universität wien

# DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Quantifizierung von Progesteron im Speichel von ProbandInnen:
Korrelationsanalyse mit verschiedenen endogenen Faktoren
(z.B. Oxidativer Stress und andere Steroidhormone)“

verfasst von / submitted by

Patricia Graf

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2016 / Vienna, 2016

| | |
|---|---|
| Studienkennzahl lt. Studienblatt / degree programme code as it appears on the student record sheet: | A 449 |
| Studienrichtung lt. Studienblatt / degree programme as it appears on the student record sheet: | Diplomstudium Pharmazie |
| Betreut von / Supervisor: | ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Martin Czejka |

# Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Martin Czejka für das Ermöglichen dieser Diplomarbeit und die entgegengebrachte Zeit bei Fragen oder anderen Anliegen.

Weiters gilt mein Dank Mag. pharm. Marie Kitzmüller, die mir beim praktischen Teil der Arbeit stets behilflich war und immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern, Sophia und Lucas bedanken, die mir immer mehr zugetraut haben als ich mir selber. Für die finanzielle Unterstützung meiner Eltern und Großeltern sowie eure Motivation durch anstrengende Prüfungszeiten werde ich euch ewig dankbar sein.

Ein „Dankeschön“ geht auch an meine liebe Kollegin Selina Hriza, die mir nicht nur im Rahmen der Diplomarbeit zur Seite gestanden hat, sondern auch im restlichen Studium oftmals meine Ansprechperson war.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen Freunden und Studienkollegen bedanken. Egal, ob während Lernphasen vor einer Prüfung oder bei den Feierlichkeiten danach: ihr wart immer für mich da.

# Inhaltsverzeichnis

Danksagung……III

Inhaltsverzeichnis……V

Abkürzungsverzeichnis……VII

Abbildungsverzeichnis……..IX

Tabellenverzeichnis……..…...XII

1 Einleitung ..... 1

2 Progesteron ..... 2

2.1 Biosynthese von Progesteron ..... 2

2.2 Regulation der Progesteron-Biosynthese ..... 3

2.3 Metabolismus und Pharmakokinetik von Progesteron ..... 8

2.4 Wirkungen von Progesteron ..... 10

2.5 Bedeutung von Progesteron in der Pharmazie ..... 12

3 Fragestellung ..... 15

4 Praktischer Teil ..... 17

4.1 Testprinzip ..... 17

4.2 Durchführung des Progesteron-ELISA-Tests ..... 18

4.2.1 Gewinnung der Speichelproben ..... 18

4.2.2 Testvorbereitung und verwendete Reagenzien ..... 19

4.2.3 Ausführung der Arbeitsschritte und Messung ..... 21

4.2.4 Auswertung der Testergebnisse ..... 22

4.2.5 Statistische Methoden und verwendete Programme ..... 23

5 Ergebnisse ..... 28

5.1 Vergleich der einzelnen Kollektive ..... 29

5.2 Einfluss durch Einnahme von Hormonpräparaten ..... 36

5.3 Einfluss des Alters auf den Progesteronspiegel ..... 41

5.4 Einfluss von Sport und Gewicht auf den Progesterongehalt ..... 45
5.5 Einfluss der Ernährung auf den Progesteronspiegel ..... 55
5.6 Einfluss von Stress auf den Progesterongehalt im Speichel ..... 58
5.6.1 Korrelations- und Regressionsanalyse von Progesteron und Cortisol .. 64
5.7 Einfluss des Speichelprogesterons auf den Schlaf ..... 68
5.8 Einfluss des Zeitpunkts von der Probennahme ..... 72
5.9 Korrelations- und Regressionsanalyse von Progesteron und Testosteron .. 78
5.10 Korrelations- und Regressionsanalyse von Progesteron und freien Radikalen ..... 84
6 Diskussion ..... 95
6.1 Besprechung der Auswertung ..... 95
6.2 Beurteilung der Testmethode ..... 99
7 Conclusio ..... 102
8 Literaturverzeichnis .....XV
Anhang……..XIX
Zusammenfassung……XIX
Abstract……..…XX
Fragebogen……..XXI

# Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| 3β-HSD | 3β-Hydroxy-$\Delta^5$-Steroid-Dehydrogenase |
| ANOVA | analysis of variance |
| BMI | Body-Mass-Index |
| CAL | Standard |
| CONTROL | Kontrolle |
| CYP11A1 | Cholesterin-Monooxygenase (P450scc) |
| DNA | desoxyribonucleic acid |
| EEG | Elektroenzephalografie |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| ENZCONJ | Enzymkonjugat |
| FORM | Free Oxygen Radicals Monitors |
| FORT | Free Oxygen Radicals Test |
| FSH | Follikelstimulierendes Hormon, Follitropin |
| GABA | gamma-Aminobutyric acid |
| GnRH | Gonadotropin-Releasing-Hormon |
| hCG | humanes Choriongonadotropin |
| HRP | Meerrettichperoxidase |
| kDA | Kilodalton |
| LDL | low density lipoprotein |
| LH | Luteinisierendes Hormon, Lutropin |
| MAP | mitogen-activated protein |
| mRNA | messenger ribonucleic acid |
| MTP | Mikrotiterplatte |
| $NAD^+$ | ox. Form von Nicotinamidadenindinukleotid |
| NADH | red. Form von Nicotinamidadenindinukleotid |
| OC | oral contraceptives |
| $OH^-$ | Hydroxidion |
| Östr/Gest | Östrogene/Gestagene |
| P-Wert | Irrtumswahrscheinlichkeit |
| pH | pondus/potentia Hydrogenii |
| PMS | prämenstruelles Syndrom |
| PR-A/ PR-B | Progesteronrezeptor-A/B |

| | |
|---|---|
| R-Wert | Korrelationskoeffizient |
| REM | Rapid Eye Movement |
| RIA | Radioimmunoassay |
| scc | side chain cleavage |
| SDH | Schilddrüsenhormon |
| StAR | steroidogenic acute regulatory protein |
| TMB | 3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidin |
| TMB STOP | TMB Stopplösung |
| TMB SUBS | TMB Substratlösung |
| WASHBUF CONC | Waschpuffer Konzentrat |

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von Progesteron ..... 2
Abbildung 2: Biosynthese von Progesteron ..... 3
Abbildung 3: Regulation der Sekretion von Progesteron ..... 4
Abbildung 4: Hormonsekretion während des Menstruationszyklus ..... 5
Abbildung 5: Korrelation der pulsatilen Freisetzung von LH und Progesteron ..... 6
Abbildung 6: Wirkmechanismus von Progesteron ..... 7
Abbildung 7: Entstehung von Progesteron-Metaboliten ..... 9
Abbildung 8: Pregnandiol ..... 10
Abbildung 9: Einflussfaktoren der Progesteronfreisetzung ..... 13
Abbildung 10: Leitsubstanz Progesteron mit gekennzeichneten Positionen zur Bildung von Derivaten ..... 14
Abbildung 11: Prinzip des kompetitiven Enzymimmunoassay ..... 17
Abbildung 12: Substratreaktion: TMB-Oxidation durch die Meerrettichperoxidase ... 18
Abbildung 13: Zusammensetzung des Gesamtkollektivs ..... 28
Abbildung 14: Vergleich Frauen und Männer ..... 29
Abbildung 15: Vergleich Frauen in der Luteal- und Follikelphase ..... 31
Abbildung 16: Vergleich Frauen in der Follikelphase oder OC-Einnahme ..... 32
Abbildung 17: Vergleich Frauen mit und ohne hormoneller Verhütung ..... 33
Abbildung 18: Vergleich Gesamtkollekiv ..... 34
Abbildung 19: Vergleich Frauen mit oder ohne Einnahme von Hormonen ..... 36
Abbildung 20: Vergleich verschiedener Hormonpräparate ..... 37
Abbildung 21: Vergleich Frauen mit und ohne Einnahme von Schilddrüsenhormonen ..... 39
Abbildung 22: Dauer der hormonellen Verhütung ..... 40
Abbildung 23: Einfluss des Alters bei Frauen mit Hormoneinnahme zur Kontrazeption ..... 41
Abbildung 24: Einfluss des Alters bei Frauen in der Lutealphase ..... 42
Abbildung 25: Einfluss des Alters bei Frauen in der Follikelphase ..... 43
Abbildung 26: Einfluss des Alters bei Männern ..... 44
Abbildung 27: Sport bei Frauen in der Lutealphase ..... 46
Abbildung 28: Sport bei Frauen in der Follikelphase ..... 47
Abbildung 29: Sport bei Frauen mit hormoneller Verhütung ..... 48

Abbildung 30: Sport bei Männern ..... 49
Abbildung 31: BMI bei Frauen in der Lutealphase ..... 51
Abbildung 32: BMI bei Frauen in der Follikelphase ..... 52
Abbildung 33: BMI bei Frauen mit hormoneller Verhütung ..... 53
Abbildung 34: BMI bei Männern ..... 54
Abbildung 35: Ernährung von Frauen in der Follikelphase ..... 55
Abbildung 36: Ernährung von Frauen in der Lutealphase ..... 56
Abbildung 37: Ernährung bei Männern ..... 57
Abbildung 38: Stress beim Gesamkollektiv ..... 59
Abbildung 39: Stress bei Frauen in der Follikelphase ..... 60
Abbildung 40: Stress bei Frauen in der Lutealphase ..... 61
Abbildung 41: Stress bei Frauen mit hormoneller Verhütung ..... 62
Abbildung 42: Stress bei Männern ..... 63
Abbildung 43: Regressionsanalyse Progesteron/Cortisol vom Gesamtkollektiv ..... 64
Abbildung 44: Regressionsanalyse Progesteron/Cortisol von Frauen mit hormoneller Verhütung ..... 66
Abbildung 45: Regressionsanalyse Progesteron/Cortisol von Männern ..... 67
Abbildung 46: Schlaf bei Frauen ohne hormoneller Verhütung ..... 69
Abbildung 47: Schlaf bei Frauen in der Lutealphase ..... 70
Abbildung 48: Schlaf bei Frauen mit hormoneller Verhütung ..... 71
Abbildung 49: Einfluss Zeitpunkt der Probennahme bei Frauen in der Follikelphase 73
Abbildung 50: Einfluss Zeitpunkt der Probennahme bei Frauen in der Lutealphase 74
Abbildung 51: Einfluss Zeitpunkt der Probennahme bei Frauen mit hormoneller Verhütung ..... 75
Abbildung 52: Einfluss Zeitpunkt der Probennahme bei Männern ..... 77
Abbildung 53: Regressionsanalyse Progesteron/Testosteron vom Gesamtkollektiv 79
Abbildung 54: Regressionsanalyse Progesteron/Testosteron bei Frauen ohne hormoneller Verhütung ..... 81
Abbildung 55: Regressionsanalyse Progesteron/Testosteron bei Frauen mit hormoneller Verhütung ..... 82
Abbildung 56: Regressionsanalyse Progesteron/Testosteron bei Männern ..... 83
Abbildung 57: Regressionsanalyse Progesteron/FORT vom Gesamtkollektiv ..... 85
Abbildung 58: Regressionsanalyse Progesteron/FORT bei Frauen ohne Hormoneinnahme ..... 87

Abbildung 59: Regressionsanalyse Progesteron/FORT bei Frauen in der Follikelphase ..... 89
Abbildung 60: Regressionsanalyse Progesteron/FORT bei Frauen in der Lutealphase ..... 90
Abbildung 61: Regressionsanalyse Progesteron/FORT bei Frauen mit hormoneller Verhütung ..... 92
Abbildung 62: Regressionsanalyse Progesteron/FORT bei Männern ..... 93

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Effekte bei Überschuss und Mangel von Progesteron ..... 12
Tabelle 2: Komponenten des Testkits ..... 20
Tabelle 3: Referenzwerte von Progesteron aus dem Speichel..... 22
Tabelle 4:Interpretation des Korrelationskoeffzienten r) ..... 26
Tabelle 5: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 14 ..... 29
Tabelle 6: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 15 ..... 31
Tabelle 7: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 16 ..... 32
Tabelle 8: Resultat ANOVA zu Abbildung 15 ..... 33
Tabelle 9: Resultat ANOVA zu Abbildung 18 ..... 34
Tabelle 10: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 19 ..... 37
Tabelle 11: Resultat ANOVA zu Abbildung 20 ..... 38
Tabelle 12: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 21 ..... 39
Tabelle 13: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 22 ..... 40
Tabelle 14: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 23 ..... 42
Tabelle 15: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 24 ..... 42
Tabelle 16: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 25 ..... 43
Tabelle 17: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 26 ..... 44
Tabelle 18: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 27 ..... 46
Tabelle 19: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 28 ..... 47
Tabelle 20: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 29 ..... 48
Tabelle 21: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 30 ..... 49
Tabelle 22: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 33 ..... 53
Tabelle 23: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 34 ..... 54
Tabelle 24: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 35 ..... 55
Tabelle 25: Resultat ANOVA zu Abbildung 36 ..... 56
Tabelle 26: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 37 ..... 57
Tabelle 27: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 38 ..... 59
Tabelle 28: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 39 ..... 60
Tabelle 29: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 40 ..... 61
Tabelle 30: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 41 ..... 62
Tabelle 31: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 42 ..... 63
Tabelle 32: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 43 ..... 65

Tabelle 33: Resultat Korrelationsanalyse Progesteron/Cortisol vom Gesamtkollektiv 65
Tabelle 34: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 44 ……66
Tabelle 35: Resultat Korrelationsanalyse Progesteron/Cortisol von Frauen mit hormoneller Verhütung ……67
Tabelle 36: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 45 ……68
Tabelle 37: Korrelationsanalyse Progesteron/Cortisol von Männern ……68
Tabelle 38: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 46 ……69
Tabelle 39: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 47 ……70
Tabelle 40: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 48 ……72
Tabelle 41: Resultat ANOVA zu Abbildung 49 ……..73
Tabelle 42: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 50 ……74
Tabelle 43: Resultat ANOVA zu Abbildung 51 ……..76
Tabelle 44: Resultat ANOVA zu Abbildung 52 ……..77
Tabelle 45: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 53 ……79
Tabelle 46: Resultat Korrelationsanalyse Progesteron/Testosteron vom Gesamtkollektiv ……80
Tabelle 47: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 54 ……81
Tabelle 48: Resultat Korrelationsanalyse Progesteron/Testosteron bei Frauen ohne hormoneller Verhütung ……82
Tabelle 49: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 55 ……82
Tabelle 50:Resultat Korrelationsanalyse Progesteron/Testosteron bei Frauen ohne hormoneller Verhütung ……83
Tabelle 51: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 56 ……84
Tabelle 52: Resultat Korrelationsanalyse Progesteron/Testosteron bei Männern …..84
Tabelle 53: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 57 ……86
Tabelle 54: Resultat Korrelationsanalyse Progesteron/FORT vom Gesamtkollektiv ..86
Tabelle 55: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 58 ……87
Tabelle 56: Resultat Korrelationsanalyse Progesteron/FORT bei Frauen ohne Hormoneinnahme ……88
Tabelle 57: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 59 ……89
Tabelle 58: Resultat Korrelationsanalyse Progesteron/FORT bei Frauen in der Follikelphase ……..90
Tabelle 59: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 60 ……90

Tabelle 60: Resultat Korrelationsanalyse Progesteron/FORT bei Frauen in der Lutealphase ……91
Tabelle 61: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 61 ……92
Tabelle 62: Resultat Korrelationsanalyse Progesteron/FORT bei Frauen mit hormoneller Verhütung ……93
Tabelle 63: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 62 ……93
Tabelle 64: Resultat Korrelationsanalyse Progesteron/FORT bei Männern ……9

# 1 Einleitung

Als wichtiger Regulator des Fortpflanzungssystems stellt Progesteron eines der bedeutsamsten Hormone des weiblichen Organismus dar. Das Steroidhormon übt zahlreiche Funktionen aus und führt daher bei gestörter Freisetzung zu unerwünschten oder fehlenden Effekten. Immer mehr Erkenntnisse über Biochemie und Wirkung des Hormons werden gewonnen. Auch für diagnostische Zwecke wurden in der Vergangenheit moderne Methoden zur Progesteron-Bestimmung entwickelt.

Die Messung des Hormonspiegels aus dem Speichel hat den großen Vorteil, dass ausschließlich die aktive und damit physiologisch wirksame Form registriert wird. Im Blut können Steroidhormone als lipophile Verbindungen nämlich nur zu einem kleinen Teil frei vorliegen und sind ohne biologischer Aktivität vorrangig an Transportproteine gebunden. Nach passiven Übergang des Progesterons entspricht der Gehalt im Speichel dem ungebundenen Anteil des Sexualhormons im Blut. Damit ist die gemessene Salivakonzentration ein Maß für die vorliegende biologische Aktivität von Progesteron. (Kozloski et al., 2014, S. 215)

Die Quantifizierung von Progesteron kann insofern sinnvoll sein, wenn es darum geht die Funktion des Gelbkörpers festzustellen (Reinwein et al., 2000, S. 69). Warum hierzu Progesteron nachgewiesen wird beziehungsweise wieso ein gesunder Gelbkörper maßgebend für die Fertilität der Frau ist, wird später genauer erläutert. Immer häufiger finden wir in unserer heutigen Gesellschaft Fälle von unerfüllten Kinderwunsch oder wiederkehrenden Fehlgeburten. Hier ist es möglich den Progesteronwert als Diagnostikum einzusetzen, um auf diesem Weg den Fruchtbarkeitsstatus festzustellen oder eine vorliegende Schwangerschaft zu kontrollieren (Meulenberg & Hofman, 1989, S. 172).

Mit Hilfe dieser Diplomarbeit soll der Vorgang der Speichelmessung erläutert und Zusammenhänge der Progesteronmenge mit anderen Faktoren abgeklärt werden.

# 2 Progesteron

Progesteron ist der natürliche Vertreter der Gestagene, die zusammen mit den Estrogenen die weiblichen Sexualhormone darstellen. Auch die Bezeichnung Gelbkörperhormon ist für Progesteron üblich. Diese ist auf den wichtigsten Bildungsort, das Corpus luteum (Gelbkörper) des Ovars, zurückzuführen. Mit Pregn-4-en-3,20-dion kann das endogene Hormon präzise benannt werden (Ammon, 2004, S. 737). Daraus ist ableitbar, dass es sich bei Progesteron um ein Pregnanderivat handelt, das Partialstrukturen eines α, β-ungesättigten Ketons im Ring A und einen Methylketon an der Position 17 besitzt (Steinhilber et al., 2005, S. 308).

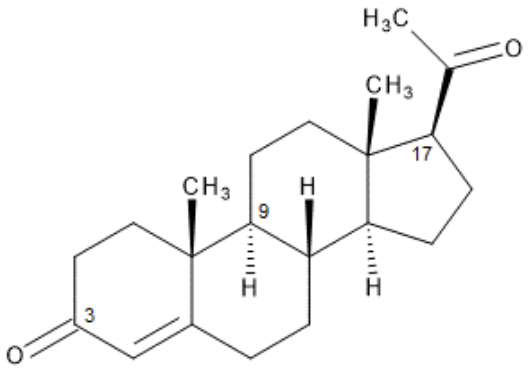


*Abbildung 1: Struktur von Progesteron (in Anlehnung an Steinhilber et al., 2005, S. 309)*

## 2.1 Biosynthese von Progesteron

Der Gelbkörper, der wie oben schon erwähnt für die Hauptproduktion des weiblichen Geschlechtshormons zuständig ist, entwickelt sich im Anschluss der Ovulation aus dem Follikel. Während der Schwangerschaft ist die Plazenta für die Herstellung von Progesteron verantwortlich. Außerdem findet die Synthese im geringen Maß auch in der Nebenniere statt. Trotz seiner Rolle als Sexualhormon der Frauen, findet man Progesteron als Intermediärprodukt in der Biosynthese von Testosteron auch bei Männern (Forth et al., 2001, S. 697). Beim männlichen Geschlecht erfolgt die Anfertigung sowohl in der Nebenniere, als auch in den Hoden.

Die Muttersubstanz aller Steroide ist exogen zugeführtes oder endogen gebildetes Cholesterin. Das daraus entstehende Pregnenolon ist ebenfalls Bestandteil der Synthesewege anderer Hormone. Der Umbau von Cholesterin zu Pregnenolon erfolgt mit einem Enzymsystem, das an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist.

Zwischen den Kohlenstoffatomen 20 und 22 des Cholesteringerüstes spaltet das zuständige Enzym CYP11A1 (P450 scc, „side chain cleavage“-Enzym) die Seitenkette ab (Aktories et al., 2009, S. 684). Nach Einführung einer Ketongruppe am C20 wird die Bildung von Progesteron aus Pregnenolon mit Hilfe der 3β-Hydroxy-$\Delta^5$-Steroid-Dehydrogenase katalysiert. Dabei wird die β-ständige Sauerstoff-Gruppe am C3 zum Keton konvertiert. Coenzym ist dabei $NAD^+$, oxidierte Form von Nicotinamid-adenindinucleotid, das selbst zu NADH reduziert wird. Im Anschluss folgt die Umlagerung der Doppelbindung mittels der 3-Oxosteroid-$\Delta^4$-$\Delta^5$-Isomerase und es kommt schließlich im Cytoplasma zur Bildung des Progesterons (Träger, 1977, S. 44-47). Es besitzt 21 Kohlenstoffatome und erinnert aus chemischer Sicht an Nebennierenhormone, die durch mehrere Hydroxylierungsschritte aus dem physiologischen Gelbkörperhormon entstehen können (Mutschler et al., 2001, S. 436).

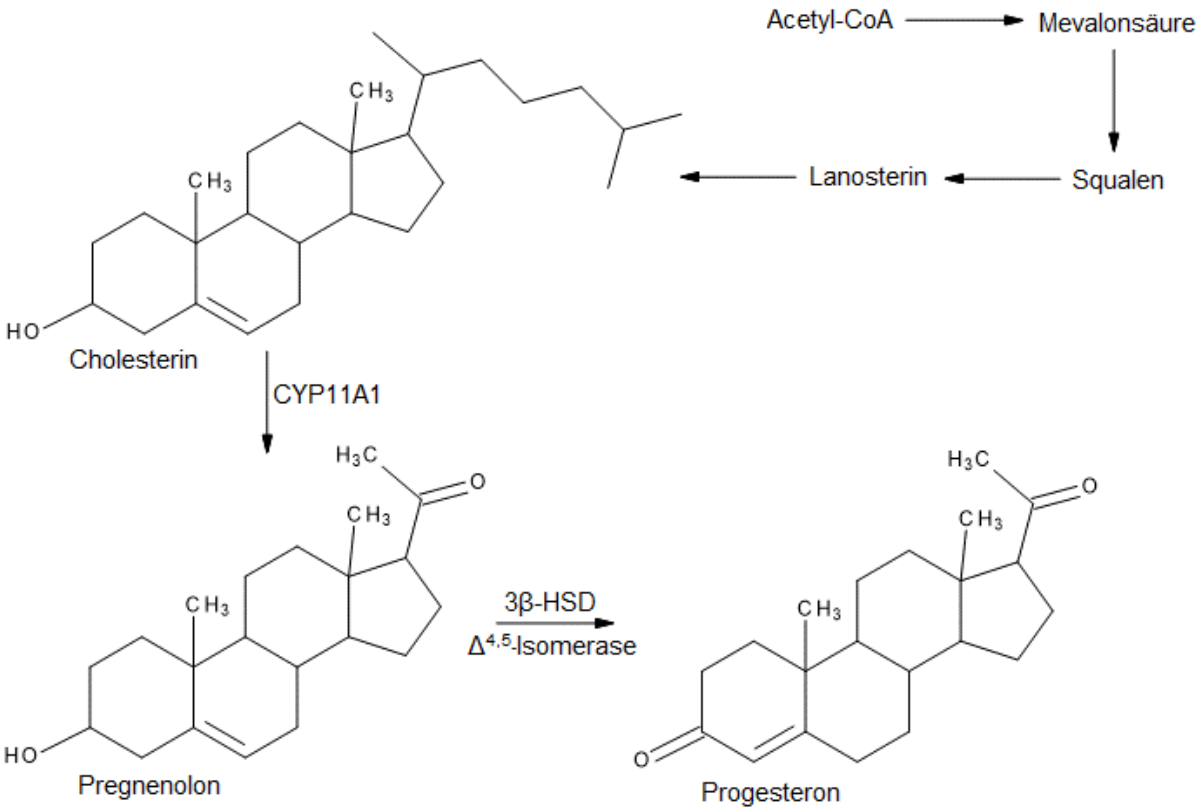


*Abbildung 2: Biosynthese von Progesteron (in Anlehnung an Aktories et al., 2009, S. 685)*

## 2.2 Regulation der Progesteron-Biosynthese

Die Synthese und Sekretion von Progesteron ist bei der geschlechtsreifen Frau abhängig von zyklischen Veränderungen. Grob gesagt teilt sich der weibliche Menstruationszyklus in zwei Abschnitte: Follikel- und Lutealphase. Dazwischen liegt

der Eisprung. Primär wird der Zyklus der Frau durch Hormone des Hypothalamus, der Hypophyse und der Ovarien gesteuert. Das Neuropeptid GnRH (Gonadotropin-Releasing-Hormon) wird im Hypothalamus hergestellt und beeinflusst als Liberin (Freisetzungshormon) die Bildung der Hypophysenvorderlappenhormone FSH (Follikelstimulierendes Hormon) und LH (Luteinisierendes Hormon). Die Gestagenproduktion im Gelbkörper wird durch LH koordiniert. Da das Gonadotropin LH unter anderem für die Auslösung des Follikelsprungs verantwortlich ist, kommt es kurz vor der Ovulation zu einer starken Zunahme der Progesteronsynthese. Das Luteinisierende Hormon initiiert die Umwandlung des reifen, platzenden Follikels zum Corpus luteum. Im Zuge der Luteinisierung werden Granulosa- und Thekaluteinzellen gebildet, wo unter Beeinflussung von LH Cholesterin für die Steroidhormonsynthese über LDL-Rezeptoren aufgenommen werden kann (Gerok et al., 2007, S.1036). Damit Cholesterin auch zur inneren Mitochondrienmembran, wo sich die für die Synthese benötigten Enzyme befinden, gelangen kann, gibt es das Protein StAR (steroidogenic acute regulatory protein). Das mitochondriale Protein hat eine Regulatorfunktion, indem es in Abhängigkeit von LH innerhalb kürzester Zeit Cholesterin für die Progesteronbildung durchschleusen kann. Bei fehlendem Signal unterbindet StAR diesen Transport allerdings auch (Aktories et al., 2009, S. 686).

Ein negativer Rückkoppelungsmechanismus sorgt gegen Ende der Lutealphase für eine abnehmende sekretorische Aktivität des Hypothalamus-Hypophysensystems (Forth et al., 2001, S.674). Progesteron selbst verhindert somit die weitere Freisetzung von GnRH und LH.

