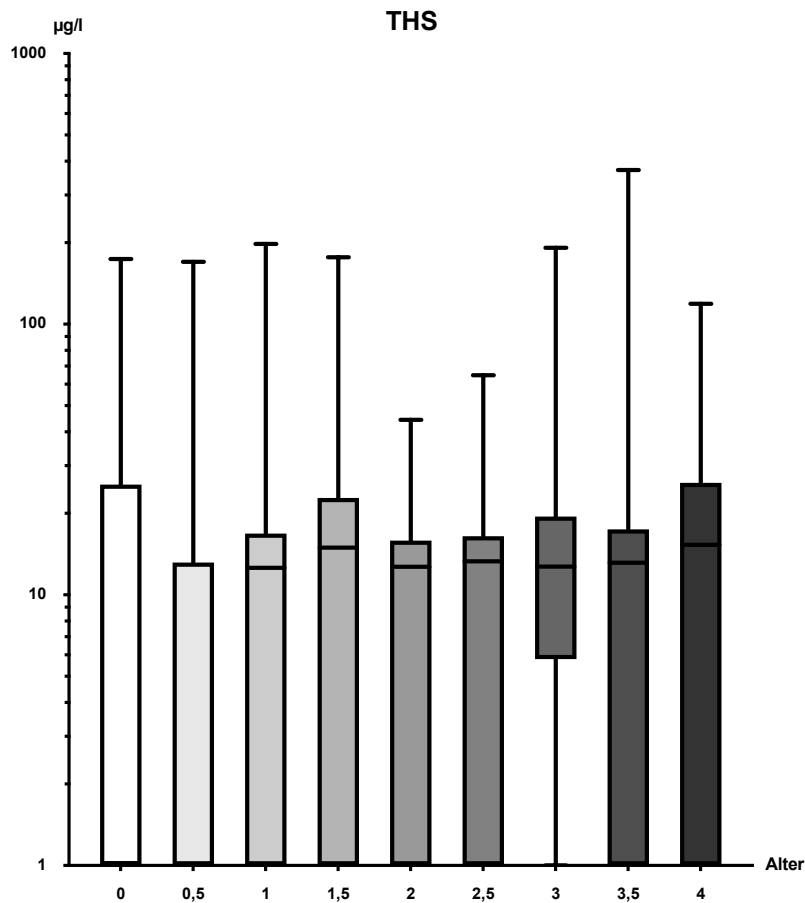


Abb. 15 - Box-Whisker-Plot zu THS (5β-Pregnan-3α,17α,21-triol-20-on) (in µg/l), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).

Tab. 33 - THS (5β-Pregnan-3α,17α,21-triol-20-on) (in µg/l).

Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	< LOD	< LOD	< LOD	25,5	168,6	25,5	1,517	0,3825
0,5	< LOD	< LOD	< LOD	13,15	116,9	13,15	1,179	0,1807
1	< LOD	< LOD	<	16,83	155,6	16,83	1,19	0,1052
1,5	< LOD	< LOD	14,95	22,79	161,4	22,79	1,314*	0,225*
2	< LOD	< LOD	12,7	15,87	41,19	15,87	1,164*	0,1101*
2,5	< LOD	< LOD	13,3	16,47	61,61	16,47	1,315	0,2549
3	< LOD	< LOD	12,71	19,45	136,5	19,45	1,257*	0,2314*
3,5	< LOD	< LOD	13,14	17,44	117	17,44	1,211	0,146
4	< LOD	< LOD	15,3	25,91	94,21	25,91	1,383	0,3076