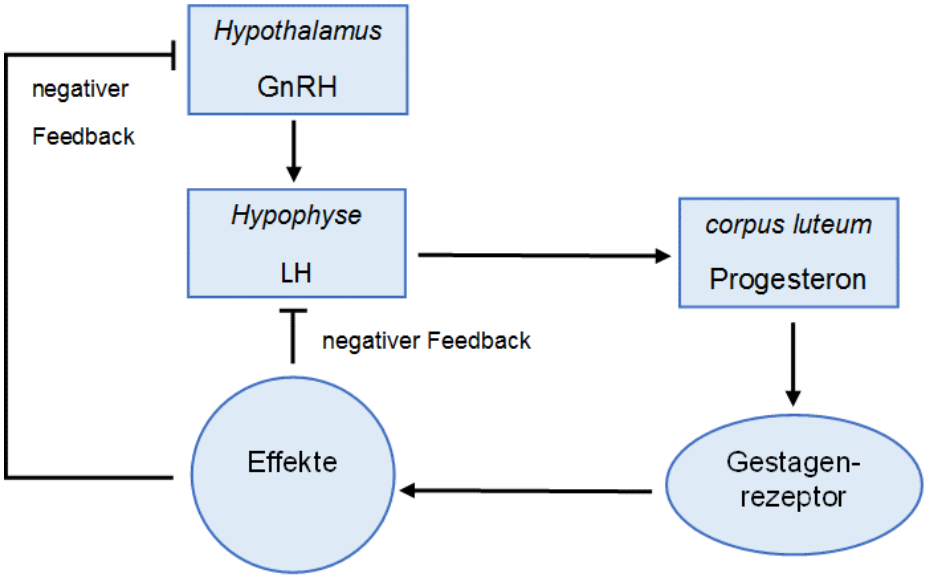


*Abbildung 3: Regulation der Sekretion von Progesteron (in Anlehnung an Steinhilber et al., 2005, S. 308)*

Ein weiterer kontrollierender Botenstoff ist Prolaktin, ebenfalls ein Hormon aus dem Hypophysenvorderlappen (Träger, 1977, S. 47). Die Regulation des Gelbkörperhormons in der Plazenta ist noch nicht vollständig abgeklärt (Forth et al., 2001, S. 698).

Progesteron wird je nach Alter, Geschlecht und Zyklusphase in unterschiedlichen Mengen sezerniert. Die Produktion in der Follikelphase ist, vergleichbar mit der Syntheserate der Männer (Wirth et al., 2007, S. 104), gering. Sie beträgt etwa 2-3 mg täglich. Wie zuvor schon beschrieben nimmt der Progesteronspiegel mit steigender LH-Konzentration kurz vor dem Eisprung zu und der Gelbkörper bildet in der zweiten Zyklusphase bis zu 20-30 mg des Steroidhormons am Tag. Bei nicht erfolgter Befruchtung beginnt der Corpus luteum zu regredieren, wodurch die Progesteronsynthese wieder abnimmt. Mit Einsetzen der Menstruationsblutung findet man somit wieder geringe Hormonspiegel vor (Gröschl et al., 2001, S. 616).

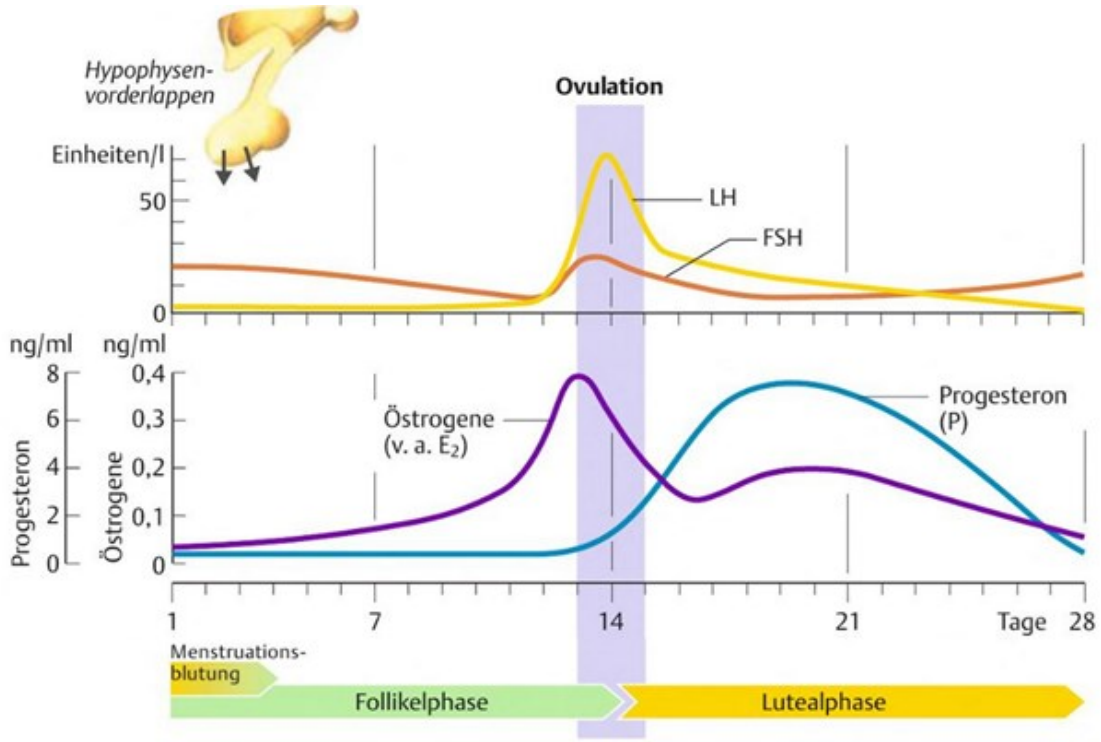


*Abbildung 4: Hormonsekretion während des Menstruationszyklus (Silbernagl & Despopoulos, 2012, S. 315)*

Während der Schwangerschaft treten deutlich höhere Produktionsraten auf, wobei sich im dritten Trimenon sogar Serumkonzentrationen bis 260 ng/ml finden lassen. (Runnebaum & Rabe, 1994, S. 37)

Da die LH-Sekretion tageszeitlich nicht einheitlich ist, unterliegt auch die damit einhergehende Progesteron-Fertigung unregelmäßigen Schwankungen. Hierbei ist es gleichgültig, ob es sich um die Follikel- oder die Lutealphase handelt (Walker et al., 1979, S. 2032).

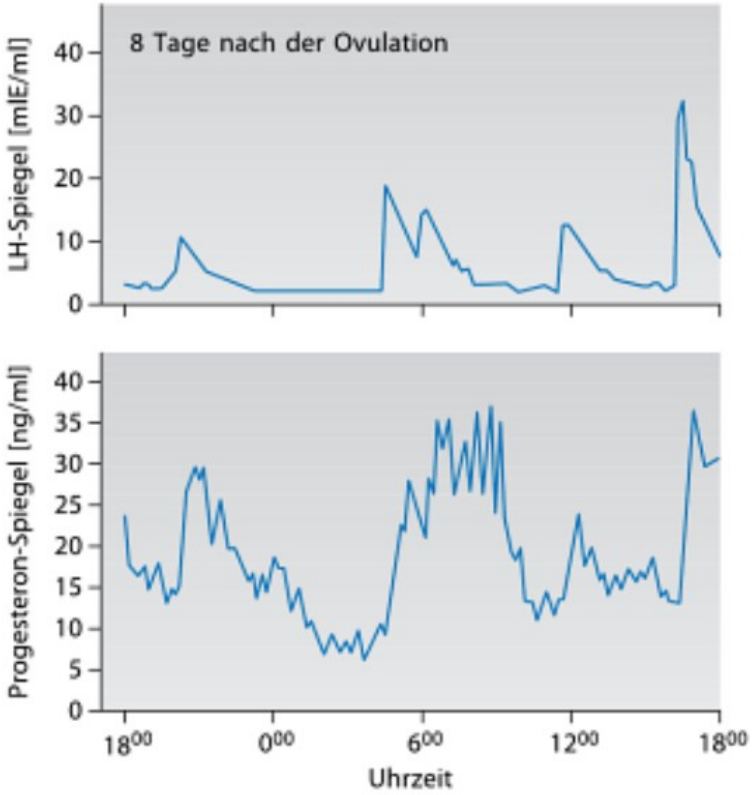


*Abbildung 5: Korrelation der pulsatilen Freisetzung von LH und Progesteron (Leidenberger et al., 2014, S. 194)*

Aufgrund ihrer Lipophilie sind Steroidhormone in der Lage die Zellmembran zu passieren. Der Rezeptor der Gestagene ist intrazellulär lokalisiert und fungiert nach Ligandenbindung als nukleärer Transkriptionsfaktor. Im humanen Organismus liegen davon zwei Isoformen PR-A und PR-B vor. Die beiden Rezeptorproteine besitzen zwar ein gemeinsames Gen, jedoch verschiedenartige Promotoren. PR-A und PR-B unterscheiden sich lediglich am aminoterminalen Ende um 164 Aminosäuren. Dabei stellt die Isoform B mit etwa 116-120 kDa im Gegensatz zu 81-83 kDa von PR-A die aktivere Struktur dar (Diedrich et al., 2007, S. 68). Durch die weiteren Aminosäuren, über die PR-B verfügt, ergibt sich eine zusätzliche Aktivierungsdomäne AF-3, wodurch die Eigenschaft der Isoform als Transkriptionsfaktor erklärt werden kann. Der Progesteronrezeptor-A ist dagegen nach Ligandenbindung als dominanter Repressor verschiedener Steroidhormonrezeptoren, wie auch von PR-B und dem Estrogenrezeptor, tätig. Vorrausetzung für diese Funktion ist eine inhibitorische Domäne von 140 Aminosäuren am C-terminalen Ende. Das Zusammenspiel sowie die

unterschiedlich ausgeprägte Aktivität dieser beiden Rezeptortypen ergibt die endokrine Wirkung von Progesteron. Uterus und Ovarien stehen vor allem unter dem Einfluss von Isoform A. In den Brustdrüsen dagegen ist vorrangig PR-B physiologisch wirksam. (Aktories et al., 2009, S. 699)

Steroidhormonrezeptoren besitzen mehrere Regionen, denen unterschiedliche Aufgaben zugeordnet sind. Eine der Domänen bindet das Hormon, wobei der Rezeptor allosterisch aktiviert wird und seine Konformation verändert. Nach der Translokation des Hormon-Rezeptor-Komplexes in den Zellkern interagiert der zuständige Abschnitt mit einer spezifischen DNA-Sequenz (Response-Element) um die Transkription mit Hilfe verschiedener Kofaktoren zu starten. Wie in Abbildung 6 ersichtlich, werden anschließend Proteine gebildet, die die Eigenschaften des Hormons bestimmen.

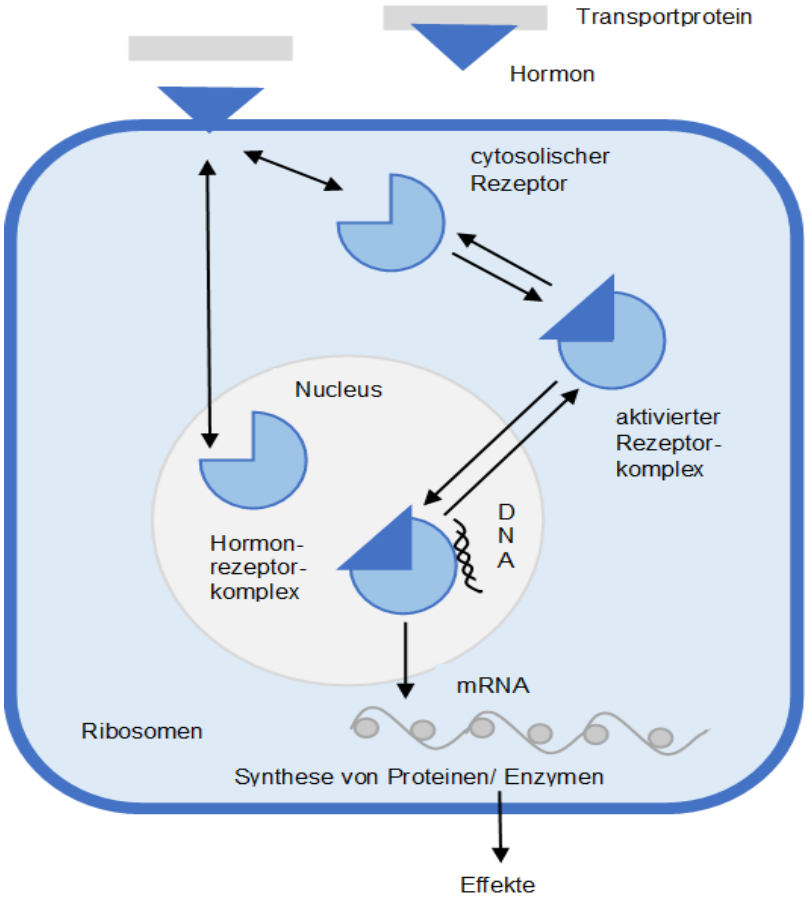


*Abbildung 6: Wirkmechanismus von Progesteron (in Anlehnung an Fort et al., 2001, S. 674)*

Durch den beschriebenen Wirkungsmechanismus setzt die Hormonwirkung nach Stunden bis Tagen ein (Forth et al., 2001, S. 673). Bei Bedarf ist es Progesteron auch möglich innerhalb von Sekunden oder Minuten seine Effekte auszulösen. Hierbei spielen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Ionenkanäle eine Rolle, die über den

MAP-Kinase-Weg ebenfalls bestimmte Gene anregen können. Weiters existieren membranäre Progesteronrezeptoren, deren Anteil an der Wirkung des Hormons noch nicht aufgeklärt ist. (Aktories et al., 2009, S. 687-690)

## 2.3 Metabolismus und Pharmakokinetik von Progesteron

Die für den Transport verantwortlichen Proteine werden in der Leber gebildet. Deren Synthese wird durch Östrogene und in der Schwangerschaft, um die Progesteron-konzentration im Blut hoch zu halten, gefördert. Der größte Teil, etwa 80% des natürlichen Gestagens, wird im Blut mittels Albumin transportiert. 18 Prozent sind an das Plasmaprotein Transcortin gebunden. Mit 2% liegt eine geringe Menge des Hormons frei als aktive Form vor. (Aktories et al., 2009, S. 699)

Nach Transport des Gelbkörperhormons an seine Zieladresse, kann mit Hilfe der zuständigen Reduktase die Pregnan-Verbindung am Ring A reduziert werden und es entsteht 5α-Dihydroprogesteron (5α-Pregnan-3,20-dion) (Träger, 1977, S. 47). Diese Verbindung wird mittels einer Oxidoreduktase zu Allopregnanolon (3α, 5α-Tetra-hydroprogesteron) metabolisiert, das im Anschluss noch epimerisiert werden kann (Schumacher et al., 2012, S. 5).
Ein Cytochrom-$P_{450}$-Enzym mit 17α-Hydroxylase-Aktivität wandelt Progesteron in 17α-Hydroxyprogesteron, Vorstufe von Androgenen und Estrogenen, um. Wie bei Punkt 2.1 schon erwähnt, entwickeln sich aus Progesteron über mehrere Hydroxylierungs-Schritte auch die Hormone der Nebenniere. Dabei können entweder über 17α-Hydroxyprogesteron Glucocorticoide oder durch Einführung der ersten OH-Gruppe an der Position 21 Mineralcorticoide gebildet werden. (Träger, 1977, S. 51)

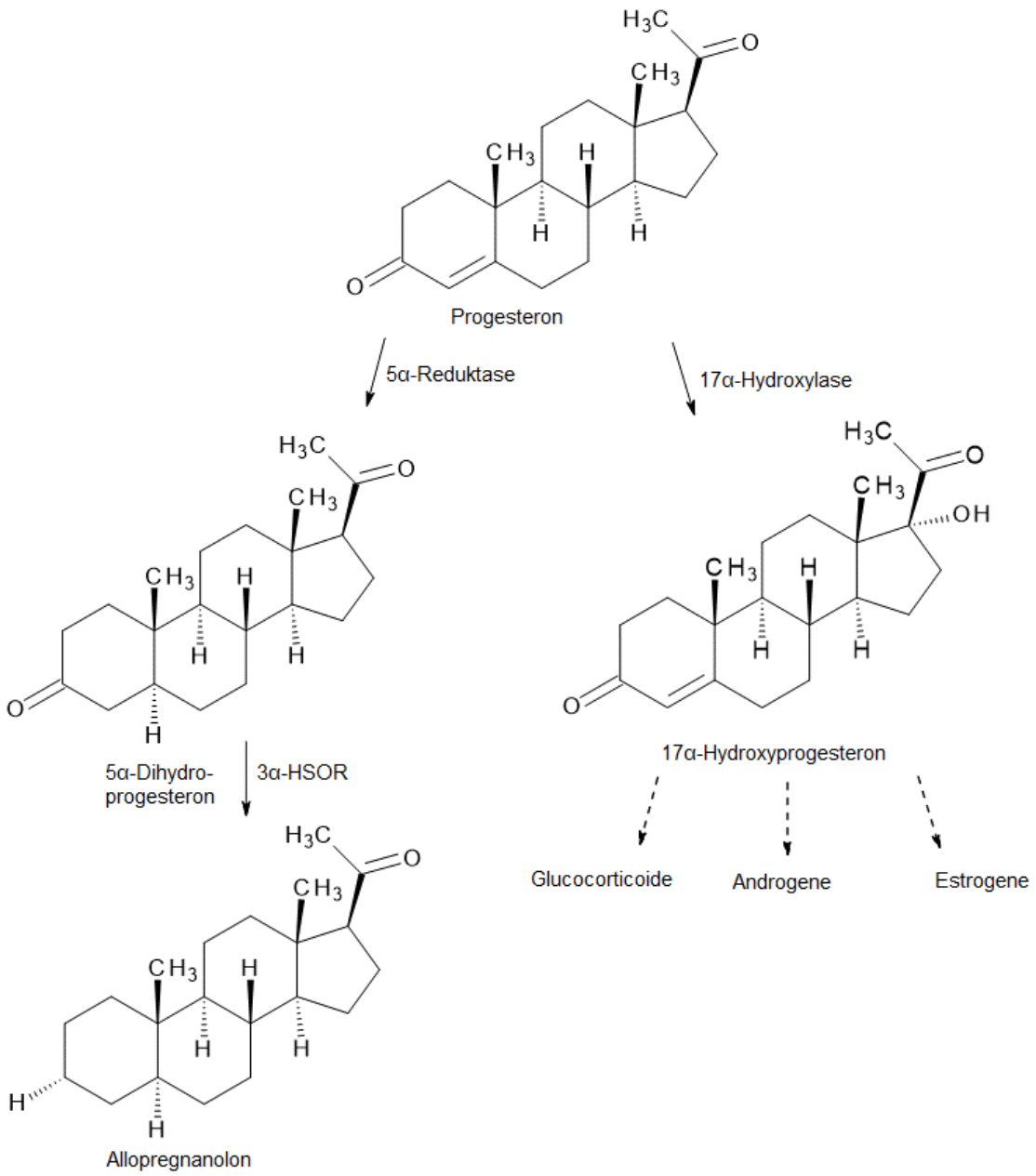


*Abbildung 7: Entstehung von Progesteron-Metaboliten (in Anlehnung an Schumacher et al., 2012, S. 5)*

Die Verstoffwechselung von Progesteron, das eine Halbwertszeit von zirka 20 Minuten besitzt, findet sehr rasch in der Leber statt. Im Zuge des Abbaus werden die Doppelbindungen und die Ketone reduziert, wobei sich Pregnandiole bilden. In Form wasserlöslicher Sulfate oder Glucuronide werden die Stoffwechselprodukte im Urin ausgeschieden. (Aktories et al., 2009, S. 699)

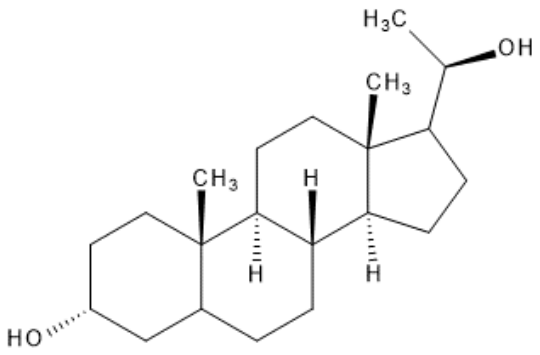


*Abbildung 8: Pregnandiol (in Anlehnung an Mutschler et al., 2001, S. 437)*

## 2.4 Wirkungen von Progesteron

Die endokrinen Effekte von Progesteron ergeben sich im Zusammenspiel mit Estrogenen. Dabei spielen folgende Faktoren eine Rolle:

- Estrogen-Gestagen-Verhältnis
- zeitliche Sequenz des Zusammenwirkens
- ausreichende Estrogenwirkung.

Die Wirkung der Estrogene ist aus diesem Grund wichtig, da sie das Exprimieren von Progesteronrezeptoren stimulieren. (Aktories et al., 2009, S. 698)

Zu beachten ist, dass Progesteron ausschließlich beim weiblichen Geschlecht aktiv wirken kann (Träger, 1977, S. 118). Die Hauptfunktion des Gelbkörperhormons ist die Regulation des Menstruationszyklus der Frau. Während im ersten Teil des Zyklus (Follikelphase) vor allem Estrogene vorliegen, überwiegen nach der Ovulation (Lutealphase) Gestagene. Dieser Abschnitt des Zyklus dauert 12-16 Tage und wird auch Gelbkörperphase genannt, da sich nach der Ovulation der Progesteron-produzierende Gelbkörper bildet. Die durch Estradiol vorbereitete Gebärmutter-schleimhaut (Endometrium) wird durch Progesteron sekretorisch, mittels Einlagerung von Glykogen, umgewandelt. Dies hat zur Folge, dass im Falle einer befruchteten Eizelle die Nidation erfolgen kann. (Aktories et al., 2009, S. 701)

Progesteron wirkt über den negativen Rückkoppelungsmechanismus (siehe 2.2 Regulation der Progesteron-Biosynthese) antiestrogen, da das Hypothalamus-Hypophysenystem auch für die Produktion von Estrogenen verantwortlich ist. Einerseits wird die Verstoffwechselung von Estradiol gefördert, andererseits werden

Estrogenrezeptoren vermindert exprimiert und damit auch die darauf beruhenden Effekte stark reduziert. So kommt es beispielsweise zu einer Zunahme der Viskosität des Zervikalsekrets. (Leidenberger et al., 2014, S. 30f)
In anderen Fällen wirken die beiden weiblichen Sexualhormone jedoch synergistisch, wie zum Beispiel bei der Entwicklung von Brustdrüsen (Träger, 1977, S. 119).

Weiters ist Progesteron auch als Schwangerschaftshormon bekannt. Das humane Choriongonadotropin hCG übernimmt bei Vorliegen einer Schwangerschaft die Verantwortung ausreichend Progesteron zu produzieren, um die Ruhigstellung des Uterus zu garantieren und eine erneute Ovulation zu verhindern (Träger, 1977, S. 119). Außerdem übt Progesteron einen positiven Einfluss auf die Atmung der Mutter und damit auf die Sauerstoffversorgung des Embryos aus (Mutschler et al., 2001, S.437). Ab Ende des ersten Trimenons sorgt die Plazenta für die Synthese des Schwangerschaftshormons und der hCG-Gehalt sinkt.

Zentral führt das Gelbkörperhormon in der Lutealphase durch Kontakt mit thermosensitiven Neuronen zu einer erhöhten Körpertemperatur (0,6-1°C) (Träger, 1977, S. 122). Sogar ein sedierender und anxiolytischer Effekt ist Progesteron, aufgrund Interaktionen mit $GABA_A$-Rezeptoren, zuzuschreiben (Bitzer, 2010, S. 477).

In großer Menge kann Progesteron auch metabolische Vorgänge katabol beeinflussen und sorgt zum Beispiel für die vermehrte Ausscheidung von Stickstoffverbindungen. Weil auch das Nebennierenhormon Cortisol im Plasma mittels Transcortin transportiert wird, kann es bei einer hohen Progesteronkonzentration daraus verdrängt werden. Dieser funktionelle Antagonismus erklärt die leicht antimineralcorticoide und damit mild diuretische Wirkung des Gestagens. Im Fettstoffwechsel kann mit Hilfe von Progesteron die Lipoproteinlipase leichter aktiviert werden. Fette werden somit eher zellulär aufgenommen und gespeichert. (Leidenberger et al., 2014, S. 31)

Die physiologische Progesteronproduktion und –freisetzung ist, neben der eigenen endokrinen Wirkung, auch wichtig für die Synthese anderer Steroidhormone. Nebennierenhormone (Cortisol), Androgene (Testosteron) oder Estrogene (Estradiol) können im weiteren Verlauf aus Progesteron entstehen. (Mutschler et al., 2001, S. 437)

## 2.5 Bedeutung von Progesteron in der Pharmazie

Schädigungen oder Erkrankungen des Hypothalamus-Hypophysensystems können zu einer gestörten Freisetzung weiblicher Sexualhormone führen.

*Tabelle 1: Effekte bei Überschuss und Mangel von Progesteron (in Anlehnung an Silbernagl & Lang, 2005, S. 277)*

| | **ausgelöster Effekt** | **Folgen** |
|---|---|---|
| **Gestagene ↑** | antimineralcorticoide Wirkung | Natriurese |
| | Insulinresistenz | Diabetes mellitus |
| | Grundumsatz↑, Körpertemperatur↑ | Hyperventilation |
| **Gestagene ↓** | Reifung der Uterusschleimhaut↓ | Amenorrhoe |
| | Brustdrüsenschläuche- und alveolen ↓ | keine ausgeprägten Geschlechtsmerkmale |

Malnutrition, Prolactin und andere Ursachen sind über eine verminderte GnRH-Ausschüttung aus dem Hypothalamus im Stande Progesteron-Mangelerscheinungen zu erzeugen. Weiters impliziert eine beeinträchtigte Hypophyse eine verringerte Produktion der Hormone. Tumore können auf der einen Seite eine stark absinkende Progesteron-Konzentration hervorrufen, andererseits sind manche Tumore fähig selbst das Gestagen zu synthetisieren. Die Progesteronbildung ist ebenso im Falle einer Ovarial- oder Corpus-luteum-Insuffizienz eingeschränkt. Auch bei Vorliegen des Resistant-ovary-syndrome ist sie betroffen, da hier eine Unempfindlichkeit der Ovarien gegenüber LH und FSH vorliegt. Genaue pathophysiologische Veränderungen der Gelbkörperhormonsynthese sind aus Abbildung 9 zu entnehmen. (Silbernagl & Lang, 2005, S. 274)

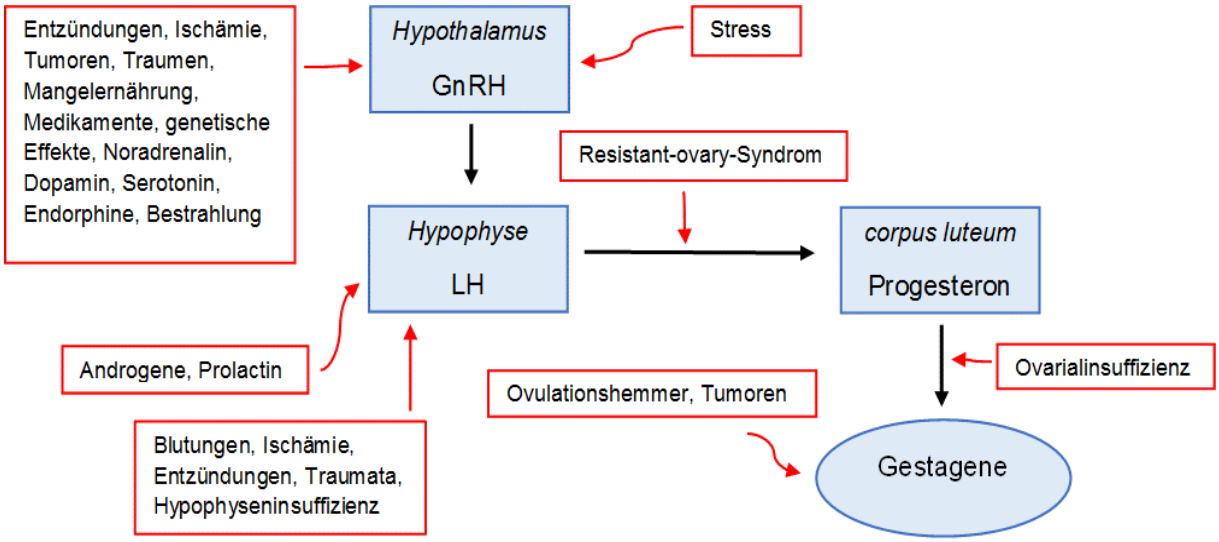


*Abbildung 9: Einflussfaktoren der Progesteronfreisetzung (in Anlehnung an Silbernagl & Lang, 2005, S. 275)*

Als Grund für die Entstehung vom prämenstruellen Syndrom (PMS) kurz vor der Menses nimmt man ebenso einen zu geringen Spiegel von Progesteron an (Usman et al., 2008, S. 253). Doch auch durch den natürlichen Prozess des Alterns lässt die Produktion vom natürlichen Gestagen bei Frauen nach und das Progesteron-Defizit sorgt schon zu Beginn der Menopause für Beschwerden. Progesteron kann daher zusätzlich bei Estrogeneinnahme im Klimakterium im Rahmen einer Hormonersatztherapie verabreicht werden (Aktories et al., 2009, S. 692). Das natürliche Hormon wird wegen seines ausgeprägten First-Pass-Metabolismus und geringer Absorption jedoch hauptsächlich parenteral angewendet. Da Progesteron auch auf parenteral zugeführten Wege nicht lange wirksam ist, werden praktisch ausschließlich modifizierte Derivate eingesetzt:

(1) Durch Einbringen einer zusätzlichen Doppelbindung am Pregnan-Grundgerüst kann die Verbindung oral appliziert werden.