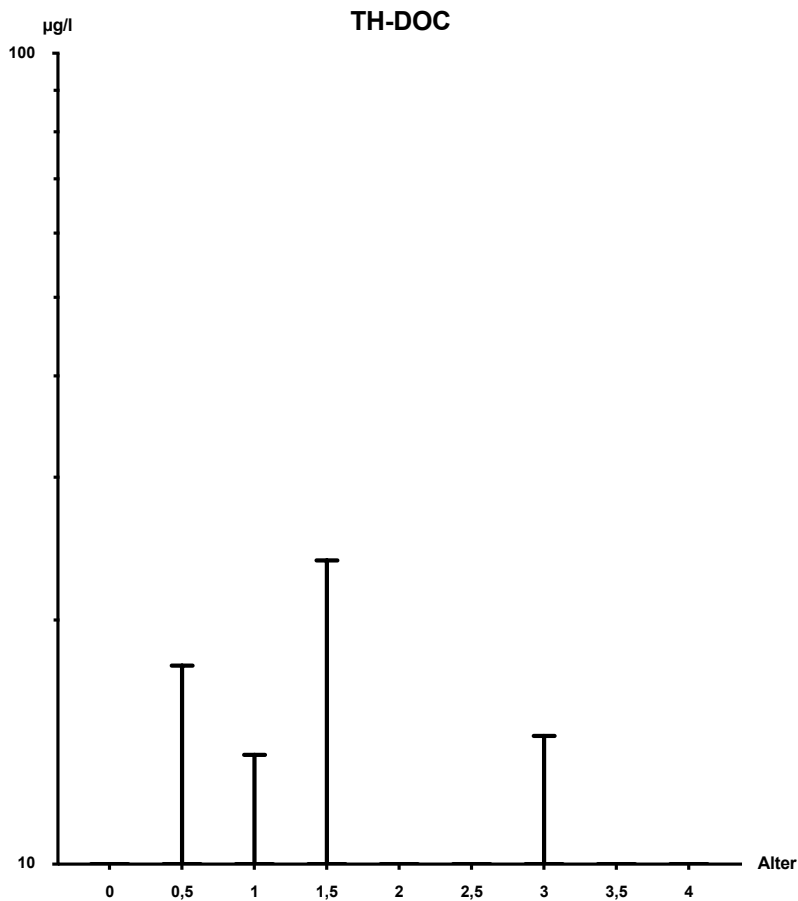
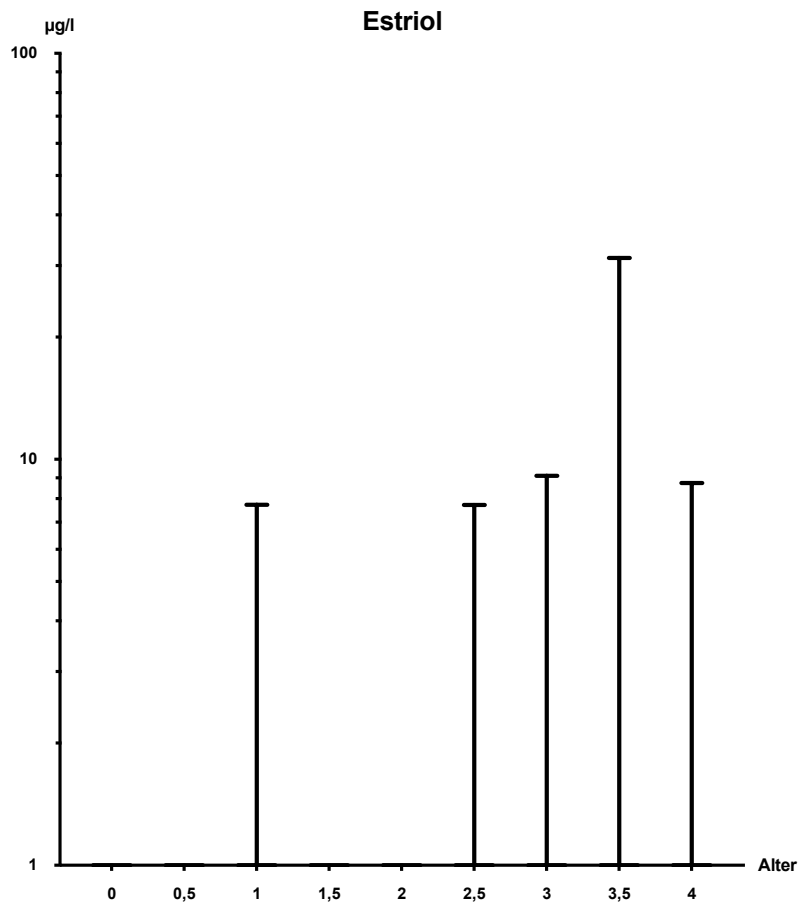


Abb. 16 - Box-Whisker-Plot zu TH-DOC (5β-Pregnan-3α,21-diol-20-on) (in µg/l), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).

Tab. 34 - TH-DOC (5β-Pregnan-3α,21-diol-20-on) (in µg/l).

Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
0,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	10,54			
1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	13,34			
1,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	22,30			
2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
2,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	7,195			
3,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
4	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			



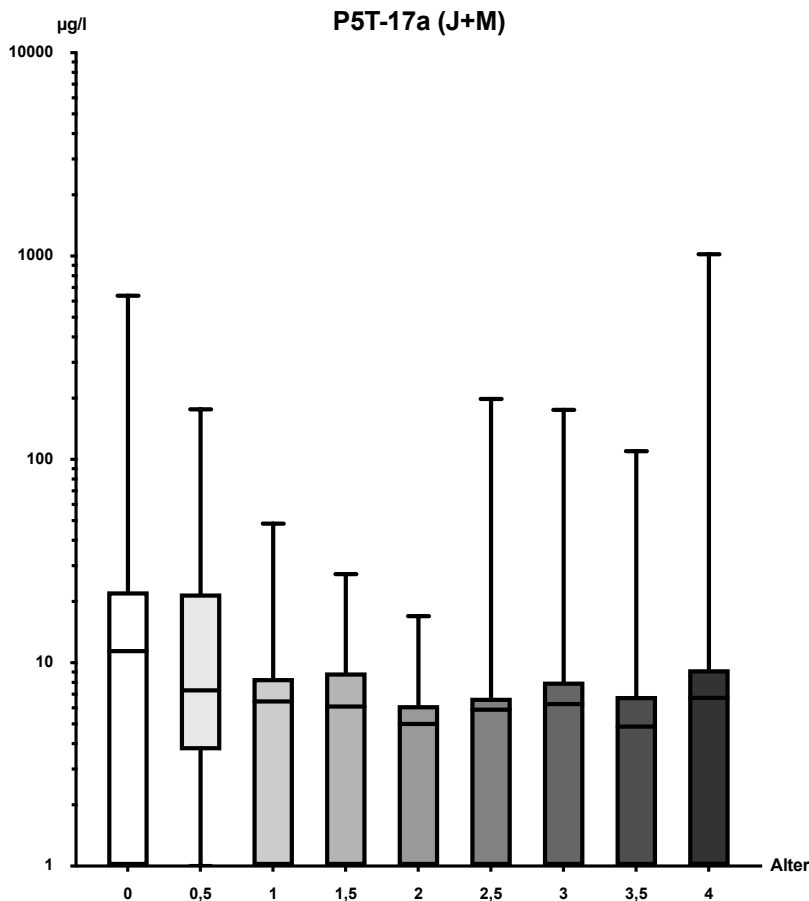
**Abb. 17- Box-Whisker-Plot zu E3 (Estriol) (in µg/l), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

**Tab. 35 - E3 (Estriol) (in µg/l).**

Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
0,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	5,798			
1,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
2,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	4,246			
3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	4,555			
3,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	16,84			
4	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			