(2) Mit Einführung einer Acetoxygruppe an der Position 17α wird die Wirksamkeit verlängert.

(3) 17α-Ethinyl-Testosteron-Verbindungen besitzen eine erhöhte Affinität zum Progesteronrezeptor und weisen eine höhere Halbwertszeit auf, da die am Abbau beteiligte Acetylgruppe eliminiert wurde.

(4) Mit entfernter Methylgruppe am C10 und einer zur Ethylgruppe verlängerten Methylgruppe am C13 zeigen die entstehenden Derivate

ein höchst affines und selektives Verhalten gegenüber Progesteron-rezeptoren. (Steinhilber et al., 2005, S. 308-313)

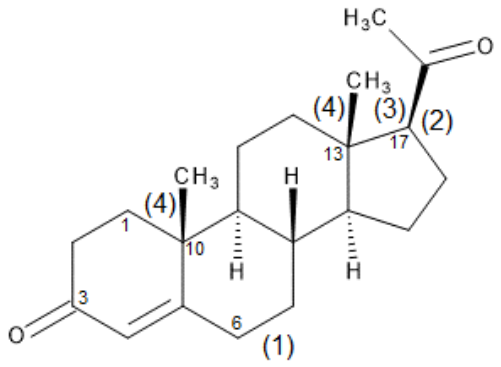


*Abbildung 10: Leitsubstanz Progesteron mit gekennzeichneten Positionen zur Bildung von Derivaten (in Anlehnung an Steinhilber et al., 2005, S. 309-312)*

Die strukturell veränderten Abkömmlinge des Progesterons finden vor allem in der Schwangerschaftsverhütung als hormonelle Kontrazeptiva ihren Einsatz. Der Zervixschleim wird durch das Gestagen so zäh, dass die Migration von Spermatozoen nicht mehr möglich ist. Außerdem wird die Ovulation über den negativen Rückkopplungsmechanismus gehemmt. Man unterscheidet zwischen Kombinations-präparaten, die neben einem synthetischen Gestagen auch eine Estrogen-Komponente enthalten, reine Gestagenpräparate (Minipille) und Depotpräparate. (Forth et al., 2001, S. 701f)

Weiter Anwendungsmöglichkeiten für Gestagene sind:

- dysfunktionelle Blutungen,
- Dysmenorrhö,
- Endometriose,
- Sekundäre Amenorrhö,
- Metastasierendes Mamma- und Endometriumkarzinom,
- Androgenisierungserscheinungen bei der Frau. (Aktories et al., 2009, S. 702f)

# 3 Fragestellung

Um den Progesterongehalt feststellen zu können, erfordert es geeignete diagnostische Methoden. Hierbei wird das Hormon in den meisten Fällen aus Plasma oder Serum bestimmt. Dazu werden biochemische Nachweisverfahren, hauptsächlich immunologische Tests wie klassischerweise Radioimmunoassays (RIA), verwendet. Ein RIA funktioniert ähnlich der im Rahmen der Diplomarbeit benutzten Quantifizierungsmethode. Aufgrund der radioaktiven Reagenzien und damit verbundenen Auflagen bedeutet ein Radioimmunoassay jedoch großen Aufwand. Der weitaus einfachere Enzymimmunoassay (ELISA) hat den Vorteil auch teilautomatisiert durchgeführt werden zu können und zudem länger haltbar zu sein. (Marischler, 2007, S. 10)

Auch mittels chemischer Bestimmung, wie chromatographischer Methoden, ist das Gelbkörperhormon quantifizierbar. Extraktions- und Vorreinigungsschritte kosten allerdings Zeit und Mühe. Trotz hoher Empindlichkeit und Präzision der chemischen Analyse muss desweiteren beachtet werden, dass die dazu benötigten Geräte hohe Anschaffungs- und Wartungskosten bedeuten. (Runnebaum & Rabe, 1994, S. 52)

Als weitere Messmethode für Progesteron kann die chromatographische Bestimmung des Hauptmetabolits Pregnandiol aus dem Urin angesehen werden. Die Methode ist zwar zuverlässig, jedoch sind auch hier Extraktion und Aufreinigung des Stoffwechselprodukts aus dem Harn mit einem großen Zeitaufwand verbunden. Außerdem ist die Metabolismusrate unter anderem durch die vorliegende Leberaktivität limitiert. Somit kann vom gemessenen Pregnandiolwert nicht exakt auf den vorliegenden Spiegel des Gelbkörperhormons geschlossen werden. (Labhart, 1978, S. 646)

Die Hormonquantifizierung aus dem Speichel wird als nichtinvasive Alternative zu Serummessungen immer beliebter. Die Probennahme erfolgt weder unter Stress, noch muss sie durch ausgebildetes Personal durchgeführt werden. Dass mit Speichel gearbeitet wird garantiert zwar den Nachweis von ausschließlich biologisch aktiven Hormonen, jedoch spiegeln die Speichelkonzentrationen die Steroide aus dem Blut oftmals nicht getreu wieder (Konishi et al., 2012, S. 240). Trotz kontroverser

Diskussionen hat sich insbesondere der Cortisol-Speicheltest zu diagnostischen Zwecken gut etabliert. Es gilt herauszufinden, ob die Methode zur Progesteronbestimmung ebenfalls praktikabel ist beziehungsweise welche Störfaktoren die Ergebnisse verfälschen könnten. Durch kritisches Betrachten der Ergebnisse soll eine Bewertung dieser Quantifizierungsanalyse durchgeführt werden.

Außerdem soll überprüft werden, ob durch die gemessene Speichelprogesteron-konzentration von Frauen Rückschluss auf die vorliegende Phase des Menstruations-zyklus möglich ist. Unterschiede zwischen Frauen mit oder ohne Einnahme von Hormonen sollen ebenfalls herausgefiltert werden. Ob sich daraus ableiten lässt, welches Kontrazeptivum, Kombinations- oder reines Gestagenpräparat, vorliegt beziehungsweise, ob Schilddrüsenhormone Einfluss auf die Menge von Progesteron im Speichel nehmen, ist aufzuklären.

Zahlreiche Mechanismen beeinflussen die Synthese und Freisetzung vom Gelbkörperhormon und verschiedenste Funktionen werden wiederum durch das Steroid gesteuert. Botenstoffe, Radikale und Erkrankungen verändern daher die vorhandene Progesteronkonzentration. Im Praktikum Chemische Diagnostik und Klinische Pharmazie wurden einige endogene Faktoren, wie zum Beispiel Cortisol, Testosteron oder oxidativer Stress, bestimmt. So ist es möglich Zusammenhänge zwischen diesen Parametern und dem Progesteronspiegel festzustellen.

Des Weiteren sind Verbindungen mit Alter und Geschlecht der ProbandInnen zu setzen. Zusätzlich werden modifizierbare Faktoren, wie Ernährung und Sport, in die Bewertung der Hormonmessung miteinbezogen.

# 4 Praktischer Teil

## 4.1 Testprinzip

Um Hormone aus dem Speichel quantifizieren zu können, verwendet man Festphasen - Immunoassays. Es handelt sich genauer gesagt um einen enzymgekoppelten Immunoadsorbtionstest (ELISA) bei dem der nachzuweisende Analyt, in dem Fall das Progesteron, an monoklonale Antikörper bindet. Murine Antikörper, die sich spezifisch gegen den Analyten richten, sind in Vertiefungen einer Mikortiterplatte befestigt. Bevor die zu vermessene Probe zugegeben wird, pipettiert man eine genau definierte Menge eines Konjugats, das enzymmarkiertes Progesteron enthält, in jede einzelne Vertiefung. Das konjugierte Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) wird erst gegen Ende für die Messung des Analyten benötigt. Nach folgender Zugabe der Probe kommt es zu einer Konkurrenzsituation: sowohl das Enzymkonjugat, als auch das zu bestimmende Progesteron aus den Speichelproben können am Antikörper binden.

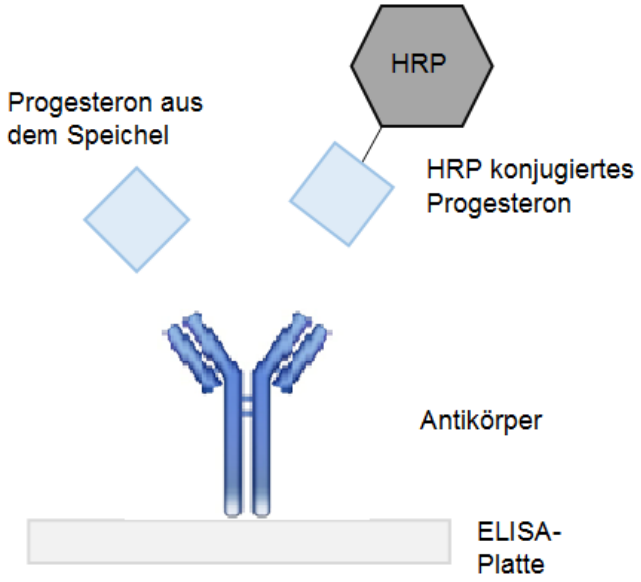


*Abbildung 11: Prinzip des kompetitiven Enzymimmunoassay (in Anlehnung an Raem & Rauch, 2007, S. 53)*

Eine große Menge vom Analyten bedeutet, dass HRP-konjugiertes Progesteron weniger binden kann und umgekehrt. Aus diesem Grund wird diese Bestimmungsmethode auch als kompetitiver Immunoassay bezeichnet. Freie, ungebundene Enzym-konjugierte Antigene werden nach vorgegebener Inkubations-

zeit mittels einer Waschlösung entfernt. Durch Zusatz einer Sustratlösung, die 3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidin (TMB) beinhaltet, entsteht mit Hilfe der Meerrettich-peroxidase eine blaue Färbung. Schwefelsäure sorgt als Stopplösung der Reaktion für die Bildung eines gelben Signals, das sich indirekt proportional zur Progesteronkonzentration in den Speichelproben verhält. Das Signal wird photometrisch bei 450 nm vermessen. (Raem & Rauch, 2007, S. 53)

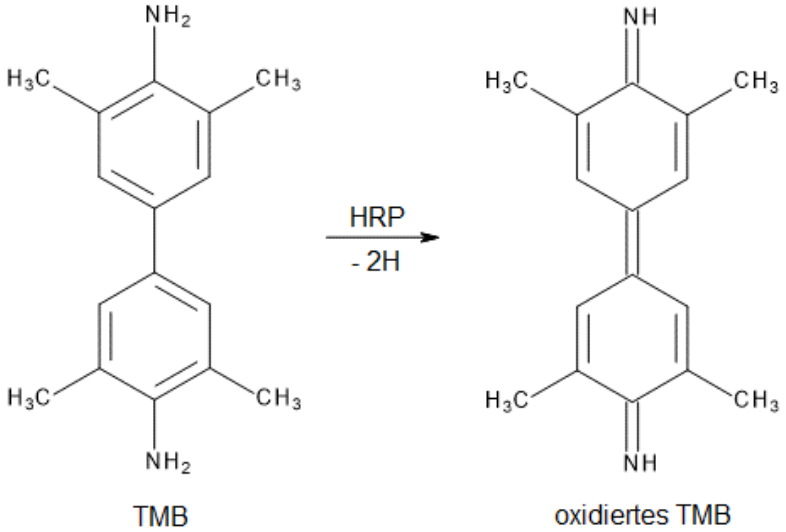


*Abbildung 12: Substratreaktion: TMB-Oxidation durch die Meerrettichperoxidase*

## 4.2 Durchführung des Progesteron-ELISA-Tests

### *4.2.1 Gewinnung der Speichelproben*

Um den Progesterongehalt aus dem Speichel von ProbandInnen ermitteln zu können, wurden Proben von Pharmaziestudierenden gesammelt. Im Rahmen der Testosteron-messung des Praktikums Chemische Diagnostik und Klinische Pharmazie im Wintersemester 2015/16 wurden die StudentInnen gebeten eine Probe abzugeben. Dabei wurden sie mündlich über die freiwillige, anonyme Teilnahme und Vorgehensweise der Probennahme informiert. Außerdem war ein Fragebogen (siehe Anhang) auszufüllen, der den TeilnehmerInnen ausführlich erklärt wurde.
Weitere Testpersonen waren MitarbeiterInnen des Departments für klinische Pharmazie und chemische Diagnostik sowie private Bekannte. Insgesamt wurden 80 Speichelproben gesammelt, 77 davon wurden vermessen. Aufgrund sichtbarer, starker Verunreinigungen durch Blut, Nahrungsbestandteile oder anderer Partikel sind drei Proben nicht in die Untersuchung miteinbezogen worden.

Um Kontaminationen zu vermeiden und vergleichbare Werte zu erlangen, wurden die ProbandInnen aufgefordert sich vor Abgabe des Speichels die Mundhöhle mit klarem Wasser auszuspülen. Nach fünf Minuten konnten, mit Hilfe kleiner Strohhalme zum Spucken, Proben in kleinen Gefäßen aus Polypropylen gewonnen werden. Die Aufbewahrungsgefäße wurden im Praktikum mit einer Protokollnummer, die restlichen Proben mittels Initialen der freiwilligen TeilnehmerInnen, beschriftet. Datum und Uhrzeit wurde bei jeder Probennahme genau dokumentiert, um später eventuell Rückschluss auf den Einfluss des Zeitpunkts der Abgabe machen zu können.

Die Gefäße mit dem Speichel wurden im Anschluss bei – 20 °C eingefroren. Durch diese Maßnahme besteht kein oder nur geringes Risiko, dass Mikroorganismen oder das Material der Aufbewahrungsgefäße die vorhandene Progesteronkonzentration beeinflussen (Gröschl et al., 2001, S. 740).

### *4.2.2 Testvorbereitung und verwendete Reagenzien*

Vor Beginn des Tests müssen die eingefrorenen Salivaproben aufgetaut werden. Zum selben Zeitpunkt wird der, bei etwa 8 °C gelagerte, Testkit aus dem Kühlschrank entnommen und bei Raumtemperatur erwärmt. Die Mikrotiterplatte wird dabei allerdings noch in ihrem Beutel inklusive Trocknungsmittel belassen. Auf diesem Weg werden große Temperaturdifferenzen und die Bildung von Kondenswasser vermieden. Nach einer Stunde ist der erwünschte Temperaturbereich (18-25 °C) der Materialien erreicht und die Platte kann aus der Verpackung entnommen werden. Die Bestimmung des Gelbkörperhormons mittels dem kompetitiven Enzymimmunoassay wurde in 4 Läufen aufgeteilt. Somit kann nach Abbrechen der benötigten Wells und Überführen dieser in eine weitere Platte der Beutel mit der Mikrotiterplatte, möglichst ohne Lufteinschluss, wieder verschlossen und bis zur nächsten Verwendung kühl gelagert werden.

Die mittlerweile aufgetauten Speichelproben werden durch Vortexen kurz gemischt und danach bei 2300 x g zehn Minuten lang zentrifugiert bevor die eigentliche Durchführung der Quantifizierungsmethode gestartet werden kann.

Weiters wird vor jedem Lauf ein Pipettierplan vorbereitet, damit das Risiko von Pipettierfehlern möglichst gering gehalten wird.
Folgende Reagenzien sind im Testkit „Progesterone Saliva ELISA“ enthalten:

*Tabelle 2: Komponenten des Testkits (IBL International GmbH, 2012, S.3)*

| Menge | Symbol | Komponente |
|---|---|---|
| 12 x 8 | MTP | Mikrotiterplatte:<br>Mit monoklonalen Antikörpern gegen Progesteron beschichtet. |
| 6 x 1 mL | CAL A-F | Progesteron - Standards A-F:<br>▪ A: 0 pg/mL<br>▪ B: 25 pg/mL<br>▪ C: 50 pg/mL<br>▪ D: 250 pg/mL<br>▪ E: 1000 pg/mL<br>▪ F: 5000 pg/mL<br>Zusätzlich sind Stabilisatoren und das Konservierungsmittel ProClin 300 enthalten. |
| 2 x 1 mL | CONTROL 1 + 2 | Progesteron - Kontrolle 1 + 2:<br>▪ 1: 67.2 pg/mL<br>▪ 2: 603 pg/mL<br>Zusätzlich sind Stabilisatoren und das Konservierungsmittel ProClin 300 enthalten. |
| 13 mL | ENZCONJ | Enzymkonjugat:HRP konjugiertes Progesteron<br>Zusätzlich sind Stabilisatoren enthalten. |
| 100 mL | WASHBUF CONC | Waschpuffer:<br>10-faches Konzentrat mit Phosphatpuffer und Tween. |
| 15 mL | TMB SUBS | TMB Substratlösung:<br>Zusätzlich sind Puffer und Stabilisatoren enthalten. |
| 15 mL | TMB STOP | TMB Stopplösung: Schwefelsäure |

### *4.2.3 Ausführung der Arbeitsschritte und Messung*

Nachdem alle nötigen Vorbereitungen getroffen wurden, kann der Progesteron-ELISA-Test beginnen. Beim ersten Lauf wird zur Bestimmung der Standardkurve je zwei Mal 50 µL aller Standards in unterschiedliche Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Dabei ist es wichtig, die Spitze der verwendeten Eppendorf Pipette bei jeder Standardlösung zu wechseln, um möglichst präzise Werte zur Aufstellung der Standardkurve zu erlangen. Anschließend werden auch 50 µL der beiden Kontrolllösungen und der einzelnen Proben nach Wechseln der Pipettenspitze und unter Berücksichtigung des vorher festgesetzten Pipettierschemas in freie Wells überführt. Beim Pipettieren des Speichels ist zu beachten, dass die Spitze mit dem Bodensatz nicht in Berührung kommt und ausschließlich klare Flüssigkeit aufgesaugt wird.

Im nächsten Schritt werden in jedes Röhrchen der Mikrotiterplatte 100 µL des Enzymkonjugats mit Hilfe einer automatischen Eppendorf Pipette, einer sogenannten Multipette, zugefügt. Zuerst jedoch muss das Konjugat durch Vortexen gut homogenisiert werden und auch die Einstellungen der Multipette sollten schon im Vorhinein festgelegt werden. So ist es möglich, in kurzer Zeit und gleichmäßigen Abständen exakt dieselbe Menge des enzymkonjugierten Antigens zu pipettieren. Die Reihenfolge richtet sich erneut nach dem Pipettierplan und sollte in der gleichen Abfolge wie vorher durchgeführt werden. Nach kurzem Schütteln der Platte folgt die eine Stunde andauernde Inkubation bei Raumtemperatur.

In der Zwischenzeit kann bereits die Waschlösung vorbereitet werden. Dazu muss Wachpuffer Konzentrat mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 vermengt werden. Für einen Lauf zu 28 Bestimmungen reichen 22,5 mL des Konzentrats und 202,5 mL Wasser um die Lösung herzustellen.

Da der Waschvorgang eine große Fehlerquelle darstellt, sollte auch hier die automatische Multipette benutzt werden. Wenn die Inkubationszeit abgelaufen ist, wird die Flüssigkeit in den Wells verworfen und der Anteil von nicht gebundenen HRP-konjugierten Progesteron somit entfernt. Von der Waschlösung wird zu diesem Zweck 250 µL pro Röhrchen benötigt. Diese muss im Anschluss wieder ausgeschüttet werden und der Vorgang wird noch weitere zwei Male wiederholt. Dazwischen und danach muss unbedingt darauf geachtet werden, dass keine Flüssigkeitsreste mehr vorhanden sind.

Nach Ausführung des Waschschrittes werden 100 µL der TMB Substratlösung zu den frisch gesäuberten Wells, wieder mittels der Eppendorf Multipette, zugeführt. Diesmal ist es wichtig nach Lesecharakter des ELISA-Platten-Lesegeräts zu pipettieren. Nun wird wiederum eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um anschließend, wegen der Umsetzung des TMBs durch die Meerrettichperoxidase des Konjugats, ein blau gefärbtes Reaktionsprodukt zu erhalten. Daraufhin folgt die Schwefelsäure-Stopplösung mit 100 µL pro Näpfchen. Zum Abbruch der Substratreaktion wird sie mit Hilfe der automatisierten Pipette zugegeben und es kommt nach kurzem Schütteln der Platte zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Innerhalb von wenigen Minuten muss nun die Messung der optischen Dichte mit dem ELISA-Mikrotiterplatten-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm erfolgen. (IBL International GmbH, 2012, S. 4)

### *4.2.4 Auswertung der Testergebnisse*

Um die gemessenen Werte der Speichelproben interpretieren zu können, muss mit Hilfe der sechs Standardlösungen eine Standardkurve erstellt werden. Dies funktioniert durch Logarithmieren der vorgegebenen Progesteron-Konzentrationen. Die Log-Konzentrationen wurden mit Hilfe eines statistischen Programms auf der x-Achse gegen die Mittelwerte der jeweiligen Optischen Dichten auf der y-Achse aufgetragen.
Die Progesteronkonzentrationen aus den Proben werden direkt durch Ablesen aus der Standardkurve bestimmt.

Folgende Referenzwerte sind aus dem Benutzerhandbuch des Testkits zu entnehmen:

*Tabelle 3: Referenzwerte von Progesteron aus dem Speichel (IBL International GmbH, 2012, S. 5)*

| **Geschlecht** | **Progesteron (pg/mL)** | | |
|---|---|---|---|
| *Frauen* | prämenopausal | Follikelphase | 28-82 pg/mL |
| | | Lutealphase | 127-446 pg/mL |
| | postmenopausal | 18-51 pg/mL | |
| *Männer* | < 51 pg/mL | | |

Zu beachten ist, dass für die Normalwertstudie insgesamt nur 82 Personen getestet wurden und daher auch knapp außerhalb der Referenzbereiche gemessene Progesteronkonzentrationen als normal angesehen werden können.

### *4.2.5 Statistische Methoden und verwendete Programme*

Zur statistischen Datenverarbeitung sowie für die Korrelationsanalysen wurde primär das Progamm GraphPad Prism ® Version 6.00 von der Firma GraphPad Software, Inc. angewendet. Die zur Auswertung veranschaulichenden Graphen wurden ebenfalls mit Hilfe dieses Programms erstellt. Ansonsten kamen Microsoft Excel ® und das Statistikprogramm InStat ®, ebenfalls vom Unternehmen GraphPad Software, Inc., in Einsatz.

Zum Zeichnen von Strukturen und Reaktionen wurde das Programm Accelrys Draw ® benutzt. Die Software ermöglicht durch entsprechende Zeichenwerkzeuge relativ rasch die Darstellung von chemischen Formeln.

Die Anfertigung der Diplomarbeit wurde mit Microsoft Word ® 2013 durchgeführt. Mittels den zur Verfügung stehenden Tools dieses Programms wurden auch Tabellen und etwaige Abbildungen des theoretischen Teils konzipiert.

#### *4.2.5.1 Auswertung des Fragebogens*

Die durch die ausgefüllten Fragebögen erhaltenen Daten wurden unter Microsoft Excel ® als Tabellenkalkulationsprogramm eingegeben. Schon die Fragen selber wurden so formuliert, dass meist nur zwei Möglichkeiten, wie zum Beispiel ja (positiv) oder nein (negativ), zur Antwort zugelassen waren. Bei der Auswertung konnte dann im Falle einer Zustimmung eine Markierung gesetzt werden, bei einer verneinenden Rückmeldung wurde die Markierung weg gelassen. Informationen über Fitness, Stresssituationen, vergangene Medikamenteneinnahme, Schlaf – und Hautprobleme wurden auf diese Weise erfasst.
Mehrere Auswahlmöglichkeiten gab es zur Beantwortung der Fragen hinsichtlich der Wohngegend sowie über die Art von eingenommenen Hormone.

Das beim Fragebogen abgefragte Geschlecht der TeilnehmerInnen wurde ebenfalls in der Tabellenkalkulation durch Markierung der Spalte „weiblich“ oder „männlich“ einbegriffen.
In den Analysen wurde auch die Ernährung der ProbandInnen miteinbezogen. Dabei gab es im Fragebogen mehrere Einteilungen, je nach Häufigkeit des Fleischkonsums der oder des Einzelnen. In der Auswertung der Fragebögen wurden die Ergebnisse mittels Abkürzungen der jeweiligen Kategorie eingetragen.
Um festzustellen, ob eine Testperson über-, normal- oder untergewichtig ist wurde aus den beiden angegeben Werten Größe und Gewicht der Body Mass Index (BMI) errechnet und in der Tabelle vermerkt. Wie der BMI wurde auch das Alter und Dauer der eingenommenen Hormonpräparate in Form von Zahlen in die Tabellenkalkulation eingetragen.

#### *4.2.5.2 Eliminierung von Ausreißer-Werten*

Um die statistische Auswertung im Rahmen dieser Diplomarbeit zu erleichtern, ist die Anwendung von Ausreißertests sinnvoll. Somit können auch Informationen über die Verlässlichkeit der Speichelmessmethode und den verwendeten Datensatz gewonnen werden. Dazu wurden einerseits der Grubbs-Test, andererseits die ROUT-Methode verwendet. Für die Eliminierung eines oder mehrerer Ausreißer ist es wichtig, dass die Werte einigermaßen normalverteilt vorliegen. Der Unterschied zwischen den beiden genannten Methoden ist, dass der Grubbs-Test dafür ausgelegt wurde lediglich einen Ausreißer herauszufiltern. Wenn tatsächlich nur ein statistischer Ausreißwert vorhanden ist, liefert die ROUT-Methode dagegen häufiger sowohl falsch positive als auch falsch negative Ergebnisse. ROUT wird dann genutzt, wenn mehr als ein Ausreißer, speziell in einem kleinen Datensatz, identifiziert werden sollen. Bis zu 30% der Stichprobenmenge können als Ausreißer detektiert werden.
Höchstens 1 Prozent der Ausreißer dürfen dabei als falsch interpretiert worden sein (Q=1%), sprich zu 99% müssen die heraus gefilterten Werte tatsächlich vor der Analyse eliminiert werden. (GraphPad Software, Inc., 2015)
Mit dem durch Auslese der Ausreißerwerte gewonnen Datensatz können nun statistische Tests durchgeführt werden.

#### *4.2.5.3 Ermittlung der statistischen Signifikanz*

Allgemein bekannt ist, dass sich ein Datensatz unkompliziert in Form eines Mittelwerts repräsentieren lässt. Betrachtet man dabei ausschließlich Daten des weiblichen Geschlechts sind in dem Fall alle Frauen, deren Werte miteinbezogen werden, die Grundgesamtheit. Je mehr von diesen Frauen vorhanden sind, sprich je größer die Fallzahl, desto näher liegt der errechnete Mittelwert am Kollektiv. Wie hoch dabei die Streuung der Werte ist wird durch die Standardabweichung beschrieben. Die Wahrscheinlichkeit, in welchem Bereich Mittelwert und Standardabweichung von der Grundgesamtheit liegen, wird durch das sogenannte Konfidenzintervall ausgedrückt.
Wichtig für die Analyse der Progesteronkonzentrationen und deren Abhängigkeit ist der Unterschied zwischen statistische Messgrößen verschiedener Kollektive. Die Prüfstatistik dient dabei zur Beurteilung, ob vorhandene Unterschiede zufällig oder nicht zufällig vorliegen.
Werte von Stichproben werden hinsichtlich ihrer Grundgesamtheit überprüft. Sollten die Stichprobenmittelwerte der gleichen Population angehören, ist der Mittelwertsunterschied zufällig (Nullhypothese). Wenn aber eine Stichprobe schwerwiegende Abweichungen der Kennzahlen in Bezug auf die statistische Masse aufweist kann nicht mehr von zufällig die Rede sein (Alternativhypothese). Dieser Unterschied ist somit signifikant.
Welche Behauptung richtig ist und, ob die Nullhypothese Verwendung finden soll wird durch verschiedenste statistische Tests entschieden. Für die Auswertung des Progesterontests wird dazu beispielsweise der t-Test nach Student genutzt.
Dieser Beschluss birgt immer das Risiko einer Fehlentscheidung, die in Form der Irrtumswahrscheinlichkeit miteinbezogen wird. Dabei gibt es Grenzen der Irrtumswahrscheinlichkeit, sogenannte Signifikanzniveaus:

- $P \leq 0.05$ signifkant,
- $P \leq 0.01$ sehr signifikant,
- $P \leq 0.001$ höchst signifikant.

Die Mittelwerte zweier annähernd normalverteilte Stichproben werden mittels dem t-Test nach Student auf signifikante Unterschiede untersucht. Die beiden Stichproben sind unabhängig voneinander, da in der Untersuchung ja die Progesteron-konzentrationen zwischen den teilnehmenden ProbandInnen verglichen werden. Es wird somit der ungepaarte t-Test durchgeführt. (Zöfel, 2001, S. 92)

Drei oder mehr unabhängige Stichproben können ebenso mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) verglichen werden. Einerseits ist wieder eine vorhandene Normalverteilung der Werte von Vorteil, andererseits auch eine Varianzhomogenität (Zöfel, 2001, S. 97).

#### *4.2.5.4 Ermittlung von Korrelationen*

Die Beziehung zwischen zwei Variablen kann mit Hilfe eines Korrelationskoeffizienten r beschrieben werden. Dieser kann das Ausmaß sowie die Richtung der Korrelation quantifizieren und liegt zwischen -1 und 1:

*Tabelle 4:Interpretation des Korrelationskoeffzienten r (in Anlehnung an GraphPad Software, Inc., 2015)*

| Korrelationskoeffizient r | Interpretation |
|---|---|
| 1.0 | optimale Korrelation |
| 0 bis 1 | gemeinsame Zu- und Abnahme der zwei Variablen |
| 0.0 | keine Korrelation |
| -1 bis 0 | Zunahme einer Variable bedeutet Abnahme der anderen Variable |
| -1.0 | optimal negative oder inverse Korrelation |

Je weiter der Koeffizient von Null entfernt liegt, desto eher besteht ein Zusammenhang zwischen den Variablen oder desto mehr werden sie von einer anderen Variablen beeinflusst.
GraphPad Prism ® zeigt mit der Irrtumswarscheinlich P, ob tatsächlich oder nur zufällig eine Korrelation vorliegt. Mit einem sehr kleinen P-Wert ist gesichert, dass es sich nicht um einen zufälligen Zusammenhang handelt.
Die Korrelationsanalyse quantifiziert allerdings ausschließlich, ob sich eine Variable bei Zu-oder Abnahme einer anderen ändert. Mit dem Programm Graph Pad Prism ® hat man zwei Möglichkeiten Korrelationenkoeffizienten zu berechnen: zum einen nach Pearson, zum anderen mittels der Spearman-Methode. Bei Anwendung der Pearson-Korrelation sollten die Variablen X und Y annähernd normalverteilt vorliegen. Wenn jedoch große Datensätze vorliegen, stellt dies nicht unbedingt eine Voraussetzung dar.

Die vorliegende Verteilung der Werte ist bei der parameterfreien Spearman-Korrelation nicht wichtig. (GraphPad Software, Inc., 2015)

Graphisch kann die Abhängigkeit von zwei Variablen mit Hilfe der linearen Regression wieder gegeben werden. Dabei wird eine Gerade aufgestellt. Diese ermöglicht die Voraussage eines Wertes Y durch Ablesen von X. (GraphPad Software, Inc., 2015)

# 5 Ergebnisse

Die 77 ProbandInnen wurden im Zuge der Auswertung in vier Kollektive unterteilt:

- Frauen, die hormonell verhüten,
- Frauen, die sich laut Progesteronmessung in der Follikelphase befinden,
- Frauen, die sich laut Progesteronmessung in der Lutealphase befinden und
- Männer.

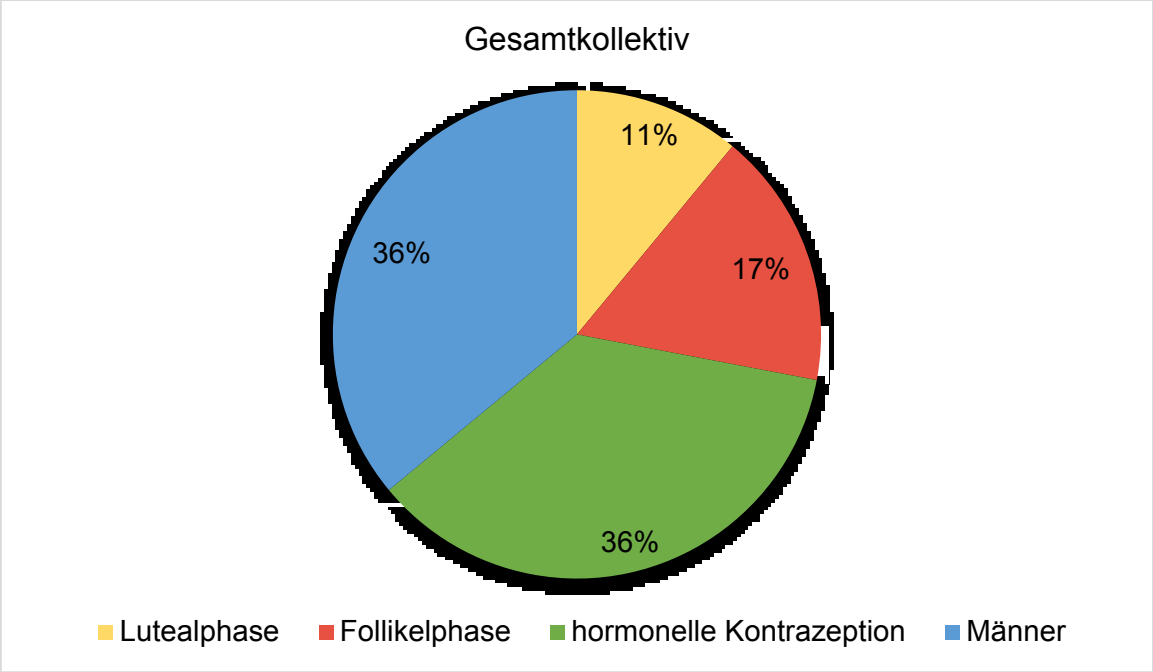


*Abbildung 13: Zusammensetzung des Gesamtkollektivs*

Im Kollektiv der hormonell verhütenden Teilnehmerinnen wurde die Art des Hormonpräparates zunächst nicht miteinbezogen. Somit befinden sich in dieser Gruppe sowohl Frauen, die nur Gestagene einnehmen, als auch Probandinnen mit Kombinationspillen. Schilddrüsenhormone wurden vorerst ebenfalls nicht beim Einteilen der Frauen in die einzelnen Kollektive berücksichtigt. In einem späteren Auswertungsschritt ist dann der Progesteronspiegel bei Frauen mit Hormoneinnahme in Abhängigkeit vom Hormontyp betrachtet worden.

Die Kollektive wurden fürs Erste hinsichtlich ihrem Hormonspiegel direkt miteinander verglichen. Im Anschluss sind die einzelnen Gruppen, je nach Fragebogen-Auswertung, sortiert worden, um Korrelationen innerhalb der einzelnen Kollektive feststellen zu können.

## 5.1 Vergleich der einzelnen Kollektive

Zu Beginn wurden die Geschlechter gegenübergestellt. Die drei Kollektive der Frauen, sprich alle Probandinnen der Untersuchung, sind dabei zu einer großen Gruppe zusammengefasst worden.

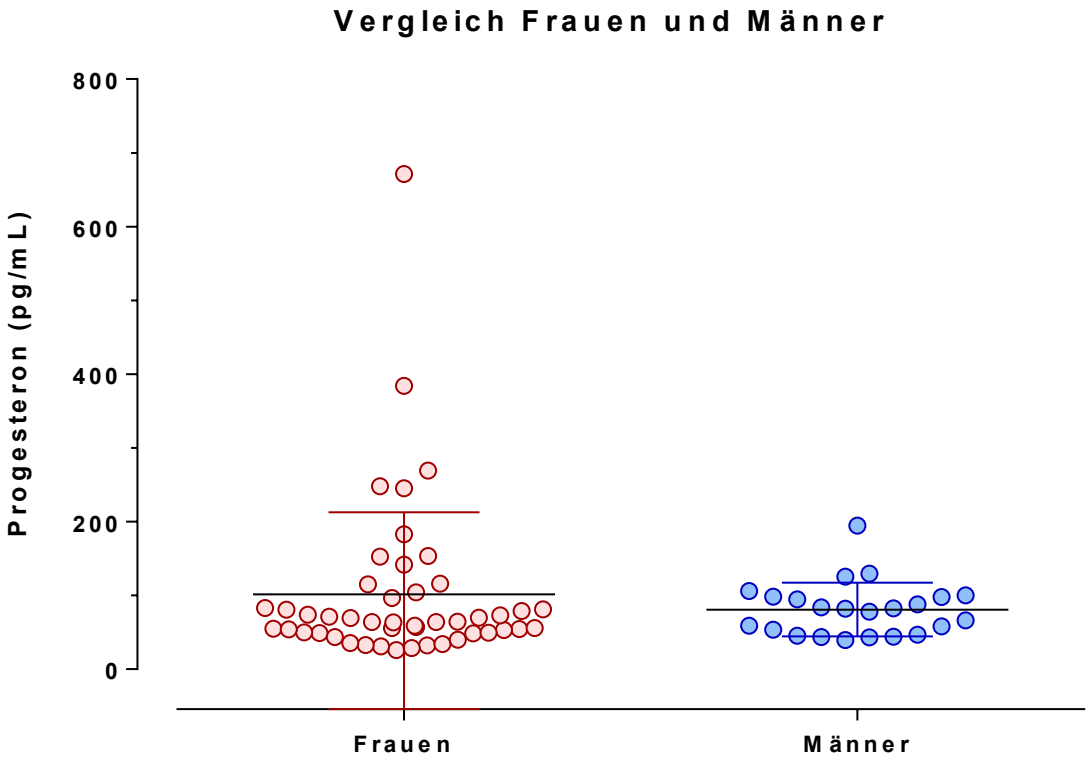


*Abbildung 14: Vergleich Frauen und Männer*

*Tabelle 5: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 14*

| | |
|---|---|
| Column B | Männer |
| vs. | vs, |
| Column A | Frauen |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,3951 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0,8557 df=68 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 101,3 ± 16,24, n=47 |
| Mean ± SEM of column B | 80,90 ± 7,619, n=23 |
| Difference between means | -20,44 ± 23,89 |

| | |
|---|---|
| 95% confidence interval | -68,12 to 27,23 |
| R squared | 0,01065 |

Aus der Beilage des Testkits ist zu entnehmen, dass Männer eine ähnliche Progesteronkonzentration im Speichel wie Frauen in der frühen Follikelphase besitzen (IBL International GmbH, 2012, S. 5). Die physiologische Rolle des Progesterons beim männlichen Geschlecht ist noch nicht aufgeklärt. Vermutungen, dass das weibliche Sexualhormon möglicherweise die männliche Libido beeinflusst, müssen erst genauer untersucht werden (Kozloski et al., 2014, S. 216).

Wie aus Abbildung 14 beziehungsweise aus den dazu gehörigen statistischen Parametern ersichtlich ist, besteht zwischen den Messwerten von Frauen und Männern mit P=0.3951 kein Unterschied mit statistischer Signifkanz. Der größte Teil der gemessenen männlichen Testpersonen zeigte deutlich höhere Mengen an Progesteron als in der Normwerttabelle der Kit-Anleitung angegeben. Mögliche Ursachen dafür werden später noch erläutert.

Die große Spannweite der Frauenwerte ergibt sich aus den verschiedenen Zyklusstatus der Probandinnen ohne hormoneller Verhütung. Aus diesem Grund wurden weitere Kollektive gebildet, die Zyklusphase und Hormoneinnahme berücksichtigen. Bei Betrachtung der Messergebnisse von Teilnehmerinnen, die sich in einem normalen Menstruationszyklus befinden, war es möglich anhand des Progesteronspiegels im Speichel deren Zyklusphase festzustellen.

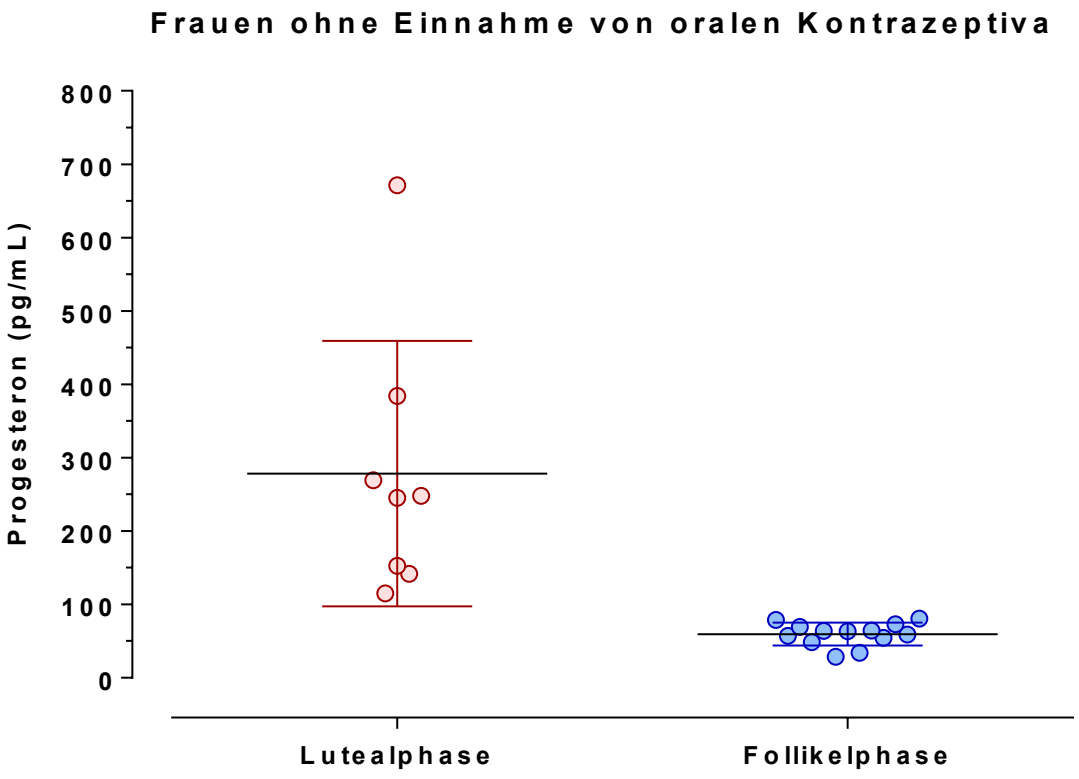


*Abbildung 15: Vergleich Frauen in der Luteal- und Follikelphase*

*Tabelle 6: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 15*

| | |
|---|---|
| Column B | Follikelphase |
| vs. | vs, |
| Column A | Lutealphase |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,0003 |
| P value summary | *** |
| Significantly different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=4,409 df=19 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 278,5 ± 63,92, n=8 |
| Mean ± SEM of column B | 59,67 ± 4,309, n=13 |
| Difference between means | -218,8 ± 49,62 |
| 95% confidence interval | -322,6 to -114,9 |
| R squared | 0,5057 |

Die Irrtumswahrscheinlichkeit P beträgt bei dieser Gegenüberstellung ≤0.05. Dass Frauen nach dem Eisprung signifikant höhere Progesteronkonzentrationen aufweisen als in der Follikelphase ist somit deutlich ersichtlich.

Hormonelle Verhütung führt, unabhängig davon welche Präparate eingenommen werden, zur Ovulationshemmung. Daher kann angenommen werden, dass die Werte

bei Frauen mit hormoneller Kontrazeption den Speichelkonzentrationen von Teilnehmerinnen in der Follikelphase ähneln.

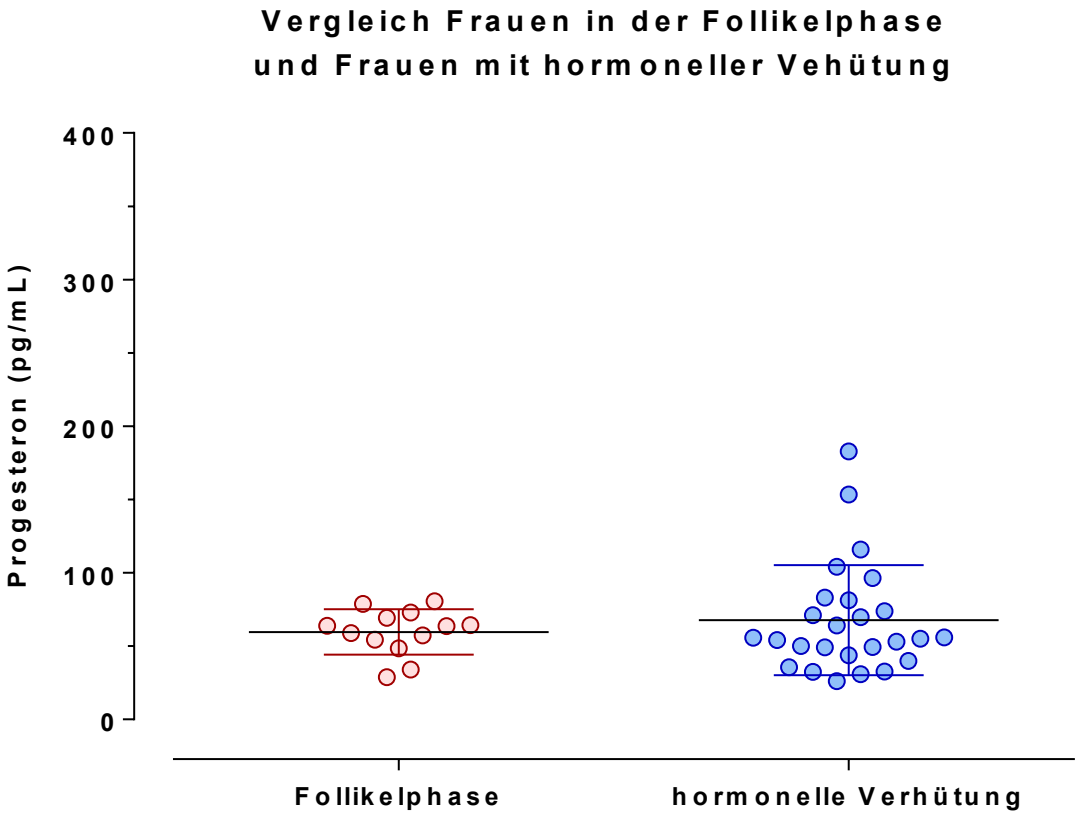


*Abbildung 16: Vergleich Frauen in der Follikelphase oder OC-Einnahme*

*Tabelle 7: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 16*

| | |
|---|---|
| Column B | OC |
| vs. | vs, |
| Column A | Follikelphase |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,4675 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0,7341 df=37 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 59,67 ± 4,309, n=13 |
| Mean ± SEM of column B | 67,69 ± 7,373, n=26 |
| Difference between means | 8,015 ± 10,92 |
| 95% confidence interval | -14,11 to 30,14 |
| R squared | 0,01435 |

Dieser Vergleich bestätigt die vorher gesetzte Annahme: Testteilnehmerinnen, die sich in der ersten Zyklusphase (Follikelphase) befinden, besitzen Progesteronwerte im Bereich von hormonell verhütenden Frauen. Der Unterschied ist somit nicht signifikant.

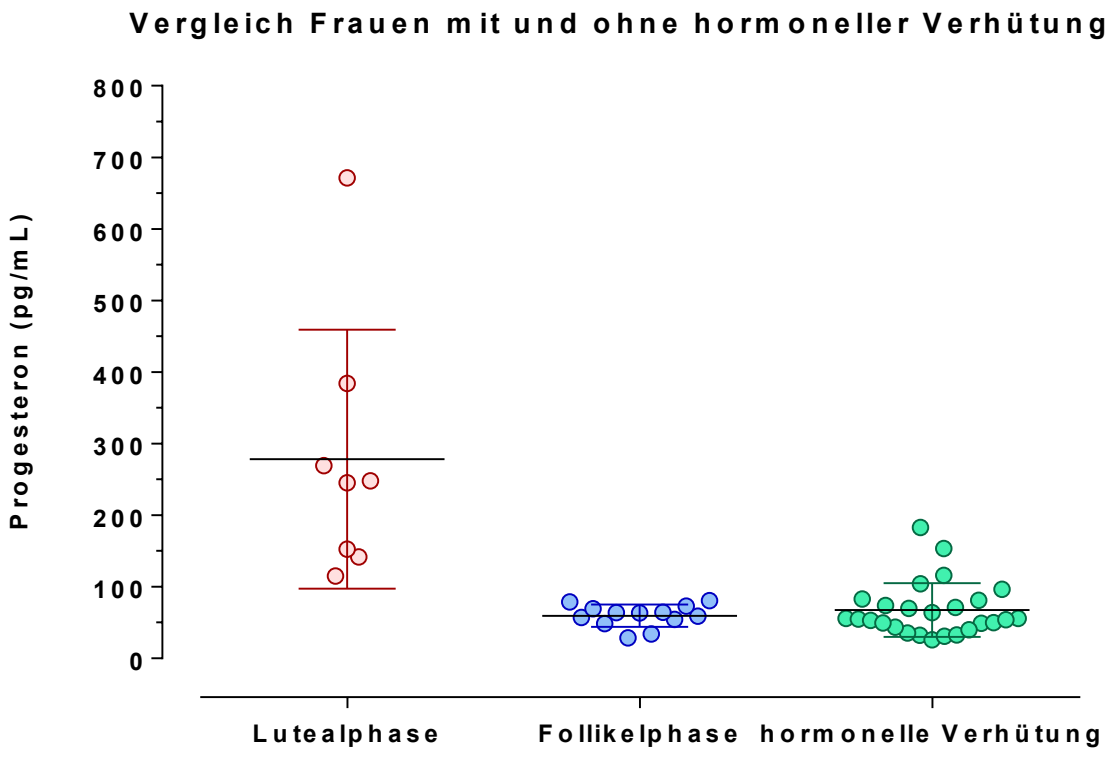


*Abbildung 17: Vergleich Frauen mit und ohne hormoneller Verhütung*

*Tabelle 8: Resultat ANOVA zu Abbildung 15*

| | |
|---|---|
| ANOVA summary | |
| F | 26,31 |
| P value | < 0,0001 |
| P value summary | **** |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | Yes |
| R square | 0,5503 |
| Brown-Forsythe test | |
| F (DFn, DFd) | 9,329 (2,43) |
| P value | 0,0004 |
| P value summary | *** |
| Significantly different standard deviations? (P < 0.05) | Yes |
| Bartlett's test | |
| Bartlett's statistic (corrected) | 68,67 |
| P value | < 0,0001 |
| P value summary | **** |
| Significantly different standard deviations? (P < 0.05) | Yes |
| ANOVA table | SS |

| | |
|---|---|
| Treatment (between columns) | 309972 |
| Residual (within columns) | 253274 |
| Total | 563246 |
| DF MS F (DFn, DFd)P value<br>2 154986 F (2, 43) = 26,31 P < 0,0001<br>43 5890<br>45 | |
| Data summary | |
| Number of treatments (columns) | 3 |
| Number of values (total) | 46 |

Durch Varianzanalyse der drei Kollektive „Frauen in der Lutealphase“, „Frauen in der Follikelphase“ und „Frauen mit hormoneller Verhütung“ sind statistisch deutliche Unterschiede im Progesteronspiegel dargelegt worden.