**Tab. 36 - 11-O-PT (5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -triol-11-on) (in  $\mu\text{g/l}$ ).**

<b>Alter (Jahre)</b>	<b>P5</b>	<b>P25</b>	<b>P50</b>	<b>P75</b>	<b>P95</b>	<b>IQR</b>	<b>MW (log)</b>	<b>SD (log)</b>
0	9,501	154,3	589,5	1924	6759	1769,7	2,657	0,8252
0,5	1,25	5,09	24,74	960,7	2042	955,61	1,738*	1,15*
1	2,508	5,065	61,3	489,7	5328	484,635	1,812	1,073
1,5	3,153	31,53	90,21	535	7211	503,47	2,037	0,9622
2	3,376	10,8	60,17	310	987,8	299,2	1,803*	0,8063*
2,5	5,17	26,96	82,48	355,1	2936	328,14	2,002	0,8154
3	2,855	23,4	196,3	869,1	8965	845,7	2,146	0,9754
3,5	5,295	39,08	83,12	461,9	2759	422,82	2,045	0,8028
4	5,346	56,54	203,4	1152	6074	1095,46	2,333	0,9054



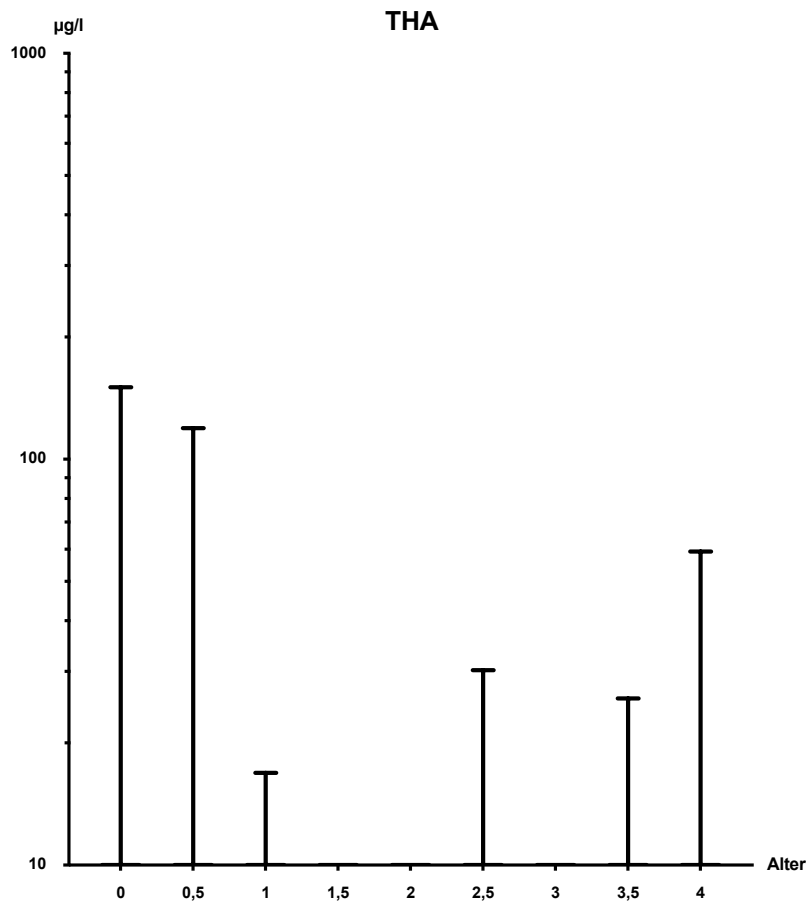
**Abb. 18 - Box-Whisker-Plot zu P5T-17a (Pregnen-17 $\alpha$ ) (5-Pregnen-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -triol) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

**Tab. 37 - P5T-17a (Pregnen-17 $\alpha$ ) (5-Pregnen-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -triol) (in  $\mu\text{g/l}$ ).**

Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	< LOD	< LOD	11,41	22,47	636,8	22,47	1,405*	0,6545*
0,5	< LOD	3,71	7,32	21,94	150,6	18,23	1,168	0,4669
1	< LOD	< LOD	6,45	8,41	39,97	8,41	0,8927*	0,1075*
1,5	< LOD	< LOD	6,095	8,96	27,14	8,96	0,964	0,2884
2	< LOD	< LOD	5	6,19	15,74	6,19	0,788	0,03994
2,5	< LOD	< LOD	5,875	6,728	125,8	6,728	0,8082	0,03401
3	< LOD	< LOD	6,26	8,085	97,49	8,085	0,8844	0,1622
3,5	< LOD	< LOD	4,86	6,873	45,21	6,873	0,8644	0,1963
4	< LOD	< LOD	6,7	9,27	53,9	9,27	0,9074	0,149

**Tab. 38 - THE (TH-Cortison) (5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,21-triol-11,20-dion) (in  $\mu\text{g/l}$ ).**

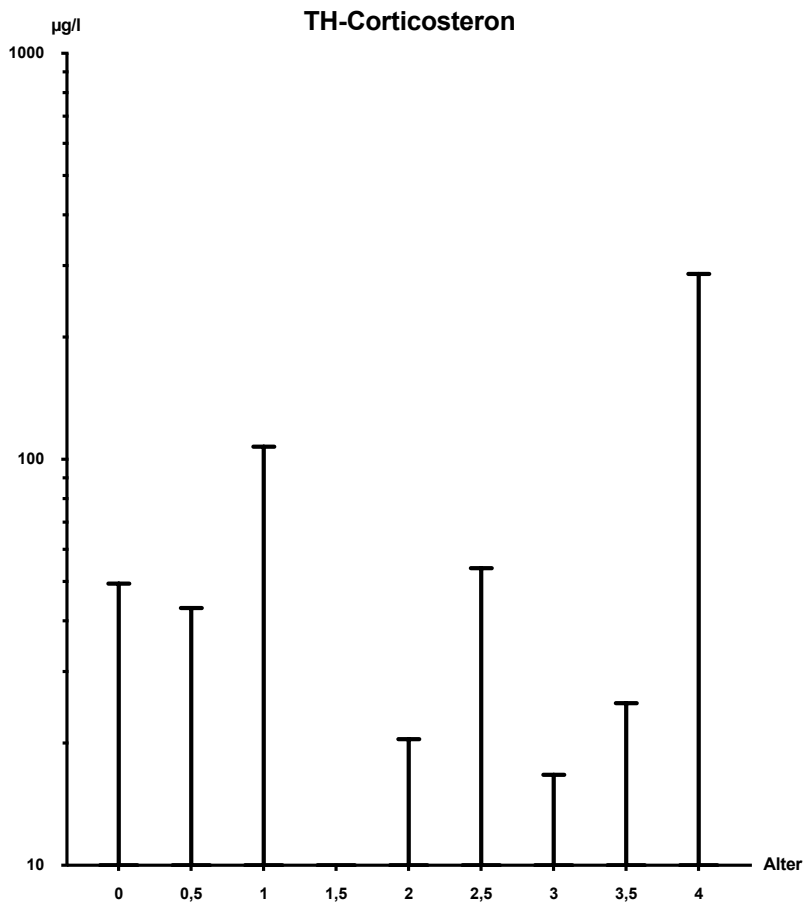
<b>Alter (Jahre)</b>	<b>P5</b>	<b>P25</b>	<b>P50</b>	<b>P75</b>	<b>P95</b>	<b>IQR</b>	<b>MW (log)</b>	<b>SD (log)</b>
0	17,23	451,8	1204	2209	6503	1757,2	3,061	0,3711
0,5	202,8	705	932,8	2254	457548	1549	3,125	0,3532
1	258,9	638,5	892,5	2069	3718	1430,5	3,007	0,3386
1,5	505,6	885,5	1398	2744	7715	1858,5	3,208	0,3185
2	323	862	1084	2593	7249	1731	3,14	0,3444
2,5	536,4	1123	2160	3643	6611	2520	3,291	0,3286
3	448,5	1415	2129	3926	6304	2511	3,332	0,3192
3,5	566,4	1730	2049	3347	11194	1617	3,379	0,3163
4	1000	1774	2606	4740	12812	2966	3,44	0,3019



**Abb. 19 - Box-Whisker-Plot zu THA (5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ ,21-diol-11,20-dion) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

**Tab. 39 - THA (5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ ,21-diol-11,20-dion) (in  $\mu\text{g/l}$ ).**

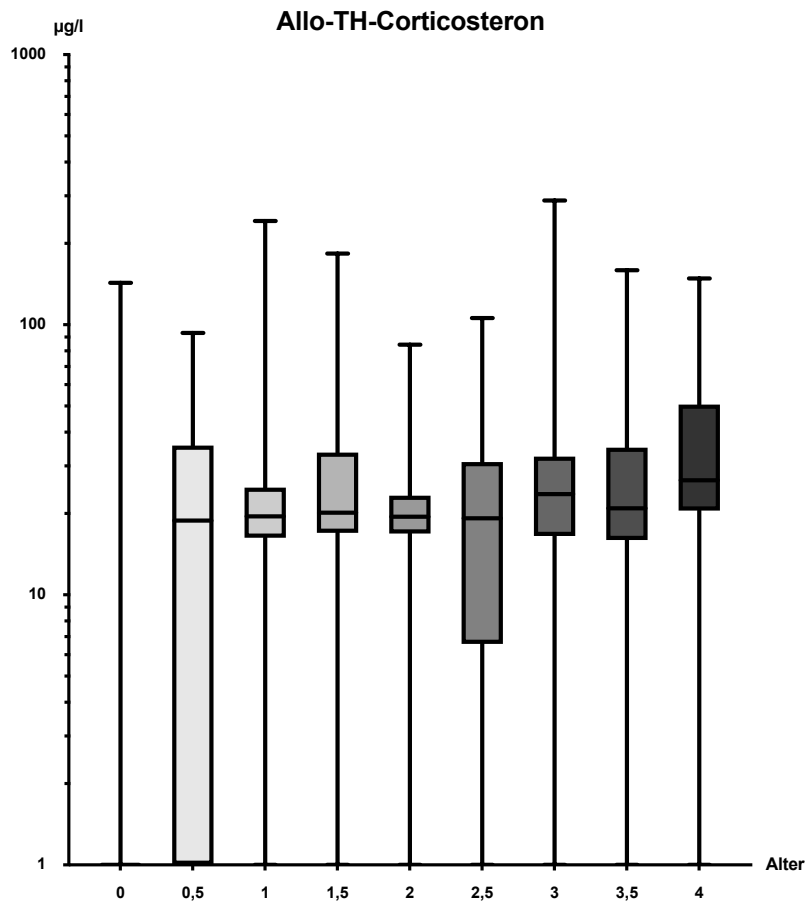
Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	146,0			
0,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	82,08			
1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	12,66			
1,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
2,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	16,62			
3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
3,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	21,90			
4	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	27,68			



**Abb. 20 - Box-Whisker-Plot zu THB (TH-Corticosteron) ( $5\beta$ -Pregnan- $3\alpha,21$ -diol- $11,20$ -dion) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

**Tab. 40 - THB (TH-Corticosteron) ( $5\beta$ -Pregnan- $3\alpha,11\beta,21$ -triol- $20$ -on) (in  $\mu\text{g/l}$ ).**

Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	46,94			
0,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	39,61			
1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	85,13			
1,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD			
2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	16,36			
2,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	29,67			
3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	8,355			
3,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	6,268			
4	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	148,4			



**Abb. 21 - Box-Whisker-Plot zu a-THB (Allo-TH-Corticosteron) ( $5\alpha$ -Pregnan- $3\alpha,11\beta,21$ -triol-20-on) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

**Tab. 41 - a-THB (Allo-TH-Corticosteron) ( $5\alpha$ -Pregnan- $3\alpha,11\beta,21$ -triol-20-on) (in  $\mu\text{g/l}$ ).**