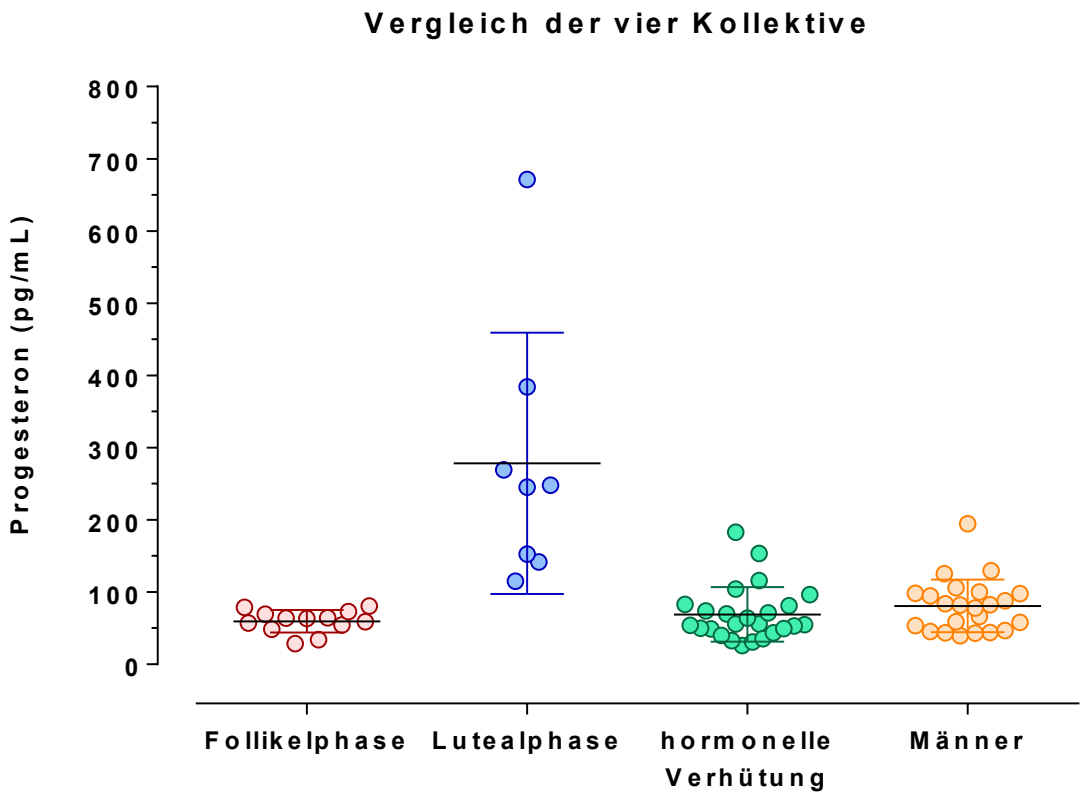


*Abbildung 18: Vergleich Gesamtkollekiv*

*Tabelle 9: Resultat ANOVA zu Abbildung 18*

| | |
|---|---|
| ANOVA summary | |
| F | 22,97 |
| P value | < 0,0001 |
| P value summary | **** |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | Yes |

| | |
|---|---|
| R square | 0,5107 |
| Brown-Forsythe test | |
| F (DFn, DFd) | 8,091(3,66) |
| P value | 0,0001 |
| P value summary | *** |
| Significantly different standard deviations? (P < 0.05) | Yes |
| Bartlett's test | |
| Bartlett's statistic (corrected) | 74,33 |
| P value | < 0,0001 |
| P value summary | **** |
| Significantly different standard deviations? (P < 0.05) | Yes |
| ANOVA table | SS |
| Treatment (between columns) | 309428 |
| Residual (within columns) | 296419 |
| Total | 605848 |
| DF MS F (DFn, DFd)P value<br>3 103143 F (3, 66) = 22,97 P < 0,0001<br>66 4491<br>69<br>Data summary | |
| Number of treatments (columns) | 4 |
| Number of values (total) | 70 |

Der Vergleich aller vier Kollektive zeigt, mit P < 0.0001 (höchst signifikant), verschiedene Progesteronspiegel bei der Quantifizierungsanalyse aus dem Speichel. Alle Frauen in der Follikelphase befinden sich innerhalb des Referenzbereiches von 28-82 pg/mL (IBL International GmbH, 2012, S. 5). Die Progesteronmenge im Speichel liegt in der zweiten Zyklusphase ungefähr zwischen 115 pg/mL in der frühen bis 671 pg/mL in der späteren Lutealphase. Acht Tage nach der Ovulation erreicht der Progesteronspiegel normalerweise Spitzenwerte, die anschließend, bei nicht erfolgter Befruchtung der Eizelle, wieder sinken (Aktories et al., 2009, S. 701). Das Kollektiv der Frauen mit hormoneller Kontrazeption weist teilweise unerwartet hohe Hormonkonzentrationen auf. Der größte Teil der Messwerte liegt jedoch schon im unteren Segment des Gesamtkollektivs. Beim männlichen Geschlecht gab es zwischen den einzelnen Speichelproben große Unterschiede. Warum die Ergebnisse so weit auseinander liegen und weshalb viele von diesen vom angegeben Progesteronwert in der Normwerttabelle des Testkits abweichen, muss noch genauer begutachtet werden.

## 5.2 Einfluss durch Einnahme von Hormonpräparaten

Zuvor wurde bereits erklärt, dass hormonell verhütende Frauen Progesteronspiegel im Bereich der Referenzwerte von Damen in der Follikelphase besitzen. Ob die Zusammensetzung oder die Einnahmedauer der Hormonpräparate großen Einfluss auf die Progesteronmenge im Speichel hat, wird nun abgeklärt.

Die orale Einnahme von Hormonen gilt, vor allem bei jungen Frauen, als die mit Abstand beliebteste Verhütungsmethode (Fiala & Schweiger, 2015, S. 16). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die am Versuch teilnehmenden verhütenden Frauen hauptsächlich Mikro- oder Minipillen zur Kontrazeption nutzen. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass auch weibliche Testpersonen eingerechnet werden, deren hormonelle Verhütung auf lokaler Freisetzung basiert, wie es beispielsweise bei der Hormonspirale der Fall ist.

Vorerst werden Probandinnen ohne Hormongebrauch und Frauen mit Hormoneinnahme gegenübergestellt. Zu letzterer Gruppe zählen auch Schilddrüsenhormone, unabhängig davon, ob die Testperson zusätzlich noch hormonell verhütet.

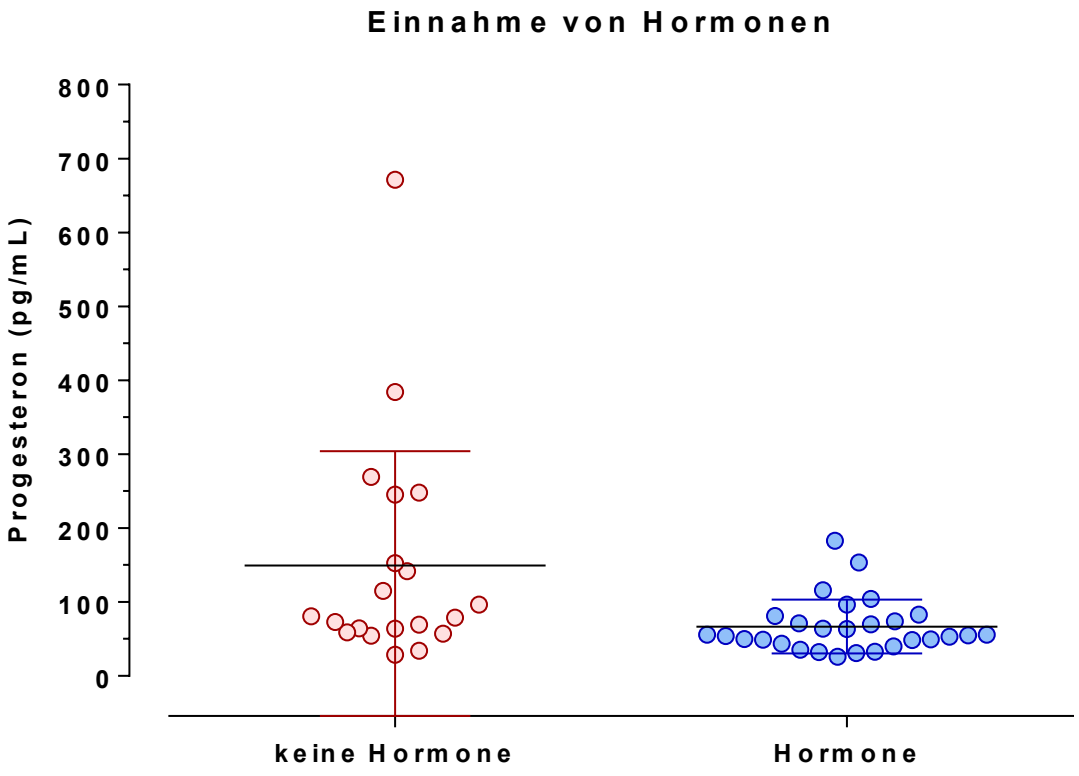


*Abbildung 19: Vergleich Frauen mit oder ohne Einnahme von Hormonen*

*Tabelle 10: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 19*

| | |
|---|---|
| Column B | Hormone |
| vs. | vs, |
| Column A | keine Hormone |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,0090 |
| P value summary | ** |
| Significantly different? (P < 0.05) | Yes |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=2,729 df=46 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 149,4 ± 34,60, n=20 |
| Mean ± SEM of column B | 66,86 ± 6,872, n=28 |
| Difference between means | -82,52 ± 30,24 |
| 95% confidence interval | -143,4 to -21,66 |
| R squared | 0,1394 |

Signifikant höhere Werte (P=0.009) sind bei Frauen ohne Hormoneinnahme zu sehen. Dies ist wiederum durch die Progesteronzunahme in der zweiten Zyklusphase zu erklären.

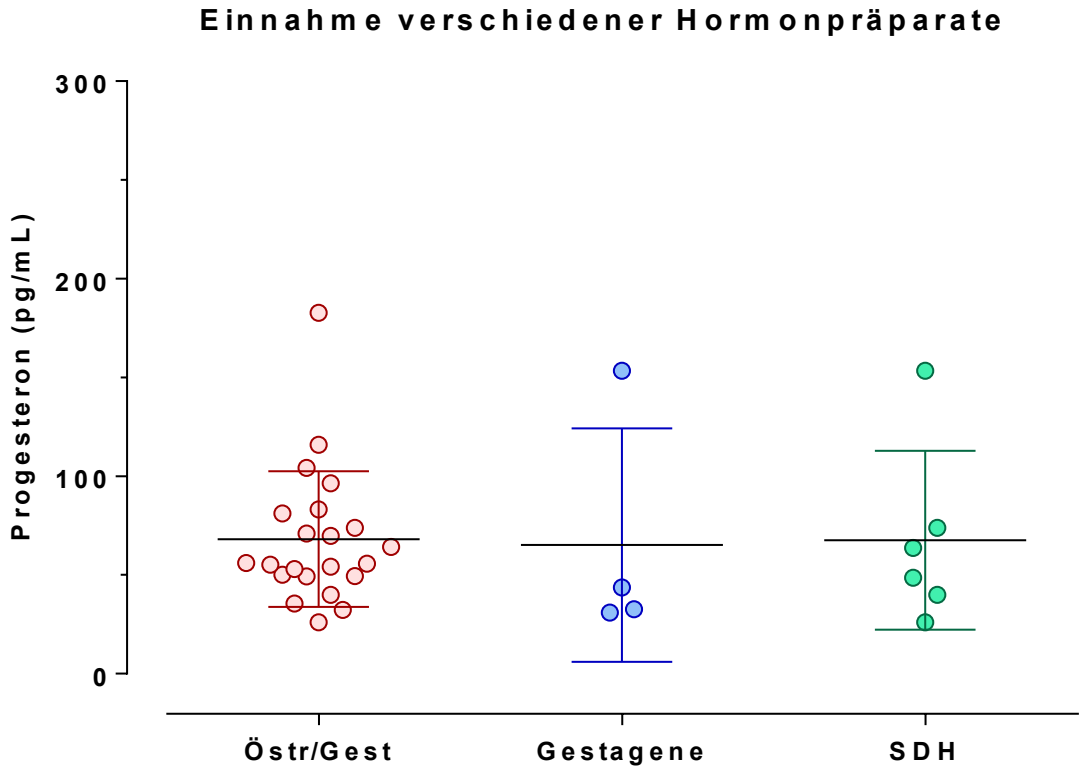


*Abbildung 20: Vergleich verschiedener Hormonpräparate*

*Tabelle 11: Resultat ANOVA zu Abbildung 20*

| | |
|---|---|
| ANOVA summary | |
| F | 0,009497 |
| P value | 0,9906 |
| P value summary | ns |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | No |
| R square | 0,0006545 |
| Brown-Forsythe test | |
| F (DFn, DFd) | 0,24(2,29) |
| P value | 0,7907 |
| P value summary | ns |
| Significantly different standard deviations? (P < 0.05) | No |
| Bartlett's test | |
| Bartlett's statistic (corrected) | 2,062 |
| P value | 0,3566 |
| P value summary | ns |
| Significantly different standard deviations? (P < 0.05) | No |
| ANOVA table | SS |
| Treatment (between columns) | 29,86 |
| Residual (within columns) | 45588 |
| Total | 45618 |
| DF MS F (DFn, DFd)P value<br>2 14,93 F (2, 29) = 0,009497 P = 0,9906<br>29 1572<br>31 | |
| Data summary | |
| Number of treatments (columns) | 3 |
| Number of values (total) | 32 |

Zwischen weiblichen Testpersonen, die Hormonpräparate einnehmen, liegen keine unterschiedlichen Progesteronmesswerte vor. Wenn Frauen sowohl hormonelle Kontrazeptiva, als auch Schilddrüsenhormone am Fragebogen angekreuzt haben, sind deren Werte auch in beiden Kategorien vertreten.

Ob Schilddrüsenhormone Einfluss auf die Höhe des Progesteronspiegels im Speichel haben, ist hinsichtlich der folgenden Abbildung fraglich.

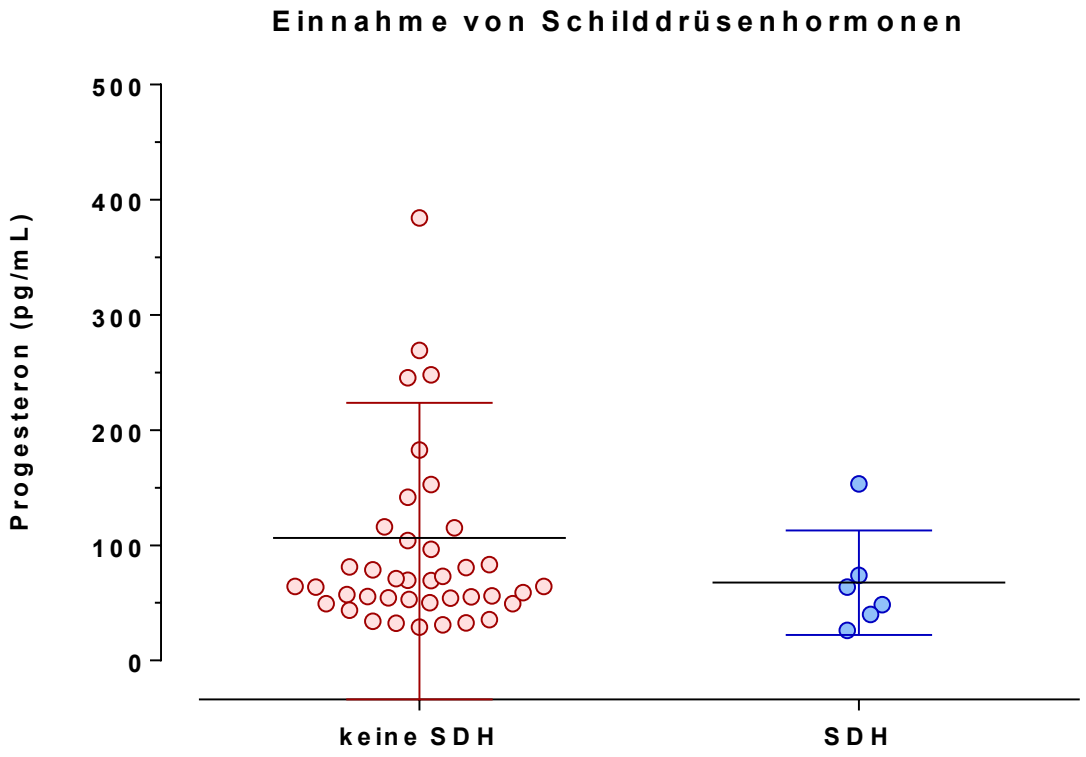


*Abbildung 21: Vergleich Frauen mit und ohne Einnahme von Schilddrüsenhormonen*

*Tabelle 12: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 21*

| | |
|---|---|
| Column B | SDH |
| vs. | vs, |
| Column A | keine SDH |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,4324 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0,7922 df=45 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 106,3 ± 18,34, n=41 |
| Mean ± SEM of column B | 67,59 ± 18,51, n=6 |
| Difference between means | -38,70 ± 48,86 |
| 95% confidence interval | -137,1 to 59,70 |
| R squared | 0,01375 |

Die Konzentration des Gelbkörperhormons bei Frauen, die aufgrund einer Störung der Schilddrüsenfunktion entsprechende Hormone substituieren müssen, unterscheidet sich nicht wesentlich von den restlichen weiblichen Testpersonen (P=0.4324). Deren

Speichelgehalt von Progesteron ist, wie bei allen Probandinnen, abhängig von Zyklusphase oder hormonellen Verhütungsmitteln.

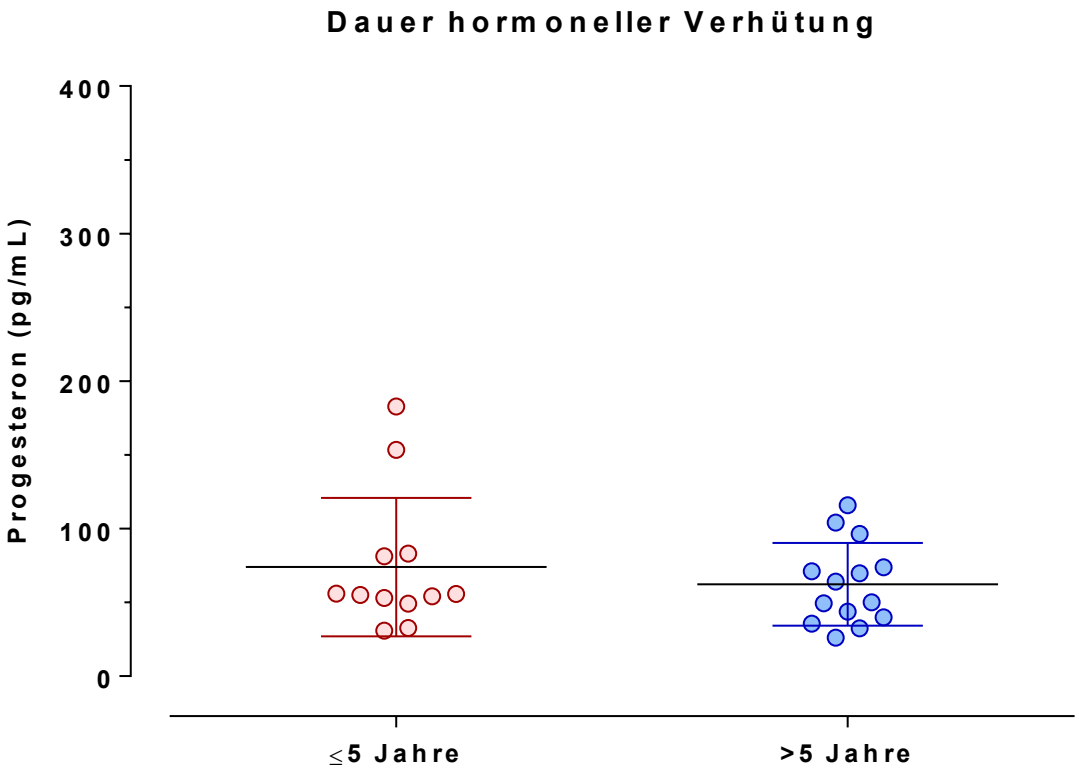


*Abbildung 22: Dauer der hormonellen Verhütung*

*Tabelle 13: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 22*

| | |
|---|---|
| Column B | >5 Jahre |
| vs. | vs, |
| Column A | ≤5 Jahre |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,4430 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0,7800 df=24 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 73,95 ± 13,57, n=12 |
| Mean ± SEM of column B | 62,32 ± 7,472, n=14 |
| Difference between means | -11,63 ± 14,91 |
| 95% confidence interval | -42,40 to 19,14 |
| R squared | 0,02472 |

Mit einem P-Wert von 0.4430 (P>0.05) hat auch die Dauer der Hormoneinnahme zur Verhütung keinen bedeutenden Einfluss auf den Progesteronwert. Erwähnenswert ist,

dass die höchst gelegene Konzentration aus Abbildung 22 bei einer Probandin, die erst drei Monate vor der Probennahme die Hormoneinnahme startete, gemessen wurde. Alle anderen Frauen in diesem Kollektiv verhüten schon mindestens eineinhalb Jahre mittels Steroidhormone.

## 5.3 Einfluss des Alters auf den Progesteronspiegel

Im Laufe des Alters kommt es beim Mensch zu hormonellen Veränderungen und somit nimmt auch die Progesteronkonzentration im Speichel ab. Mit oftmals ausbleibenden Eisprung bei prämenopausalen Frauen sinkt die Progesteronsynthese relativ schnell und es kommt zu Mangelerscheinungen. Die einzelnen Kollektive wurden hinsichtlich des Alters in zwei Gruppen eingeteilt: < 25 Jahre und ≥ 25 Jahre. Da keine der getesteten Frauen bereits die Menopause erreicht hat, gibt es in den beiden Alterskategorien keine statistisch signifkanten Unterschiede. Die untersuchten Speichelproben der teilnehmenden Männer wurden ebenso nicht erheblich durch das Alter beeinflusst.

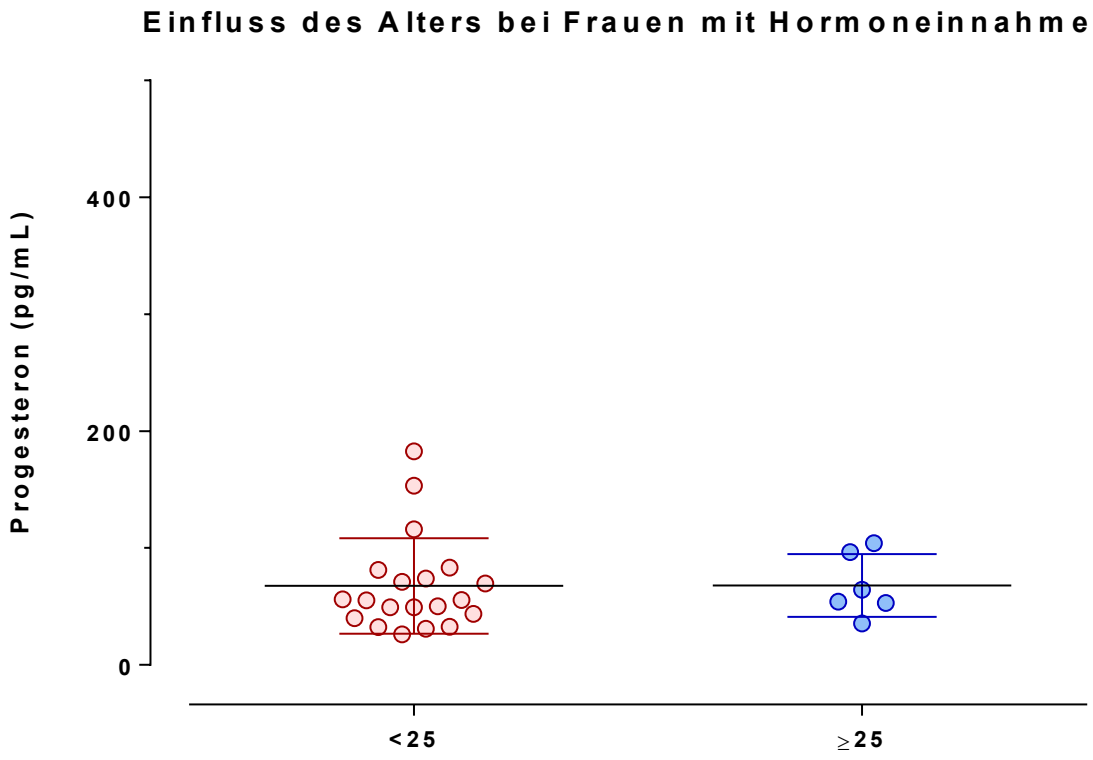


*Abbildung 23: Einfluss des Alters bei Frauen mit Hormoneinnahme zur Kontrazeption*

*Tabelle 14: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 23*

| | |
|---|---|
| Column B | >25 |
| vs. | vs, |
| Column A | ≤25 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,9859 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0,01780 df=24 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 67,62 ± 9,139, n=20 |
| Mean ± SEM of column B | 67,93 ± 10,96, n=6 |
| Difference between means | 0,3180 ± 17,86 |
| 95% confidence interval | -36,54 to 37,18 |
| R squared | 1,321e-005 |

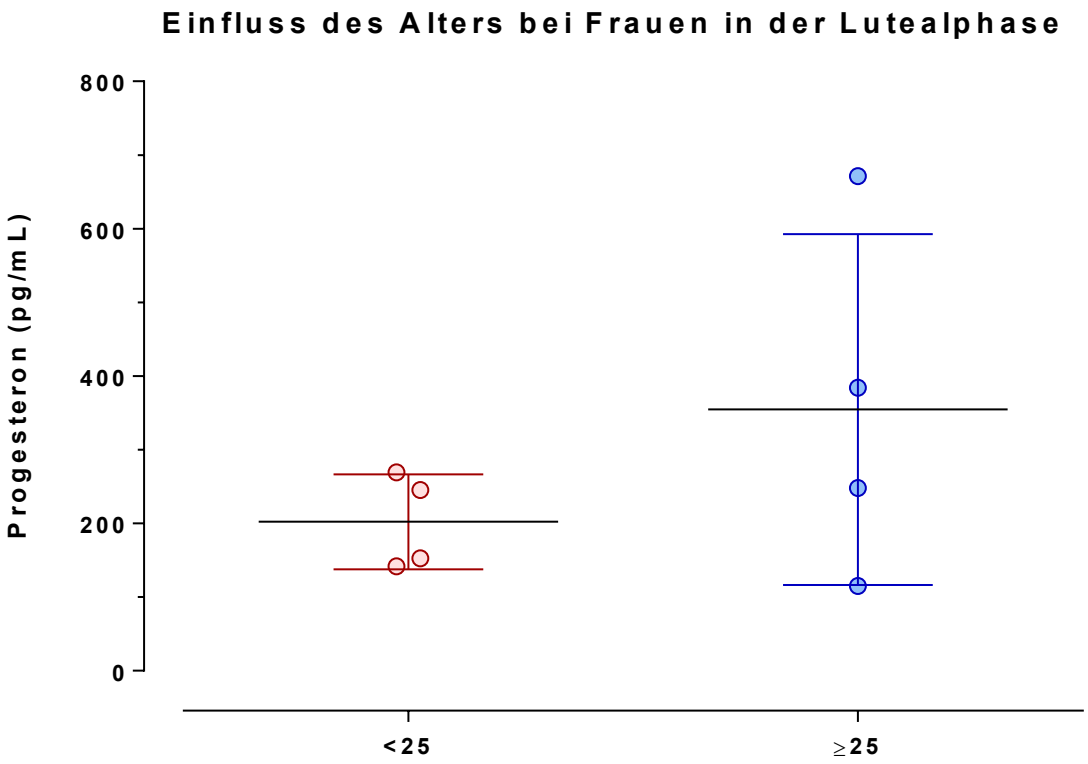


*Abbildung 24: Einfluss des Alters bei Frauen in der Lutealphase*

*Tabelle 15: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 24*

| | |
|---|---|
| Column B | >25 |
| vs. | vs, |
| Column A | <25 |

| | |
|---|---|
| Unpaired t test | |
| P value | 0,2629 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=1,235 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 202,3 ± 32,24, n=4 |
| Mean ± SEM of column B | 354,6 ± 119,0, n=4 |
| Difference between means | 152,3 ± 123,3 |
| 95% confidence interval | -149,4 to 454,0 |
| R squared | 0,2028 |