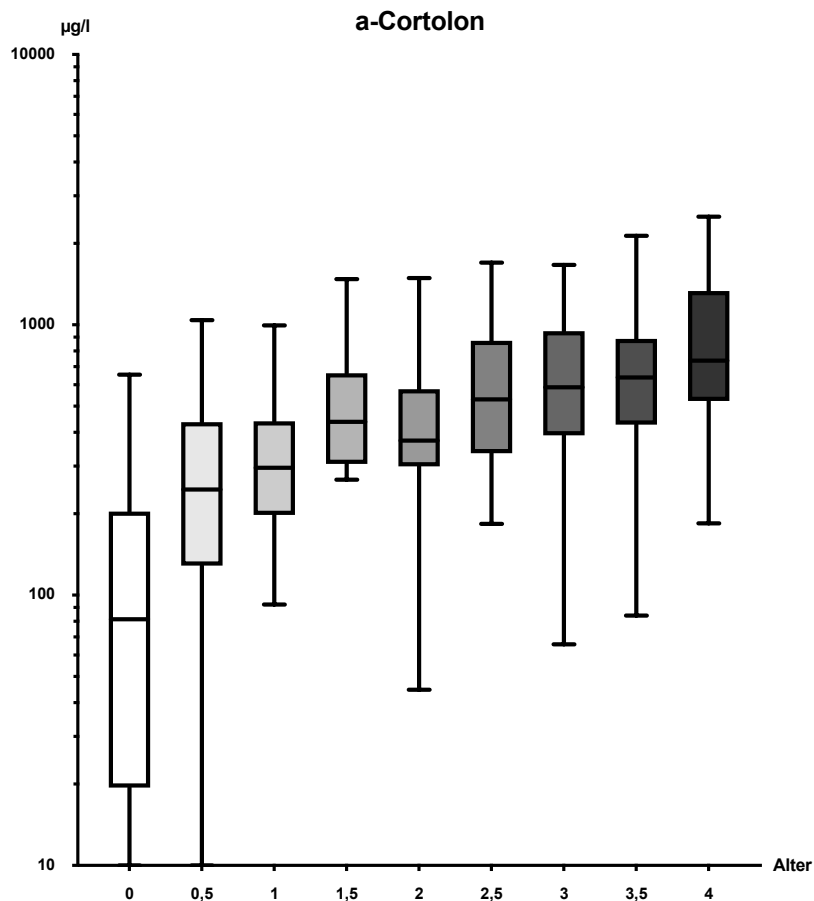
Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	137,4	0	1,835*	0,4596*
0,5	< LOD	< LOD	18,84	35,67	78,86	35,67	1,447	0,2244
1	< LOD	16,28	19,53	24,95	195,3	8,67	1,332	0,1052
1,5	< LOD	16,98	20,15	33,6	182,5	16,62	1,474*	0,3129*
2	< LOD	16,86	19,46	23,27	75,67	6,41	1,322*	0,116*
2,5	< LOD	6,578	19,21	31	84,04	24,422	1,436	0,2195
3	< LOD	16,51	23,58	32,5	197,1	15,99	1,443	0,2279
3,5	< LOD	15,97	20,9	35,06	91,31	19,09	1,375	0,1993
4	< LOD	20,51	26,56	50,63	112,7	30,12	1,536	0,2664

**Tab. 42 - THF (TH-Cortisol) (5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-tetrol-20-on) (in  $\mu$ g/l).**

<b>Alter (Jahre)</b>	<b>P5</b>	<b>P25</b>	<b>P50</b>	<b>P75</b>	<b>P95</b>	<b>IQR</b>	<b>MW (log)</b>	<b>SD (log)</b>
0	< LOD	19,31	57,5	171	708,8	151,69	1,954	0,5038
0,5	86,02	265	414,1	1100	4224	835	2,694	0,4516
1	81,51	262,8	418,2	792,8	3033	530	2,655	0,3747
1,5	258,9	419,8	683,7	915,2	2062	495,4	2,837	0,2479
2	78,93	373	563,3	1323	2629	950	2,765	0,4082
2,5	364,1	453,6	636,7	1499	2895	1045,4	2,92	0,2916
3	214,4	522,3	775,5	1723	2940	1200,7	2,936	0,3429
3,5	238,5	575	812,7	1205	5736	630	2,978	0,3589
4	228,9	668,7	1143	1465	4774	796,3	3,006	0,3762

**Tab. 43 - a-THF (Allo-TH-Cortisol) (5 $\alpha$ -Pregnan-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-tetrol-20-on) (in  $\mu$ g/l).**

<b>Alter (Jahre)</b>	<b>P5</b>	<b>P25</b>	<b>P50</b>	<b>P75</b>	<b>P95</b>	<b>IQR</b>	<b>MW (log)</b>	<b>SD (log)</b>
0	< LOD	30,86	104,5	261,2	1800	230,34	2,147	0,55532
0,5	124,6	605,2	1208	1981	6439	1375,8	3,098	0,3777
1	256,3	393,3	901,5	2072	6659	1678,7	2,995	0,4262
1,5	387,6	780	1016	1790	4266	1010	3,064	0,2926
2	131,9	472,3	910,7	1997	3844	1524,7	2,953	0,384
2,5	309,9	596,7	980,7	1999	4582	1402,3	3,035	0,335
3	89,58	535,7	1013	1754	4995	1218,3	2,957	0,4583
3,5	215	745,4	1169	1845	8084	1099,6	3,105	0,4106
4	445,8	751,7	1463	1896	4991	1144,3	3,136	0,318



**Abb. 22 - Box-Whisker-Plot zu a-CI ( $\alpha$ -Cortolon) ( $5\beta$ -Pregnan- $3\alpha,17\alpha,20\alpha,21$ -tetrol-11-on) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

**Tab. 44 - a-CI ( $\alpha$ -Cortolon) ( $5\beta$ -Pregnan- $3\alpha,17\alpha,20\alpha,21$ -tetrol-11-on) (in  $\mu\text{g/l}$ ).**

Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	< LOD	19,43	81,53	203,9	647,4	184,47	2,038	0,4882
0,5	25,17	128,6	245,9	436,7	975,7	308,1	2,437	0,3437
1	98,49	198,2	296	439,8	983,8	241,6	2,49	0,2717
1,5	267,7	306,2	437,9	662,7	1426	356,5	2,676	0,2128
2	54,17	299,7	373,4	578,1	1358	278,4	2,564*	0,3147*
2,5	202,3	335,4	530,1	873,5	1540	538,1	2,735	0,2629
3	171,4	390,5	587,5	948,2	1594	557,7	2,794	0,2258
3,5	192,9	427,8	638,6	887,6	1731	459,8	2,808	0,2205
4	280,2	523,4	737,6	1335	2037	811,6	2,895	0,2555

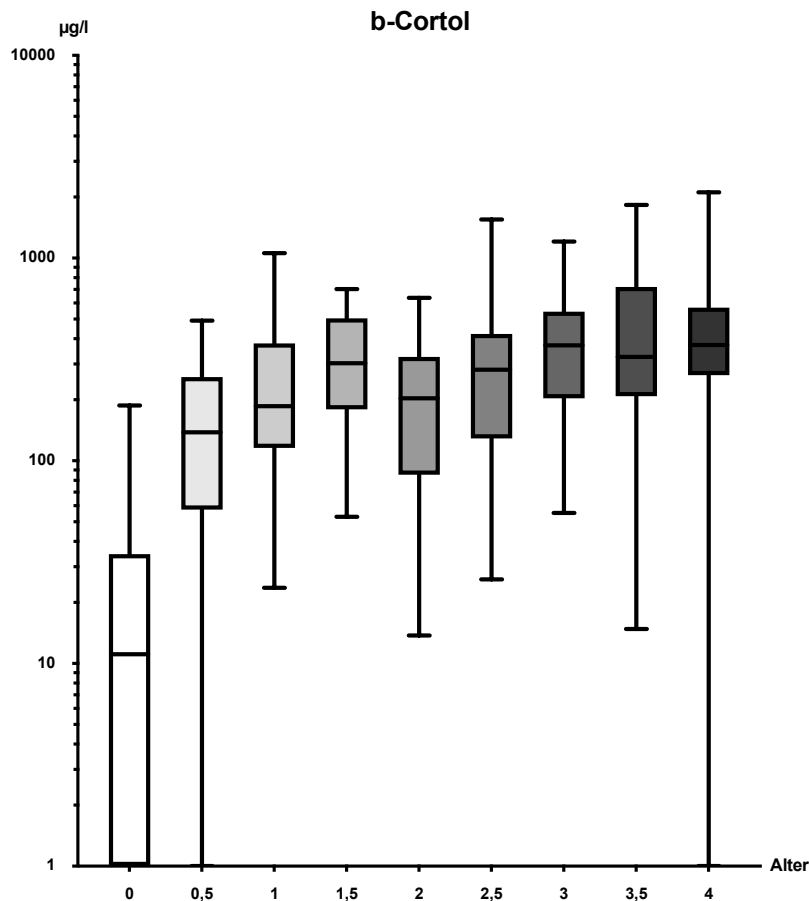
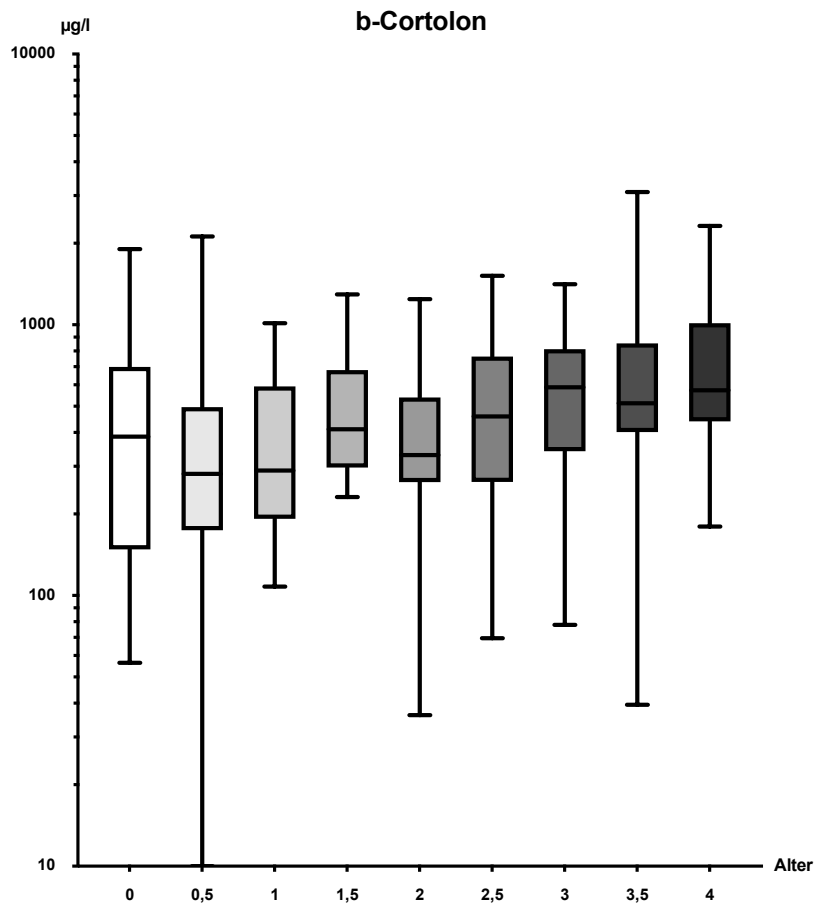


Abb. 23 - Box-Whisker-Plot zu b-C ( $\beta$ -Cortol) ( $5\beta$ -Pregnan- $3\alpha,11\beta,17\alpha,20\beta,21$ -pentol) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).