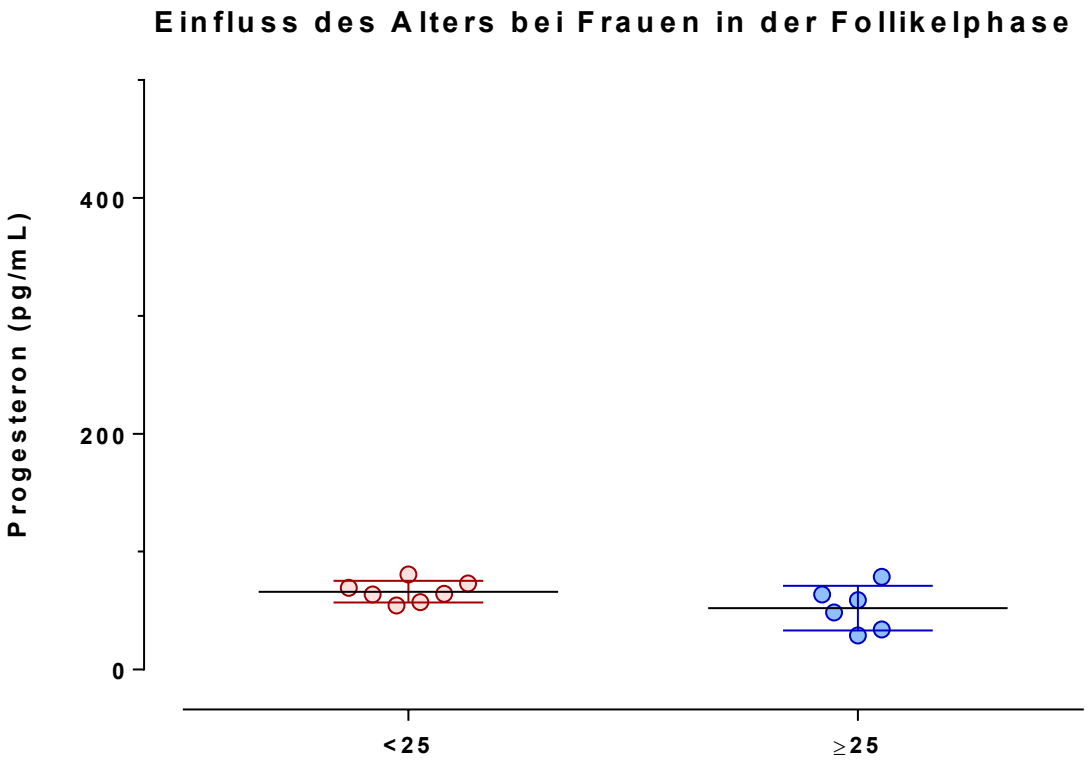


*Abbildung 25: Einfluss des Alters bei Frauen in der Follikelphase*

*Tabelle 16: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 25*

| | |
|---|---|
| Column B | >25 |
| vs. | vs, |
| Column A | ≤25 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,1087 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |

| | |
|---|---|
| t, df | t=1,746 df=11 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 66,11 ± 3,432, n=7 |
| Mean ± SEM of column B | 52,16 ± 7,689, n=6 |
| Difference between means | -13,95 ± 7,989 |
| 95% confidence interval | -31,53 to 3,637 |
| R squared | 0,2170 |

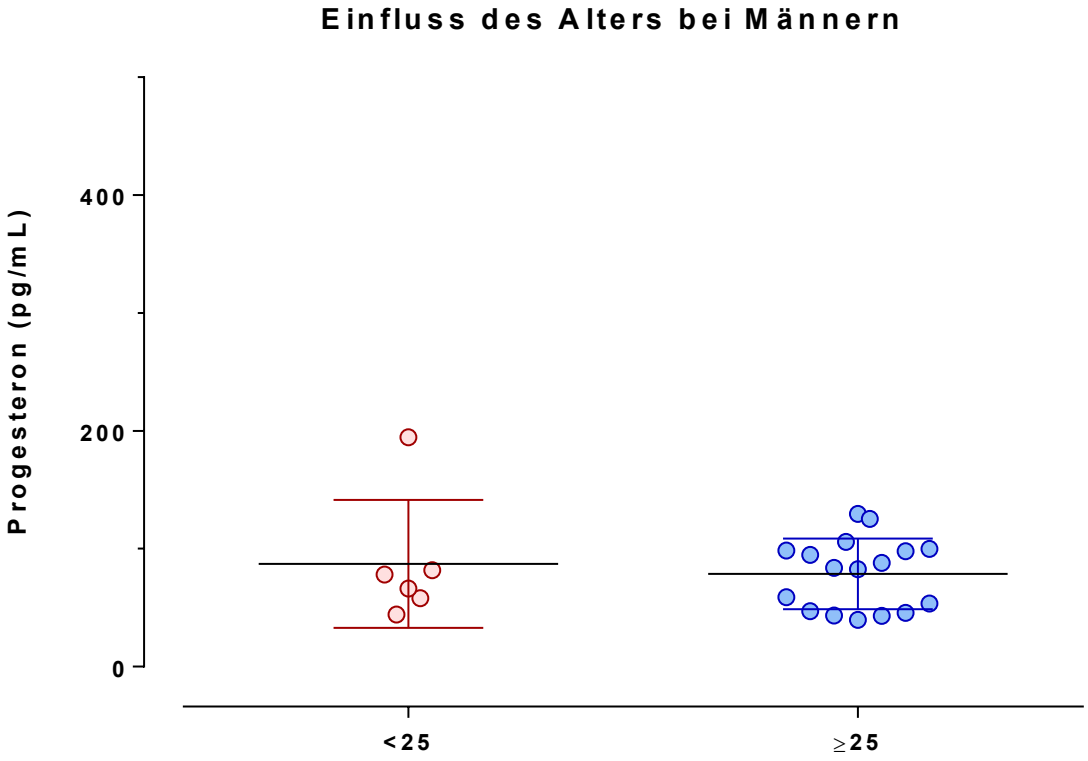


*Abbildung 26: Einfluss des Alters bei Männern*

*Tabelle 17: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 26*

| | |
|---|---|
| Column B | ≥25 |
| vs. | vs, |
| Column A | <25 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,1651 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=1,428 df=26 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 545,8 ± 328,4, n=9 |
| Mean ± SEM of column B | 176,6 ± 91,22, n=19 |
| Difference between means | -369,3 ± 258,5 |
| 95% confidence interval | -900,6 to 162,1 |

| | |
|---|---|
| R squared | 0,07276 |

## 5.4 Einfluss von Sport und Gewicht auf den Progesterongehalt

Wie im Kapitel 1.4 bereits erklärt wurde kann Progesteron auch metabolische Vorgänge im Organismus regulieren. Der Proteinstoffwechsel wird sowohl in Ruhe, als auch bei körperlicher Anstrengung beeinflusst. Aus diesem Grund ist während der Lutealphase auch ein erhöhter Metabolismus von Proteinen zu finden. Progesteron und andere Sexualhormone, wie beispielsweise Estradiol und Testosteron, rufen je nach Zyklusstatus unterschiedliche Trainingsresultate hervor. Frauen in der Follikelphase können durch die anabole Wirkung von Testosteron und Estrogenen effektiveres Krafttraining ausführen als Sportlerinnen in der Lutealphase. Hier überwiegt der katabole Einfluss vom natürlichen Gestagen. (Sung et al., 2014, S. 6-9)

Dass körperliche Aktivität generell einen wichtigen Beitrag zu Gesundheit und Wohlbefinden darstellt, ist bekannt. Auch endokrinologische Mechanismen sind nachweislich durch Sport beeinflussbar. Laut Literatur kann hochintensives Training auf Dauer jedoch zu Amenorrhoe, Oligomenorrhoe, Luteal-Phase-Defizienz und Anovulation führen. Grund dafür scheint zu sein, dass vor allem in Kombination mit Kalorienmangel das Hypothalamus-Hypophysensystem durch extreme körperliche Aktivität gestört wird. Die Freisetzung von GnRH und in weiterer Folge von LH und FSH ist demnach beeinträchtigt. Moderateres Training durchschnittlicher Intensität beeinflusst allerdings nicht das weibliche Reproduktionssystem. (Ahrens et al., 2014, S. 127-132)

Um herauszufinden, ob innerhalb der vier Kollektive Zusammenhänge zwischen dem Progesterongehalt im Speichel und sportlicher Betätigung vorliegen, wurde jedes Kollektiv einzeln betrachtet.

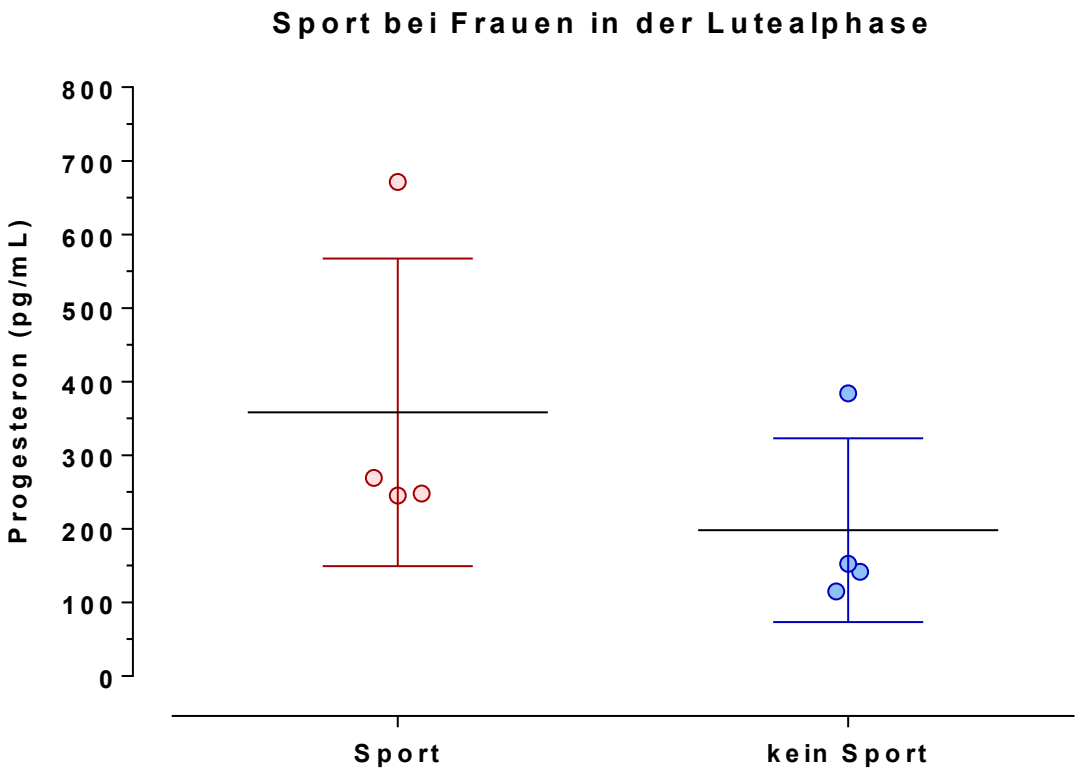


*Abbildung 27: Sport bei Frauen in der Lutealphase*

*Tabelle 18: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 27*

| | |
|---|---|
| Column B | kein Sport |
| vs. | vs, |
| Column A | Sport |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,2363 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=1,316 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 358,5 ± 104,4, n=4 |
| Mean ± SEM of column B | 198,4 ± 62,42, n=4 |
| Difference between means | -160,1 ± 121,6 |
| 95% confidence interval | -457,7 to 137,6 |
| R squared | 0,2239 |

Keine Signfikanz ist im Kollektiv der Frauen in der Lutealphase beim Vergleich von Sport- und nicht Sport -betreibenden Probandinnen festgestellt worden. Allerdings ist aus Abbildung 27 zu entnehmen, dass der Mittelwert der Sportlerinnen höher liegt als das Teilkollektiv mit den Frauen, die sich nicht regelmäßig körperlich betätigen.

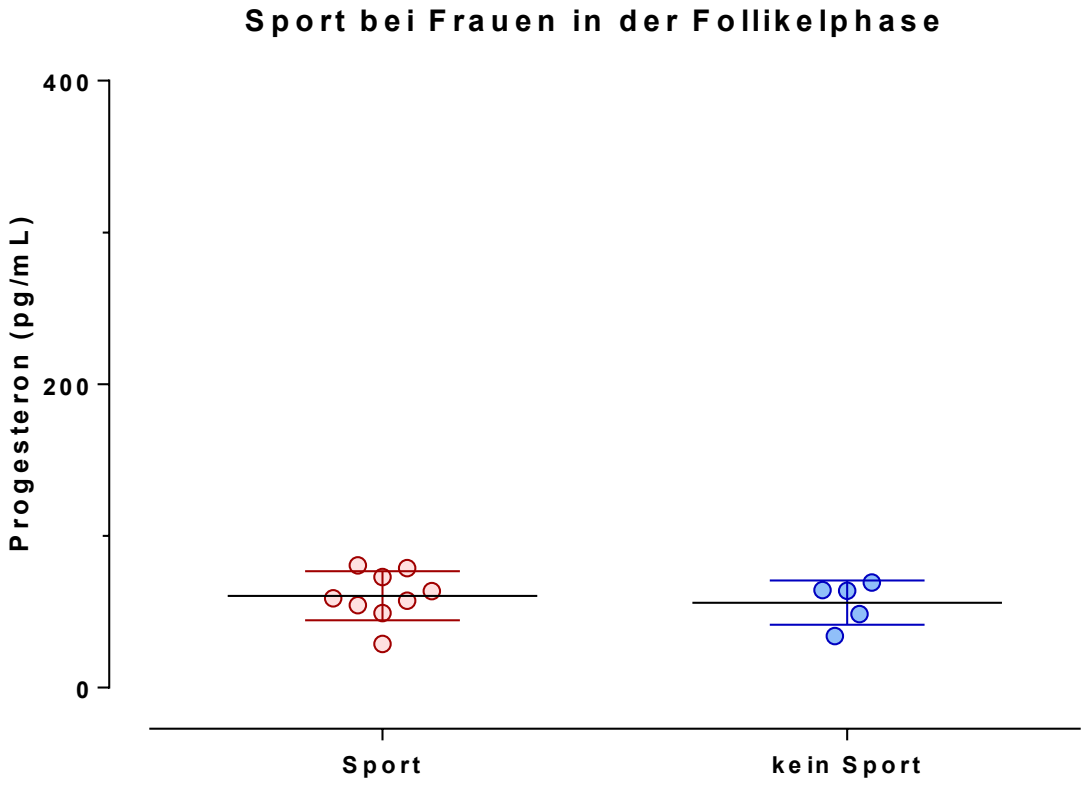


*Abbildung 28: Sport bei Frauen in der Follikelphase*

*Tabelle 19: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 28*

| | |
|---|---|
| Column B | kein Sport |
| vs. | vs, |
| Column A | Sport |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,6158 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0,5152 df=12 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 60,53 ± 5,384, n=9 |
| Mean ± SEM of column B | 56,04 ± 6,503, n=5 |
| Difference between means | -4,492 ± 8,719 |
| 95% confidence interval | -23,49 to 14,51 |
| R squared | 0,02164 |

P beträgt in diesem Vergleich 0.6158. Daher kann kein Unterschied des Gelbkörperhormongehalts im Speichel zwischen sportlichen und unsportlichen Test-Teilnehmerinnen aufgedeckt werden.

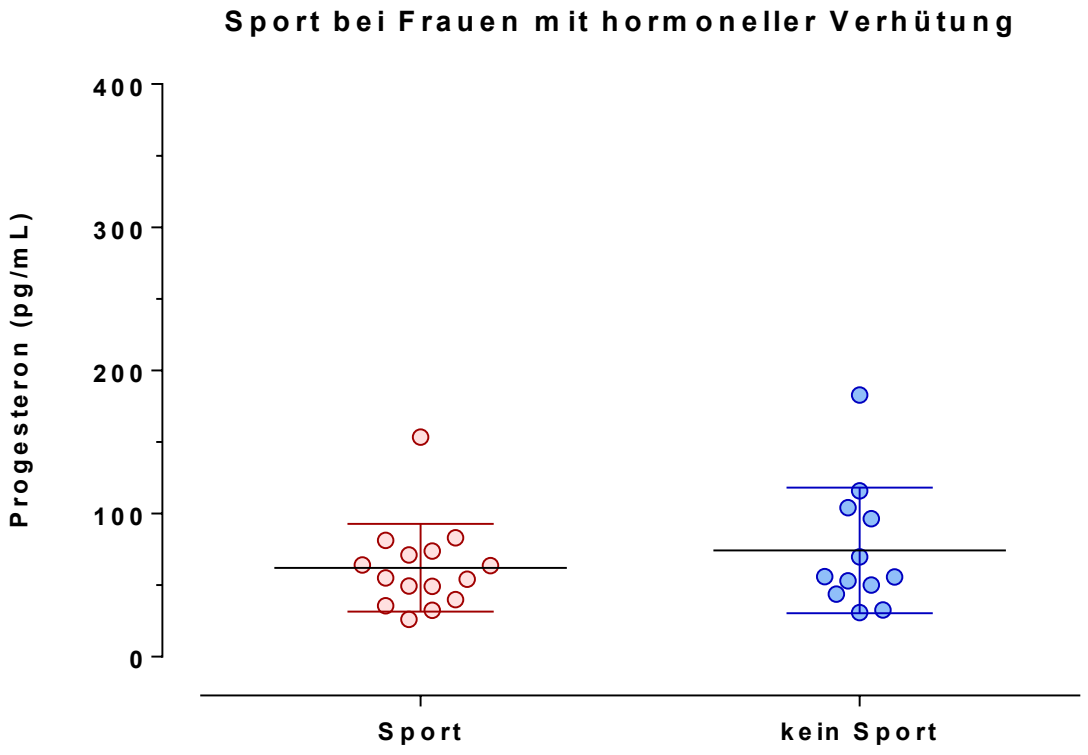


*Abbildung 29: Sport bei Frauen mit hormoneller Verhütung*

*Tabelle 20: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 29*

| | |
|---|---|
| Column B | kein Sport |
| vs. | vs, |
| Column A | Sport |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,4073 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0,8428 df=25 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 62,16 ± 7,927, n=15 |
| Mean ± SEM of column B | 74,26 ± 12,67, n=12 |
| Difference between means | 12,10 ± 14,36 |
| 95% confidence interval | -17,47 to 41,68 |
| R squared | 0,02763 |

Ähnliche Mittelwerte bilden sich auch aus den beiden Teilkollektiven der Frauen mit hormoneller Kontrazeption. Hier lässt sich somit ebenso kein statistisch erhöhter oder verringerter Progesteronspiegel durch Sport-Einfluss feststellen.

Die Auswertung des Männer-Kollektivs ergab folgendes:

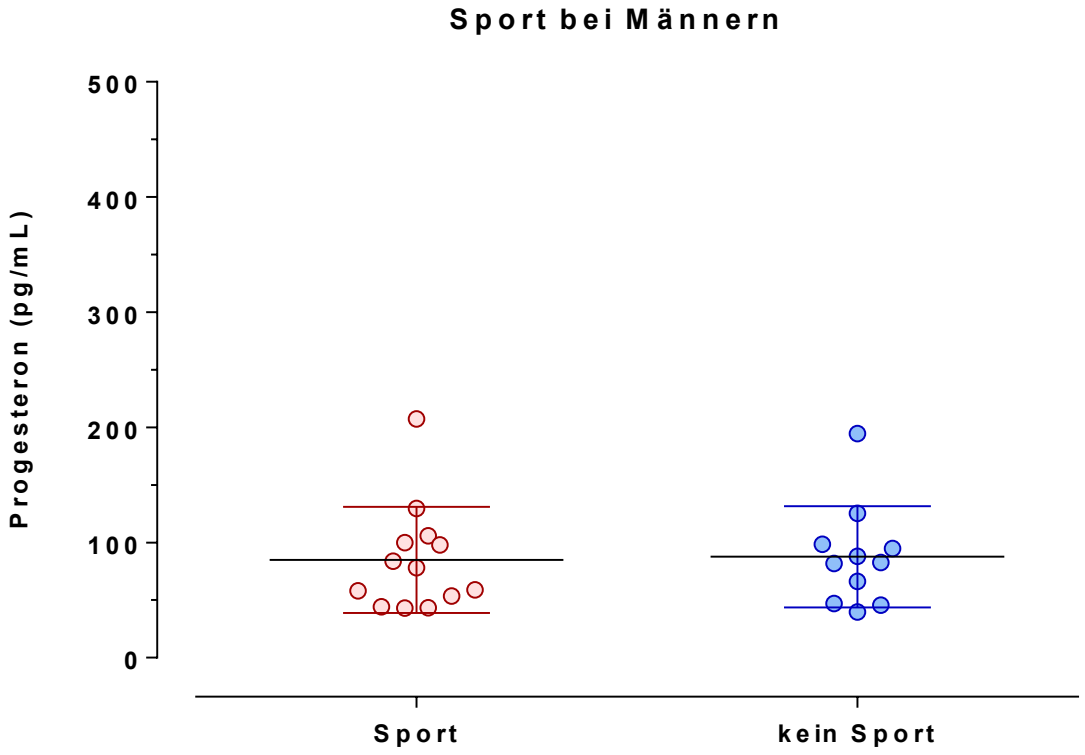


*Abbildung 30: Sport bei Männern*

*Tabelle 21: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 30*

| | |
|---|---|
| Column B | kein Sport |
| vs. | vs, |
| Column A | Sport |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,8832 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0,1486 df=22 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 84,92 ± 12,77, n=13 |
| Mean ± SEM of column B | 87,66 ± 13,23, n=11 |
| Difference between means | 2,744 ± 18,46 |
| 95% confidence interval | -35,54 to 41,03 |
| R squared | 0,001003 |

Abbildung 30 zeigt deutlich, dass für den männlichen Progesteronspiegel regelmäßige körperliche Aktivität nicht von Bedeutung ist.

In der Literatur wird beschrieben, dass nicht nur Sport als körperliche Betätigung zur Ovarialsuppression führen kann, sondern auch, und zwar ohne negativer Energiebilanz, anstrengende Arbeit (Jasienska & Ellison, 1998, S. 1849). Da es sich bei den TeilnehmerInnen des Immunoassays hauptsächlich um Studierende handelt, kann davon ausgegangen werden, dass keiner der gemessenen Progesteronspiegel durch körperliche Arbeit beeinflusst wurde.

Um das Gewicht der ProbandInnen miteinzubeziehen, wurde im Rahmen der Auswertung der Body-Mass-Index (BMI) errechnet. Der BMI ist der Quotient aus dem Gewicht der ProbandInnen in kg und der Körpergröße in $m^2$ (Ammon, 2004, S. 247). In dieser Testauswertung wurde ein Normbereich von 19-24 $kg/m^2$ für weibliche Personen sowie 20-25 $kg/m^2$ für Männer festgesetzt.
Mit Hilfe des Body-Mass-Indexes soll beurteilt werden, ob das Speichelprogesteron unter- oder übergewichtiger TestteilnehmerInnen von Normalgewichtigen abweicht. Dabei ist zu beachten, dass ein gewisser Fettgehalt sogar nötig ist, damit der Menstruationszyklus geregelt ablaufen kann. Deshalb kann die erste Regelblutung bei Mädchen auch nur eintreten, wenn mindestens 17% des Körpergewichts Fettgewebe ausmacht. Beträgt der Anteil des Körperfetts weniger als 22% kann es zu Störungen des Menstruationszyklus kommen. (Warren & Perlroth, 2001, S. 4)

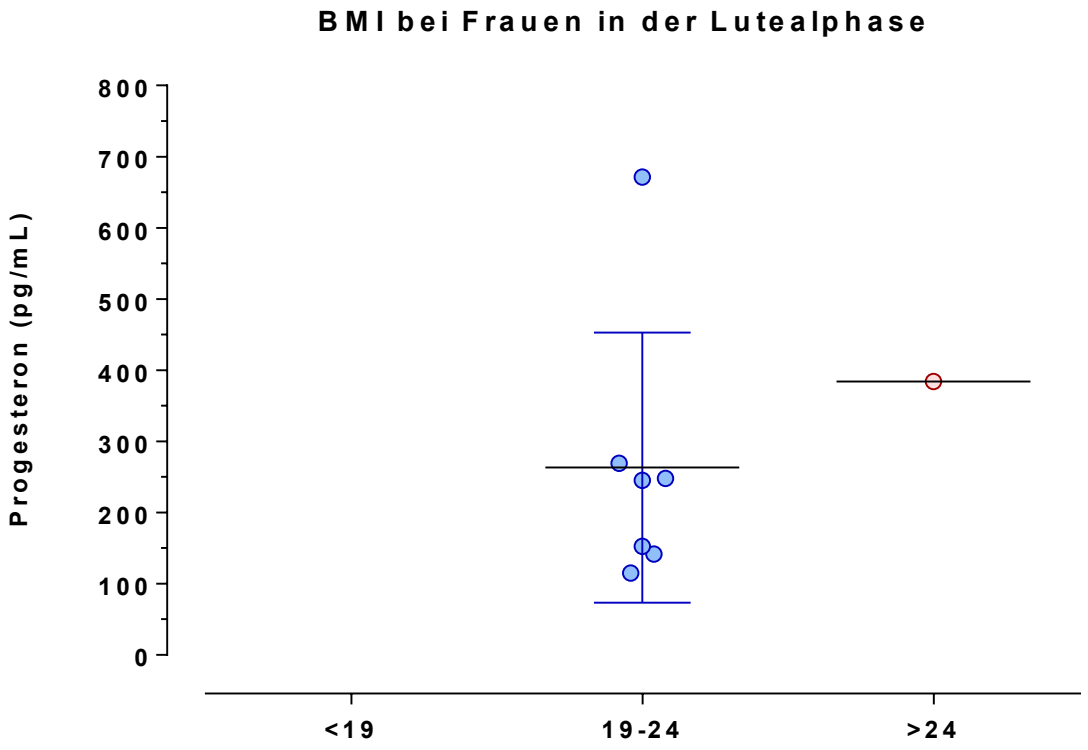


*Abbildung 31: BMI bei Frauen in der Lutealphase*

Hier sind nicht genügend Daten vorliegend, um statistische Parameter via dem ungepaarten t-Test zu erhalten. Es kann aber angenommen werden, dass sich die aus Abbildung 31 ersichtlichen Progesteronkonzentrationen aufgrund des vorliegenden Zyklustages der jeweiligen Probandin ergeben und nicht durch dessen Körpergewicht beeinflusst wird. Dasselbe gilt für folgende Auswertung des Kollektivs „Frauen in der Follikelphase“:

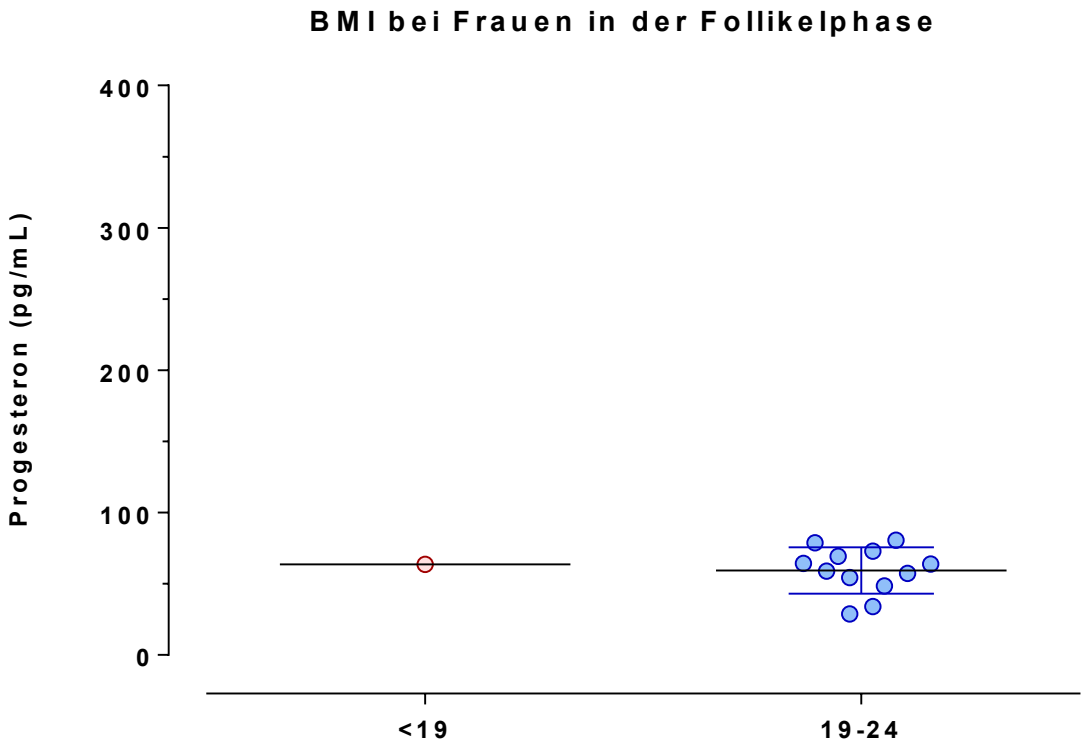


*Abbildung 32: BMI bei Frauen in der Follikelphase*

Frauen, die hormonell verhüten, wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer Body-Mass-Indizes beurteilt. Übergewichtige besitzen, im Gegensatz zu normalgewichtigen Personen, bei der Einnahme von Pharmaka ein abweichendes pharmakokinetisches Profil. Einige pharmakokinetische Parameter werden maßgeblich durch das Körpergewicht beeinflusst. Zum Beispiel erhöht sich bei Frauen mit höherem Fettgehalt das Verteilungsvolumen der lipophilen Hormone. Die Anwendung von Hormonpräparaten zur Kontrazeption führt somit, abhängig vom Gewicht, bei fettleibigen Frauen zu erniedrigten Spitzenwerten der Steroide im Blut. Ein größeres Risiko für Schwangerschaften besteht bei Übergewichtigen jedoch nicht, da, unabhängig von den erreichten Spitzenkonzentrationen der eingenommen Hormone, die Aktivität des Ovars erfolgreich unterdrückt werden kann. Studien haben jedoch eine minimal höhere follikuläre Entwicklung bei Frauen mit viel Gewicht feststellen können. Diese Aktivität ist allerdings nicht signifkant erhöht und reicht auch nicht aus eine Ovulation auszulösen. (Westhoff et al., 2010, S. 475-479)

Zusammenfassend kann somit im Rahmen dieser Untersuchung auch die Progesteronkonzentration im Speichel bei übergewichtigen beziehungsweise adipösen Personen mit Hormoneinnahme niedriger ausfallen. Allerdings muss

hinzugefügt werden, dass keine der teilnehmenden Frauen einen BMI ≥ 30 besitzt und daher adipös ist.