Tab. 45 – b-C ( $\beta$ -Cortol) ( $5\beta$ -Pregnan- $3\alpha,11\beta,17\alpha,20\beta,21$ -pentol) (in  $\mu\text{g/l}$ ).

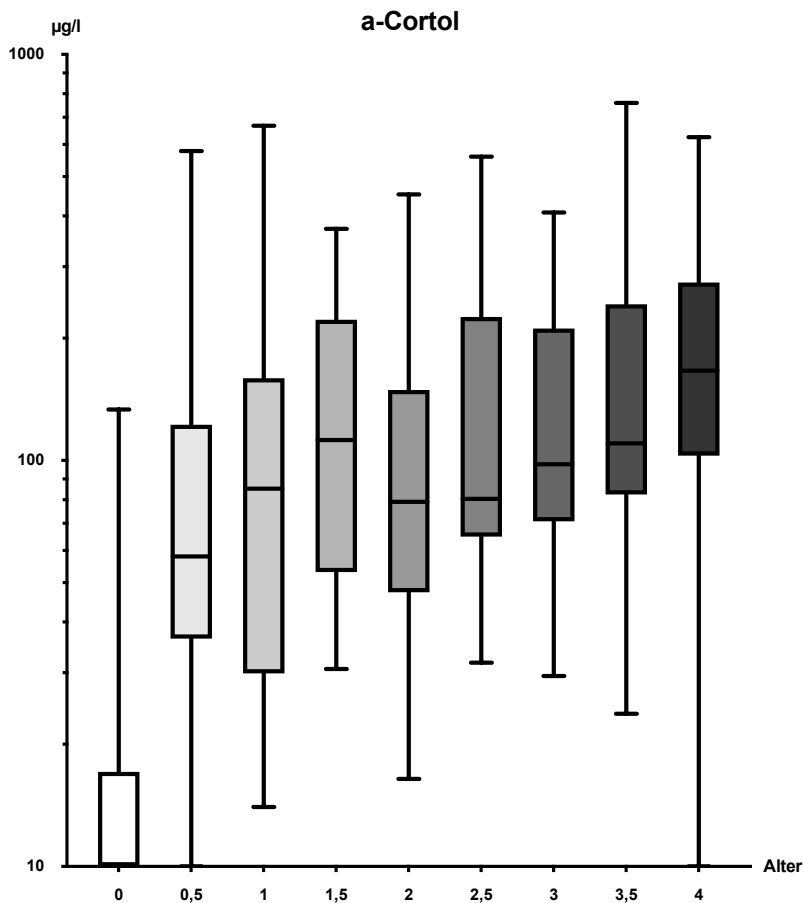
Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	< LOD	< LOD	11,1	34,59	186,2	34,59	1,556	0,406
0,5	< LOD	57,41	138	258,8	479,3	201,39	2,159	0,3623
1	26,42	115,8	185,9	378,6	976,1	262,8	2,258	0,415
1,5	53,67	179,1	302,8	503,9	690,6	324,8	2,449	0,3038
2	19,36	85,27	203,4	325,2	583,9	239,93	2,219	0,3966
2,5	35,51	128,8	281,3	422,2	1242	293,4	2,36	0,4441
3	65,81	203	371,1	543,2	1192	340,2	2,488	0,3596
3,5	54,33	208	325	718,9	1647	510,9	2,58	0,3451
4	66,51	264,1	372,1	568,7	1040	304,6	2,58	0,2863



**Abb. 24 - Box-Whisker-Plot zu b-CI ( $\beta$ -Cortolon) ( $5\beta$ -Pregnan- $3\alpha,17\alpha,20\beta,21$ -tetrol-11-on) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

**Tab. 46 - b-CI ( $\beta$ -Cortolon) ( $5\beta$ -Pregnan- $3\alpha,17\alpha,20\beta,21$ -tetrol-11-on) (in  $\mu\text{g/l}$ ).**

Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	57,61	148	386,2	699,4	1870	551,4	2,523	0,4251
0,5	24,12	174,2	281,3	496,6	1753	322,4	2,502	0,2614
1	122,2	192,2	289,7	592,3	934,6	400,1	2,648	0,2073
1,5	233,6	297,1	411,4	680,4	1240	383,3	2,498	0,3182
2	42,65	262,6	330,1	539,1	1132	276,5	2,498*	0,3308*
2,5	91,18	262,7	458,5	763,1	1505	500,4	2,649	0,3182
3	154,8	341,3	588,1	812,9	1355	471,6	2,72*	0,2732*
3,5	197,1	401,6	513,4	853,5	1852	451,9	2,777	0,2465
4	347,6	439,9	573,2	1014	1873	574,1	2,823	0,2323



**Abb. 25 - Box-Whisker-Plot zu a-C ( $\alpha$ -Cortol) ( $5\beta$ -Pregnan- $3\alpha,11\beta,17\alpha,20\alpha,21$ -pentol) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).**

**Tab. 47 - a-C ( $\alpha$ -Cortol) ( $5\beta$ -Pregnan- $3\alpha,11\beta,17\alpha,20\alpha,21$ -pentol) (in  $\mu\text{g/l}$ ).**

Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	< LOD	< LOD	< LOD	17,1	129,5	17,1	1,497	0,3632
0,5	< LOD	36,4	57,99	122,5	498,2	86,1	1,944	0,4018
1	15,77	29,9	85,19	159,4	648,2	129,5	1,905	0,4716
1,5	31,47	53,06	112,2	222	358,1	168,94	2,021	0,3253
2	18,31	47,32	79,04	149,1	411,7	101,78	1,912	0,3458
2,5	34,69	64,91	80,43	225,6	527,6	160,69	2,05	0,361
3	31,8	70,76	97,84	211,2	400,9	140,44	2,066	0,3246
3,5	28,99	82,44	110,1	242,4	631,8	159,96	2,109	0,3547
4	25,17	102,7	166,4	274,1	555,8	171,4	2,233	0,3236

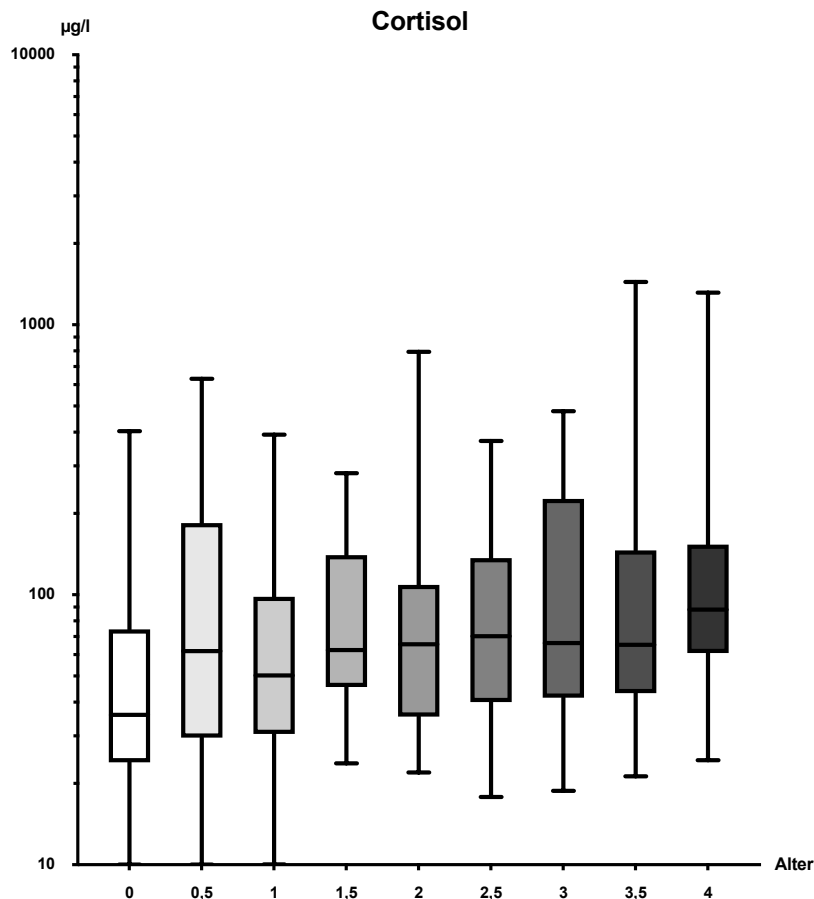


Abbildung 26 - Box-Whisker-Plot zu F (Cortisol) (4-Pregnen-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-triol-3,20-dion) (in  $\mu\text{g/l}$ ), unterschieden nach Alter (in Jahren) unabhängig vom Geschlecht (n = 60).

Tab. 48 - F (Cortisol) (4-Pregnen-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-triol-3,20-dion) (in  $\mu\text{g/l}$ ).

Alter (Jahre)	P5	P25	P50	P75	P95	IQR	MW (log)	SD (log)
0	< LOD	23,94	35,91	74,4	398,1	50,46	1,751	0,4165
0,5	8,948	29,54	61,79	184,3	573,6	154,76	1,903	0,4461
1	5,423	30,44	50,17	98,11	347,8	67,67	1,777	0,3316
1,5	26,06	45,51	62,33	140,1	273,1	94,59	1,879	0,298
2	22,48	35,36	65,54	108,7	783,2	73,34	1,85*	0,432*
2,5	18,92	40,03	70,16	136,5	358,4	96,47	1,903	0,3816
3	23,41	41,52	66,23	226,3	453,4	184,78	1,939	0,3957
3,5	25,67	43,21	65,23	145,9	1294	102,69	1,952*	0,4915*
4	26,84	60,79	88,12	153,3	547,5	92,51	1,964	0,3186

# PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

## Veröffentlichungen

**Metabotypes of congenital adrenal hyperplasia in infants determined by gas chromatography-mass spectrometry in spot urine.**

Kamrath, C.<sup>1</sup>, Friedrich, C.<sup>1</sup>, Hartmann, M.F., Wudy, S.A. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 2023 Vol. 231 Pages 106304 (1 both authors contributed equally to this work)

## EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Berlin, 27.11.2025

Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

## **DANKSAGUNG**

Abschließend möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Durchführung und Realisierung dieser Dissertation unterstützt haben.

Meinen besonderen Dank möchte ich zuallererst meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Stefan A. Wudy für die Vergabe des Themas, seine stets kompetente Unterstützung, den klaren strukturellen Rahmen und die konstruktive Kritik aussprechen.

Mein Dank gebührt auch meinem unterstützenden Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Clemens Kamrath, der mir mit seiner hilfsbereiten und kompetenten Art mit Rat und Tat zur Seite stand und mit Geduld die Richtung vorzugeben wusste.

Auch möchte ich mich bei Frau Dr. biol. hum. Michaela F. Hartmann für die Aufbereitung der Daten und ihre Hilfestellung bei der Datenerhebung bedanken.

Mein Dank gilt ebenso den Mitarbeitenden des Steroid- und Peptidhormonlabors des Schwerpunktes pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie des Zentrums für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, ohne die diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Von Herzen möchte ich mich auch bei meiner Familie bedanken, allen voran Sophie für ihre immerzu bedingungslose und hingebungsvolle Unterstützung.