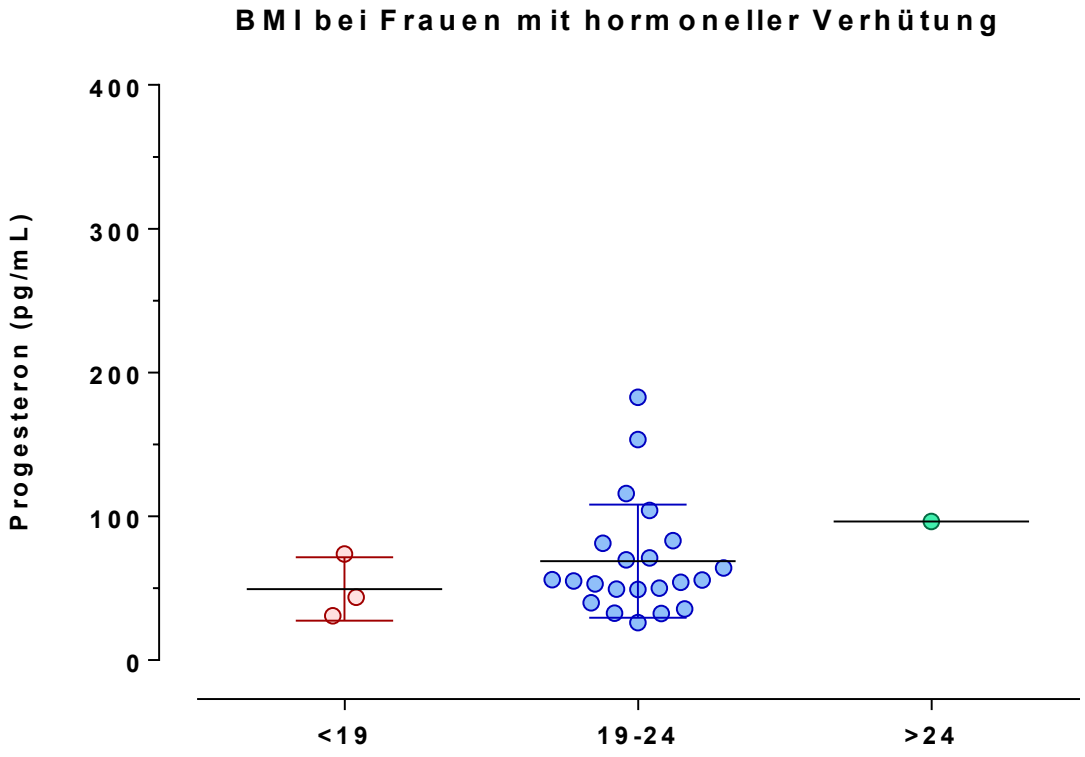


*Abbildung 33: BMI bei Frauen mit hormoneller Verhütung*

*Tabelle 22: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 33*

| | |
|---|---|
| Column B | 19-24 |
| vs. | vs, |
| Column A | <19 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,4179 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0,8248 df=23 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column B | 49,50 ± 12,72, n=3 |
| Mean ± SEM of column C | 68,87 ± 8,390, n=22 |
| Difference between means | 19,37 ± 23,48 |
| 95% confidence interval | -29,21 to 67,95 |
| R squared | 0,02873 |

Weil dem Teilkollektiv >24 nur eine Probandin zugeteilt werden konnte, war es nicht möglich alle drei Gruppen mittels ANOVA hinsichtlich signifikant unterschiedlicher

Werte zu vergleichen. Ein ungepaarter t-Test der anderen beiden Teilkollektive hat keine nennenswerte Abweichung der Ergebnisse ergeben.

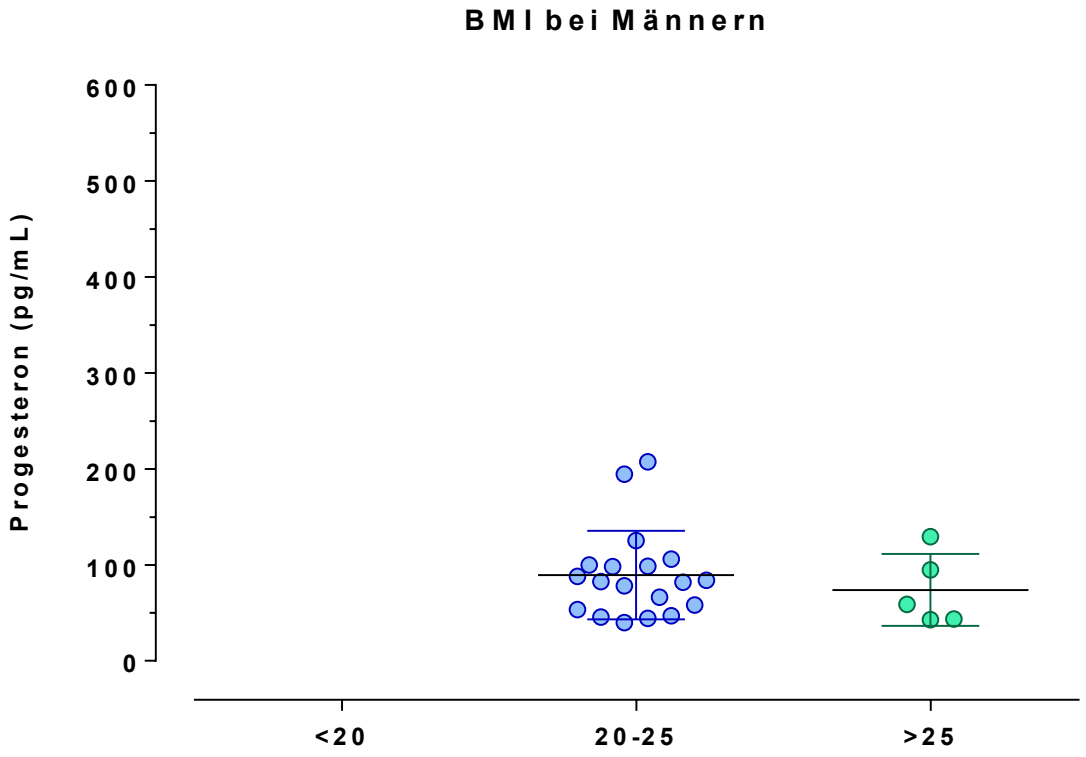


*Abbildung 34: BMI bei Männern*

*Tabelle 23: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 34*

| | |
|---|---|
| Column C | >25 |
| vs. | vs, |
| Column B | 20-25 |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,4974 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0,6901 df=22 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column B | 89,40 ± 10,56, n=19 |
| Mean ± SEM of column C | 73,93 ± 16,79, n=5 |
| Difference between means | -15,47 ± 22,42 |
| 95% confidence interval | -61,97 to 31,03 |
| R squared | 0,02119 |

Im männlichen Kollektiv konnte ebenfalls kein Ergebnis mit statistischer Signifikanz herausgefunden werden.

## 5.5 Einfluss der Ernährung auf den Progesteronspiegel

Mit Hilfe des Fragebogens wurde abgefragt, wie häufig die ProbandInnen Fleisch essen. Die Auswertung der Speichelproben hat gezeigt, dass Ernährungsgewohnheiten, vor allem der Fleischkonsum, keinen direkten Bezug auf die Progesteronsynthese haben.

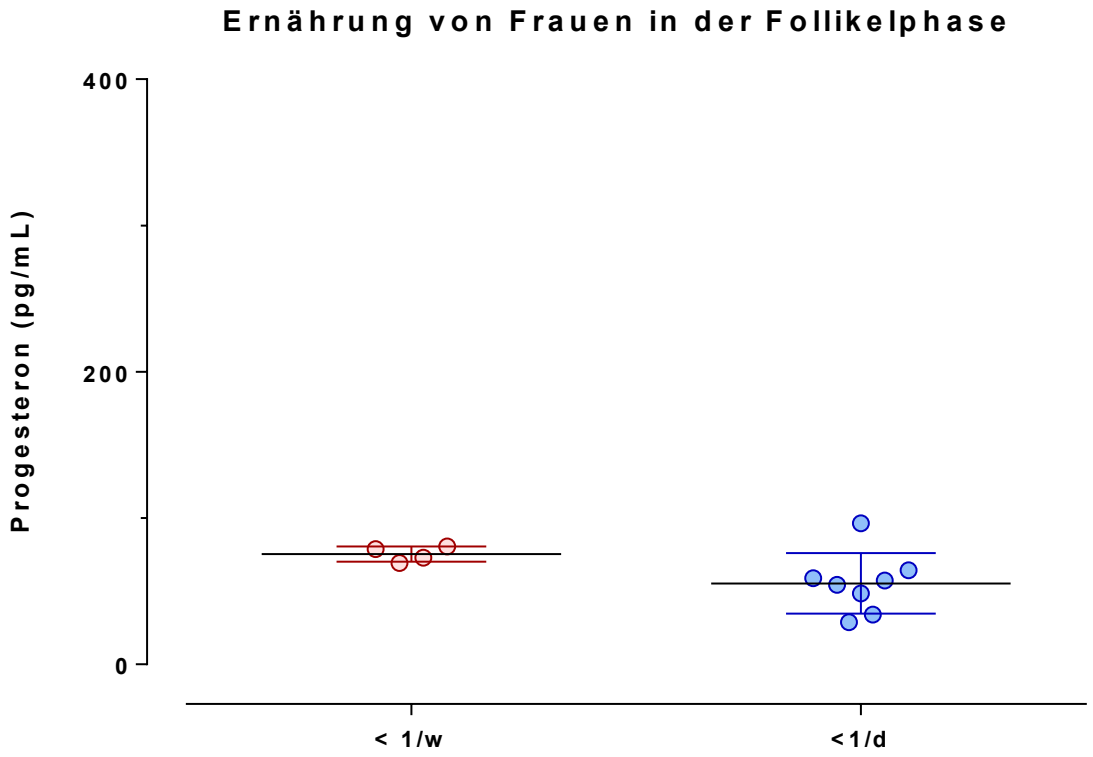


*Abbildung 35: Ernährung von Frauen in der Follikelphase*

*Tabelle 24: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 35*

| | |
|---|---|
| Column B | <1/d |
| vs. | vs, |
| Column A | < 1/w |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,0901 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=1,876 df=10 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 75,47 ± 2,625, n=4 |
| Mean ± SEM of column B | 55,36 ± 7,298, n=8 |
| Difference between means | -20,11 ± 10,72 |

| | |
|---|---|
| 95% confidence interval | -44,00 to 3,775 |
| R squared | 0,2603 |

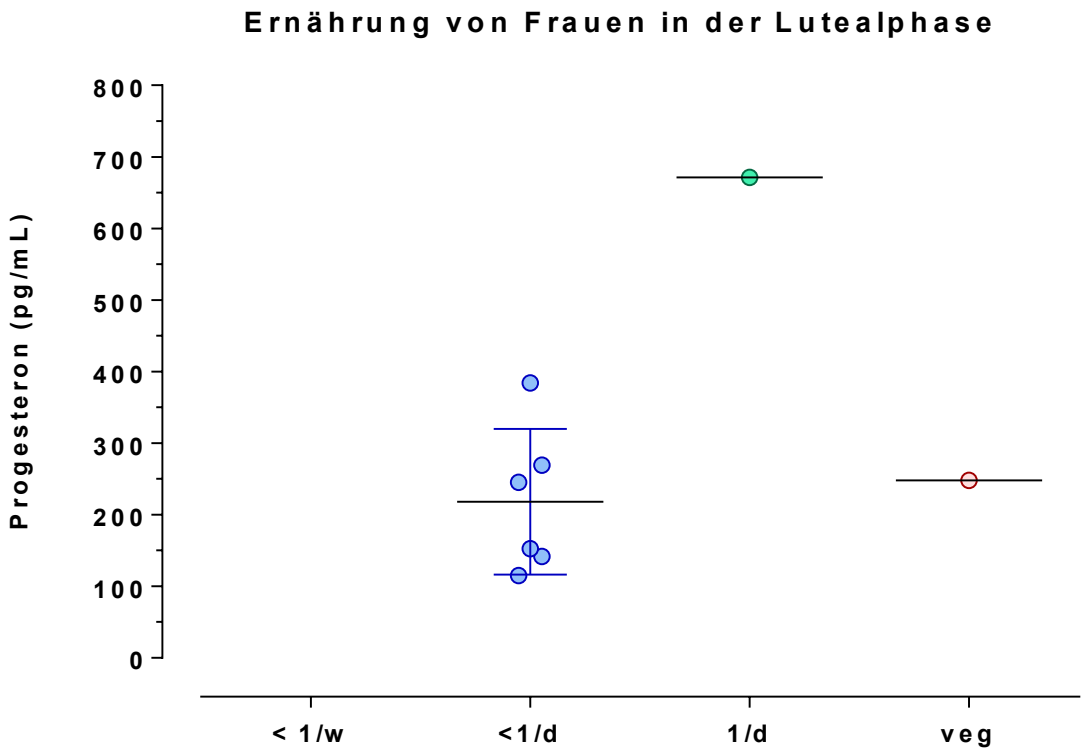


*Abbildung 36: Ernährung von Frauen in der Lutealphase*

*Tabelle 25: Resultat ANOVA zu Abbildung 36*

| | |
|---|---|
| ANOVA summary | |
| F | 0,1580 |
| P value | 0,9235 |
| P value summary | ns |
| Are differences among means statistically significant? (P <0.05) | No |
| R square | 0,01937 |
| Brown-Forsythe test | |
| F (DFn, DFd) | 0,1646 (3, 24) |
| P value | 0,9191 |
| P value summary | ns |
| Significantly different standard deviations? (P < 0.05) | No |
| Bartlett's test | |
| Bartlett's statistic (corrected) | |
| P value | |
| P value summary | |
| Significantly different standard deviations? (P < 0.05) | |
| ANOVA table | SS |

| | |
|---|---|
| Treatment (between columns) | 1,715e+006 |
| Residual (within columns) | 8,686e+007 |
| Total | 8,857e+007 |
| DF MS F (DFn, DFd)P value<br>3 571777 F (3, 24) = 0,1580 P = 0,9235<br>24 3,619e+006<br>27<br>Data summary | |
| Number of treatments (columns) | 4 |
| Number of values (total) | 28 |

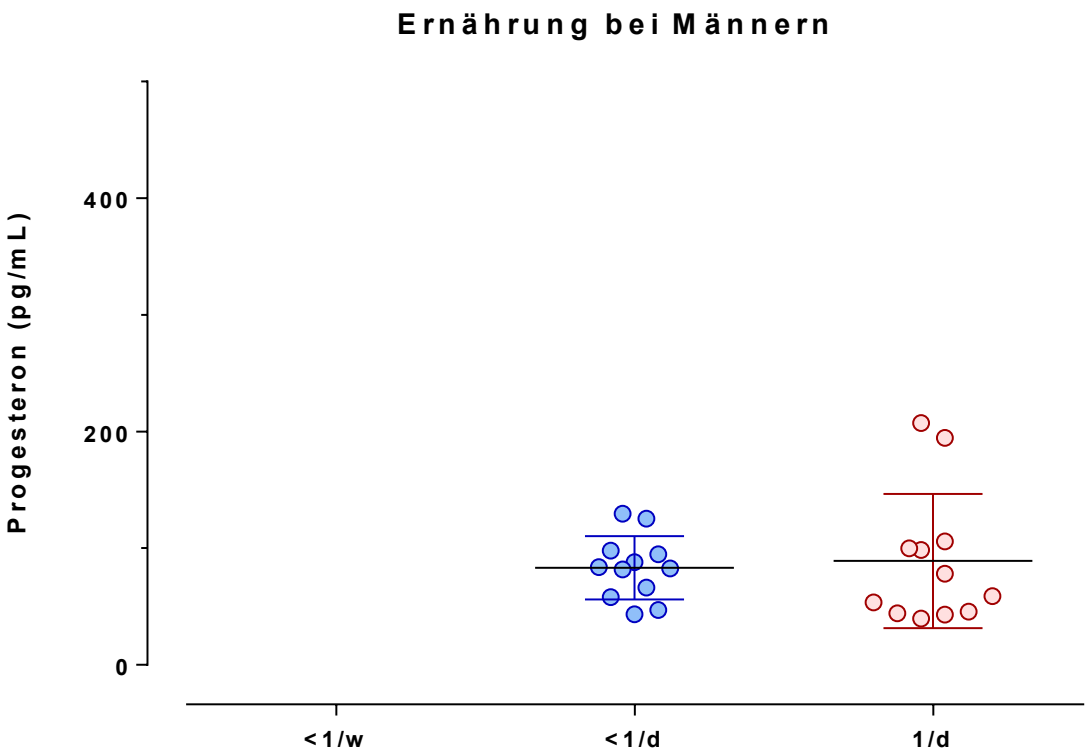


*Abbildung 37: Ernährung bei Männern*

*Tabelle 26: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 37*

| | |
|---|---|
| Column C | 1/d |
| vs. | vs, |
| Column B | <1/d |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,7523 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |

| | |
|---|---|
| t, df | t=0,3196 df=22 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column B | 83,24 ± 7,845, n=12 |
| Mean ± SEM of column C | 89,11 ± 16,60, n=12 |
| Difference between means | 5,870 ± 18,36 |
| 95% confidence interval | -32,22 to 43,95 |
| R squared | 0,004622 |

## 5.6 Einfluss von Stress auf den Progesterongehalt im Speichel

Eine große Zahl an Mediatoren ist am Prozess der Stressregulation beteiligt. Allen voran ist dabei das Nebennierenhormon Cortisol, das, wie im Kapitel 1.4 schon beschrieben, auch aus Progesteron gebildet werden kann. Verschiedene Untersuchungen legen nahe, dass auch das Gelbkörperhormon selbst stressinduziert freigesetzt werden kann. Hierbei spielt der in der Nebenniere synthetisierte Anteil vom Progesteron eine Rolle. (Wirth et al., 2007, S. 104)

Enzyme, die an der Progesteronherstellung beteiligt sind, sollen unter Stresseinfluss vermehrt produziert werden und somit die Sekretionsrate erhöhen. Des Weiteren soll die Bildung von Enzymen induziert werden, die Progesteron metabolisieren, wodurch beispielsweise Allopregnanolon entsteht. Sowohl Allopregnanolon, als auch Progesteron sind an der Gegenregulation und Erholung nach einer Stress-Situation beteiligt. Durch Interaktion mit $GABA_A$-Rezeptoren wirkt vor allem Allopregnanolon Stress-induzierter Frustration und Unruhe entgegen. (Childs et al., S. 79-83)

Im Fragebogen wurde abgefragt, ob sich die ProbandInnen zurzeit gestresst fühlen. Zunächst wurden alle Werte des Gesamtkollektivs in eine der beiden Kategorien „Stress“ oder „kein Stress“ zugeteilt und statistisch beurteilt.

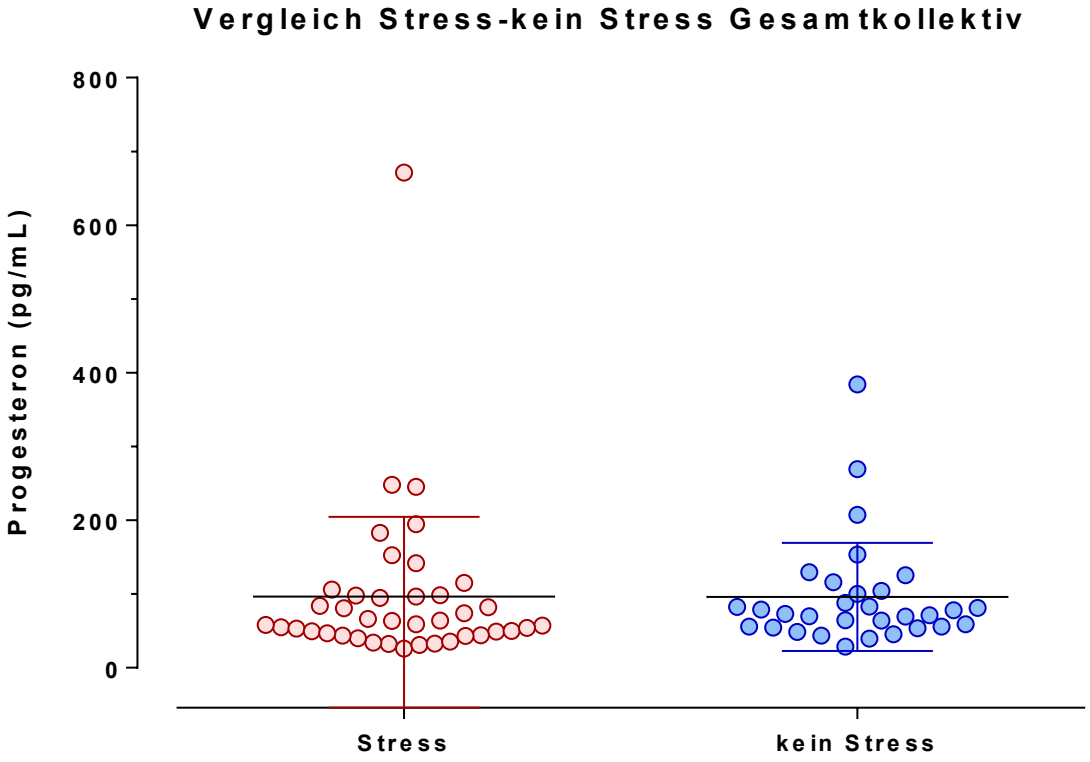


*Abbildung 38: Stress beim Gesamkollektiv*

*Tabelle 27: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 38*

| | |
|---|---|
| Column B | kein Stress |
| vs. | vs, |
| Column A | Stress |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,9906 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0,01184 df=69 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 96,34 ± 17,13, n=40 |
| Mean ± SEM of column B | 96,07 ± 13,14, n=31 |
| Difference between means | -0,2683 ± 22,65 |
| 95% confidence interval | -45,46 to 44,92 |
| R squared | 2,033e-006 |

Bei dieser Gegenüberstellung konnte grundsätzlich kein erhöhter Progesteronspiegel bei gestressten TestteilnehmerInnen festgestellt werden. Im nächsten Schritt werden Probandinnen in der Follikelphase, Frauen in der Lutealphase, weibliche Personen mit hormoneller Verhütung und Männer getrennt voneinander bewertet.

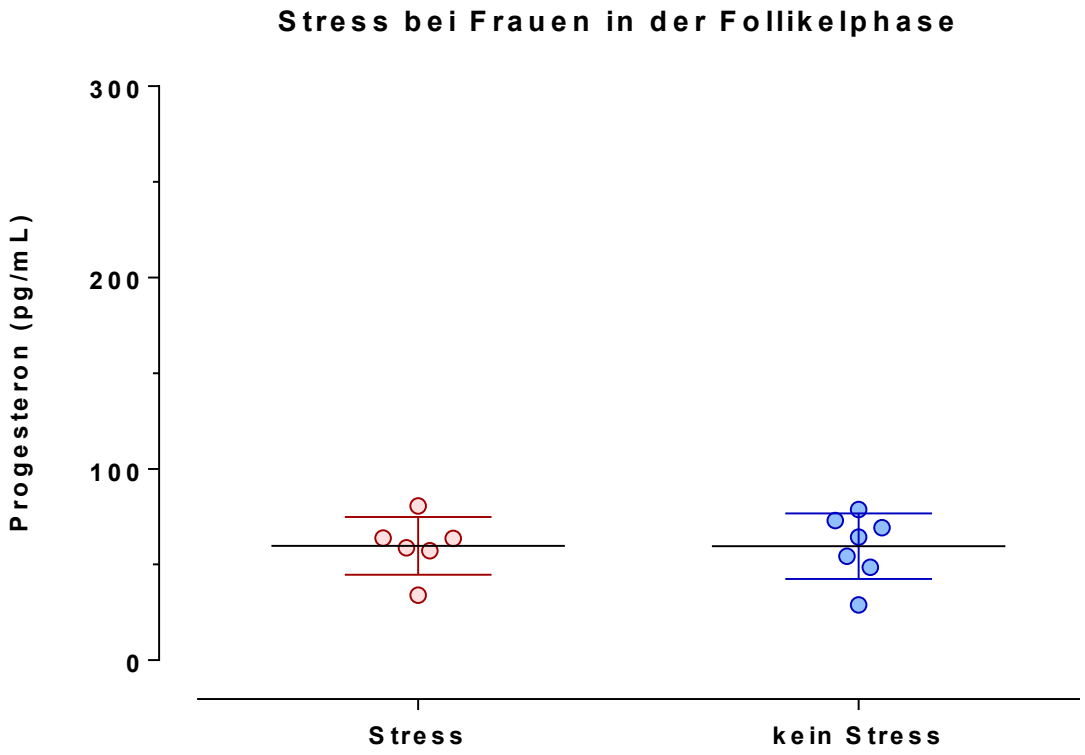


*Abbildung 39: Stress bei Frauen in der Follikelphase*

*Tabelle 28: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 39*

| | |
|---|---|
| Column B | kein Stress |
| vs. | vs, |
| Column A | Stress |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,9931 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0,008893 df=11 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 59,72 ± 6,158, n=6 |
| Mean ± SEM of column B | 59,64 ± 6,471, n=7 |
| Difference between means | -0,08029 ± 9,028 |
| 95% confidence interval | -19,95 to 19,79 |
| R squared | 7,190e-006 |

Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von über 0.05 liegt in diesem Vergleich keine statistische Signifikanz vor. Selbst aus der Abbildung 39 kann abgelesen werden, dass sich gestresst fühlende Frauen keine höheren Progesteronwerte vorweisen.

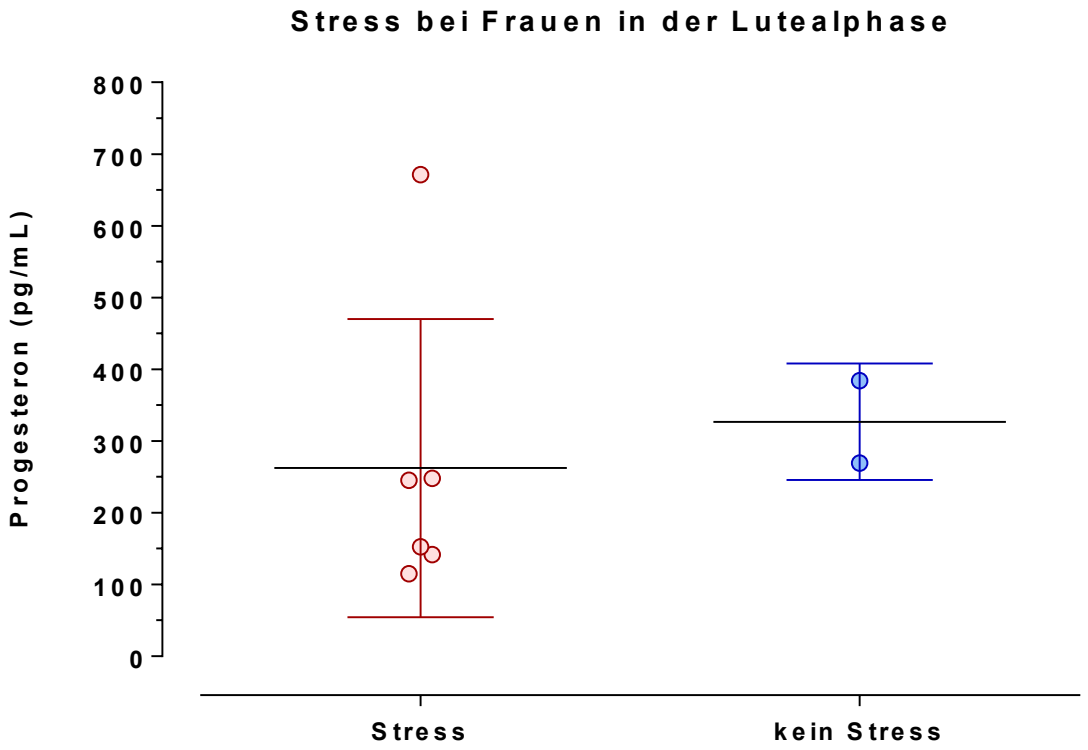


*Abbildung 40: Stress bei Frauen in der Lutealphase*

*Tabelle 29: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 40*

| | |
|---|---|
| Column B | kein Stress |
| vs. | vs, |
| Column A | Stress |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,6963 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0,4096 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 262,4 ± 84,85, n=6 |
| Mean ± SEM of column B | 326,8 ± 57,42, n=2 |
| Difference between means | 64,42 ± 157,3 |
| 95% confidence interval | -320,4 to 449,2 |
| R squared | 0,02720 |

Im Fall von Frauen in der Lutealphase, wo grundsätzlich schon erhöhte Progesteron-konzentrationen zu finden sind, weist ein P-Wert von 0.6863 darauf hin, dass Stresssituationen in dieser Untersuchung keinen Einfluss auf den Speichelgehalt vom physiologischen Gestagen haben.

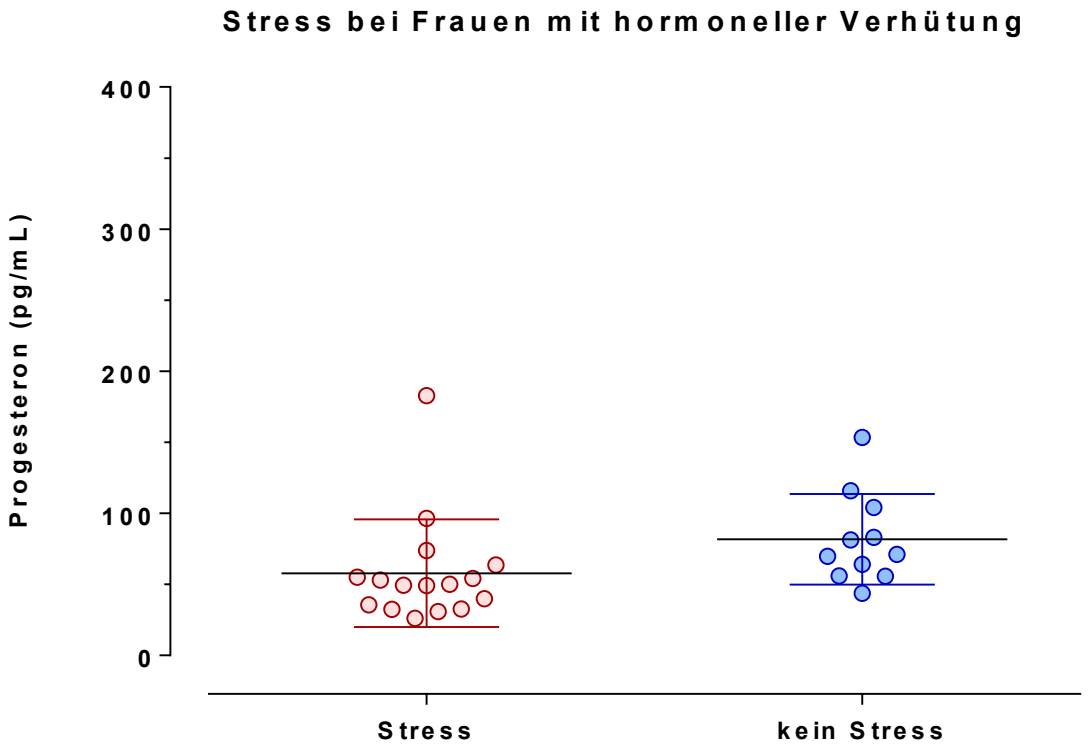


*Abbildung 41: Stress bei Frauen mit hormoneller Verhütung*

*Tabelle 30: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 41*

| | |
|---|---|
| Column B | kein Stress |
| vs. | vs, |
| Column A | Stress |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,0995 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=1,711 df=25 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 57,83 ± 9,457, n=16 |
| Mean ± SEM of column B | 81,66 ± 9,622, n=11 |
| Difference between means | 23,84 ± 13,94 |
| 95% confidence interval | -4,863 to 52,54 |
| R squared | 0,1048 |

In diesem Kollektiv sind paradoxerweise bei Probandinnen, die sich nicht in einer stressigen Situation befinden, im Durchschnitt höhere Progesteronkonzentrationen im

Speichel zu finden. Die Abweichung der Werte ist allerdings nicht statistisch signifkant (P=0.0995).

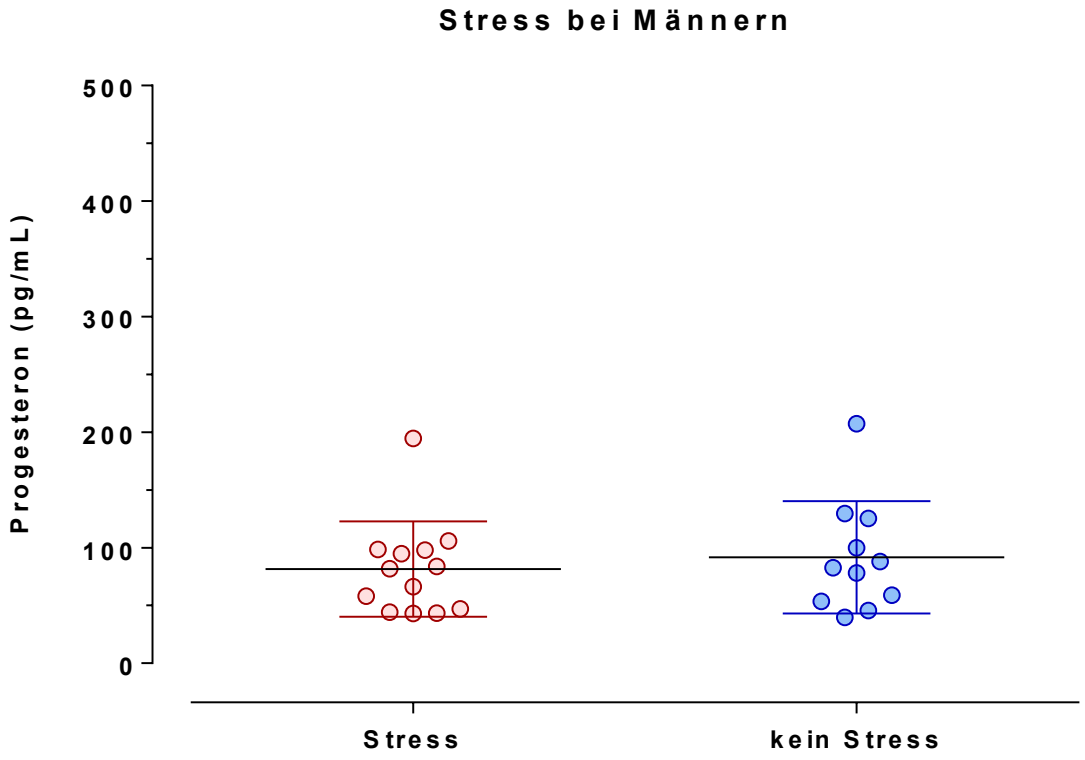


*Abbildung 42: Stress bei Männern*

*Tabelle 31: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 42*

| | |
|---|---|
| Column B | kein Stress |
| vs. | vs, |
| Column A | Stress |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,5832 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0,5569 df=22 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 81,49 ± 11,44, n=13 |
| Mean ± SEM of column B | 91,71 ± 14,68, n=11 |
| Difference between means | 10,22 ± 18,34 |
| 95% confidence interval | -27,82 to 48,26 |
| R squared | 0,01390 |

Gestresste Männer zeigen ebenfalls keine höheren Werte als das Teilkollektiv der nicht gestressten Probanden.

### *5.6.1 Korrelations- und Regressionsanalyse von Progesteron und Cortisol*

Wie schon erwähnt kommt dem Glucocorticoid Cortisol in Stresssituationen eine wichtige Rolle zu. Die Bildung des Hormons wird in der Nebennierenrinde durch Adrenocorticotropin (ACTH) aus der Hypophyse stimuliert. Neben der basalen Freisetzung wird Cortisol stressinduziert, durch zunehmende Mengen ACTH, vermehrt sezerniert. (Aktories et al., 2009, S. 661)

In der Vergangenheit haben Untersuchungen gezeigt, dass zwischen Cortisol- und Progesteronspiegel ein direkter Zusammenhang besteht. Diese Korrelation ist vor allem in Männern, die ja ausschließlich in der Nebennierenrinde produziertes Progesteron besitzen und in Frauen, die mit hormonellen Kontrazeptiva die ovarielle Aktivität unterdrücken, zu finden. Die Hauptmenge von Progesteron bei Frauen mit normalen Menstruationszyklen wird vom Corpus luteum des Ovars hergestellt. Die Gelbkörperhormon-Fertigung wird durch GnRH gesteuert und übertönt dabei möglicherweise Veränderungen der Progesteronproduktion aus der Nebenniere. Beim männlichen Geschlecht sowie bei hormonell verhütenden Frauen wird die adrenale Progesteronbildung vermutlich durch ACTH reguliert und geht daher auch mit der Cortisolsynthese einher. In stressigen Lagen stellt die gleichzeitige Freisetzung der beiden Steroidhormone ein Gegenregulationssystem dar. (Wirth et al., 2007, S. 104ff)

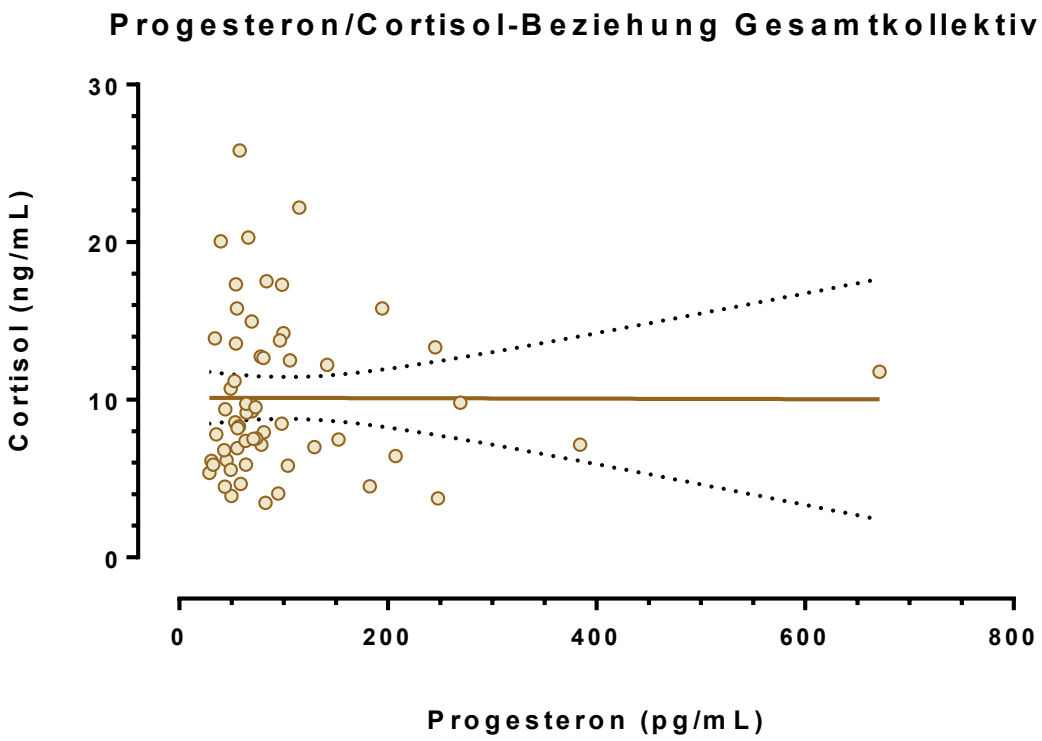


*Abbildung 43: Regressionsanalyse Progesteron/Cortisol vom Gesamtkollektiv*

*Tabelle 32: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 43*

| | |
|---|---|
| Best-fit values | |
| Slope | -0,0001561 ± 0,006581 |
| Y-intercept when X=0.0 | 10,13 ± 0,9421 |
| X-intercept when Y=0.0 | 64908 |
| 1/slope | -6405 |
| 95% Confidence Intervals | |
| Slope | -0,01335 to 0,01303 |
| Y-intercept when X=0.0 | 8,246 to 12,02 |
| X-intercept when Y=0.0 | 853,0 to +infinity |
| Goodness of Fit | |
| R square | 1,005e-005 |
| Sy.x | 5,058 |
| Is slope significantly non-zero? | |
| F | 0,0005628 |
| DFn, DFd | 1,000, 56,00 |
| P value | 0,9812 |
| Deviation from zero? | Not Significant |
| Data | |
| Number of X values | 58 |
| Maximum number of Y replicates | 1 |
| Total number of values | 58 |
| Number of missing values | 116 |

*Tabelle 33: Resultat Korrelationsanalyse Progesteron/Cortisol vom Gesamtkollektiv*

| | |
|---|---|
| Spearman r | |
| r | 0,1093 |
| 95% confidence interval | -0,1609 to 0,3643 |
| P value | |
| P (two-tailed) | 0,4141 |
| P value summary | ns |
| Exact or approximate P value? | Approximate |
| Significant? (alpha = 0.05) | No |
| Number of XY Pairs | 58 |

Bei den am Test teilnehmenden PharmaziestudentInnen wurde im Rahmen des Praktikums Chemische Diagnostik und Klinische Pharmazie eine Cortisolbestimmung durchgeführt. Wie auch Progesteron, wurde das Hormon aus dem Speichel mittels einem Immunoassay quantifiziert.

Um den Korrelationskoeffizienten r zu ermitteln, wurde die Spearman-Methode angewendet. Dieser beträgt 0.1093 und kann damit aussagen, dass im Gesamtkollektiv keine signifikante Korrelation zwischen dem Cortisol- und

Progesteronspiegel im Speichel besteht. Hinsichtlich der Regressionsanalyse ist festzustellen, dass kein linearer Zusammenhang vorliegt. Da laut oben genannter Literatur, Wirth et al., 2007, vor allem Frauen mit hormoneller Kontrazeption und Männer Korrelationen zwischen Progesteron- und Cortisolspiegel aufweisen, werden diese Kollektive einzeln bewertet.

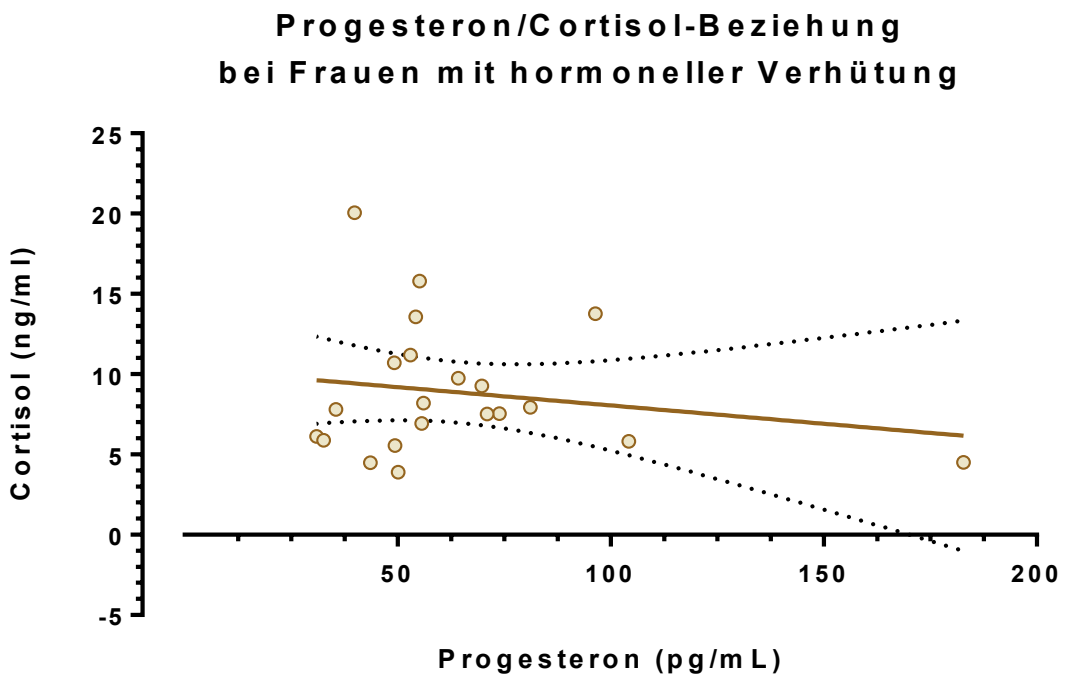


*Abbildung 44: Regressionsanalyse Progesteron/Cortisol von Frauen mit hormoneller Verhütung*

*Tabelle 34: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 44*

| | |
|---|---|
| Best-fit values | |
| Slope | -0,02279 ± 0,02785 |
| Y-intercept when X=0.0 | 10,33 ± 2,005 |
| X-intercept when Y=0.0 | 453,4 |
| 1/slope | -43,87 |
| 95% Confidence Intervals | |
| Slope | -0,08107 to 0,03549 |
| Y-intercept when X=0.0 | 6,138 to 14,53 |
| X-intercept when Y=0.0 | 170,1 to +infinity |
| Goodness of Fit | |
| R square | 0,03406 |
| Sy.x | 4,147 |
| Is slope significantly non-zero? | |
| F | 0,6701 |
| DFn, DFd | 1,000, 19,00 |
| P value | 0,4232 |
| Deviation from zero? | Not Significant |

| | |
|---|---|
| Data | |
| Number of X values | 21 |
| Maximum number of Y replicates | 1 |
| Total number of values | 21 |
| Number of missing values | 42 |

*Tabelle 35: Resultat Korrelationsanalyse Progesteron/Cortisol von Frauen mit hormoneller Verhütung*

| | |
|---|---|
| Spearman r | |
| r | 0,03766 |
| 95% confidence interval | -0,4119 to 0,4725 |
| P value | |
| P (two-tailed) | 0,8712 |
| P value summary | ns |
| Exact or approximate P value? | Approximate |
| Significant? (alpha = 0.05) | No |
| Number of XY Pairs | 21 |

Trotz angeblichen Zusammenhang zwischen adrenal produziertem Progesteron und Cortisol (Wirth et al., 2007, S. 106) korrelieren in dieser Untersuchung Cortisol- und Progesteronwerte bei hormonell verhütenden Frauen nicht miteinander.

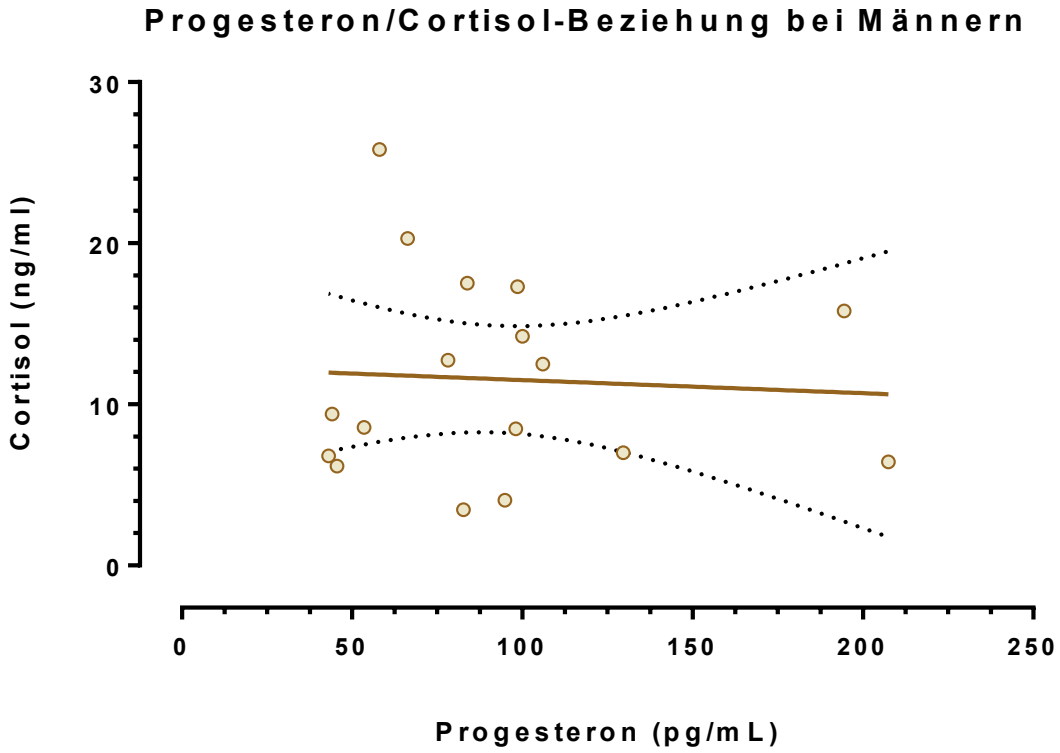


*Abbildung 45: Regressionsanalyse Progesteron/Cortisol von Männern*

*Tabelle 36: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 45*

| | |
|---|---|
| Best-fit values | |
| Slope | -0,008130 ± 0,03377 |
| Y-intercept when X=0.0 | 12,32 ± 3,510 |
| X-intercept when Y=0.0 | 1515 |
| 1/slope | -123,0 |
| 95% Confidence Intervals | |
| Slope | -0,08009 to 0,06383 |
| Y-intercept when X=0.0 | 4,840 to 19,80 |
| X-intercept when Y=0.0 | 230,8 to +infinity |
| Goodness of Fit | |
| R square | 0,003850 |
| Sy.x | 6,413 |
| Is slope significantly non-zero? | |
| F | 0,05797 |
| DFn, DFd | 1,000, 15,00 |
| P value | 0,8130 |
| Deviation from zero? | Not Significant |
| Data | |
| Number of X values | 17 |
| Maximum number of Y replicates | 1 |
| Total number of values | 17 |
| Number of missing values | 34 |

*Tabelle 37: Korrelationsanalyse Progesteron/Cortisol von Männern*

| | |
|---|---|
| Spearman r | |
| r | 0,03676 |
| 95% confidence interval | -0,4641 to 0,5198 |
| P value | |
| P (two-tailed) | 0,8909 |
| P value summary | ns |
| Exact or approximate P value? | Exact |
| Significant? (alpha = 0.05) | No |
| Number of XY Pairs | 17 |

Auch die männlichen Testteilnehmer weisen keine statistisch signifikante Korrelation oder Regression der beiden Steroidhormone aus der Nebenniere auf.

## 5.7 Einfluss des Speichelprogesterons auf den Schlaf

Die Meinungen in welche Richtung Progesteron die Schlafqualität beeinflusst sind kontrovers. Obwohl Stoffwechselprodukte des Hormons $GABA_A$-Rezeptoren

modulieren können, gibt es einige Studien, die mit einem Anstieg der Progesteron-konzentration Schlafstörungen in Verbindung bringen (Sharkey et al., 2014, S. 694; Shechter er al., 2010, S. 653). Die Untersuchungen führen dies auf die durch Progesteron beeinflusste erhöhte Körpertemperatur in der Lutealphase zurück. Vor allem bei starken Anstieg des Progesterongehalts, wie beispielsweise in der Mitte der Lutealphase, haben Frauen häufiger Probleme durchzuschlafen. Auch während der Menstruation haben viele Frauen Schwierigkeiten gut zu schlafen. (Sharkey et al., 2014, S. 694f)

Weiters ist in Studien eine Abnahme des Rapid Eye Movement (REM)-Schlafes, eine Schlafphase die durch Träumen und schnelle Augenbewegungen gekennzeichnet ist, in der Lutealphase beobachtet worden. Dies ist, laut Angaben in der Literatur, auf die Interaktion von Progesteronmetabolite mit $GABA_A$-Rezeptoren sowie wegen der erhöhten Körpertemperatur begründet. (Baker & Driver, 2007, S. 616)

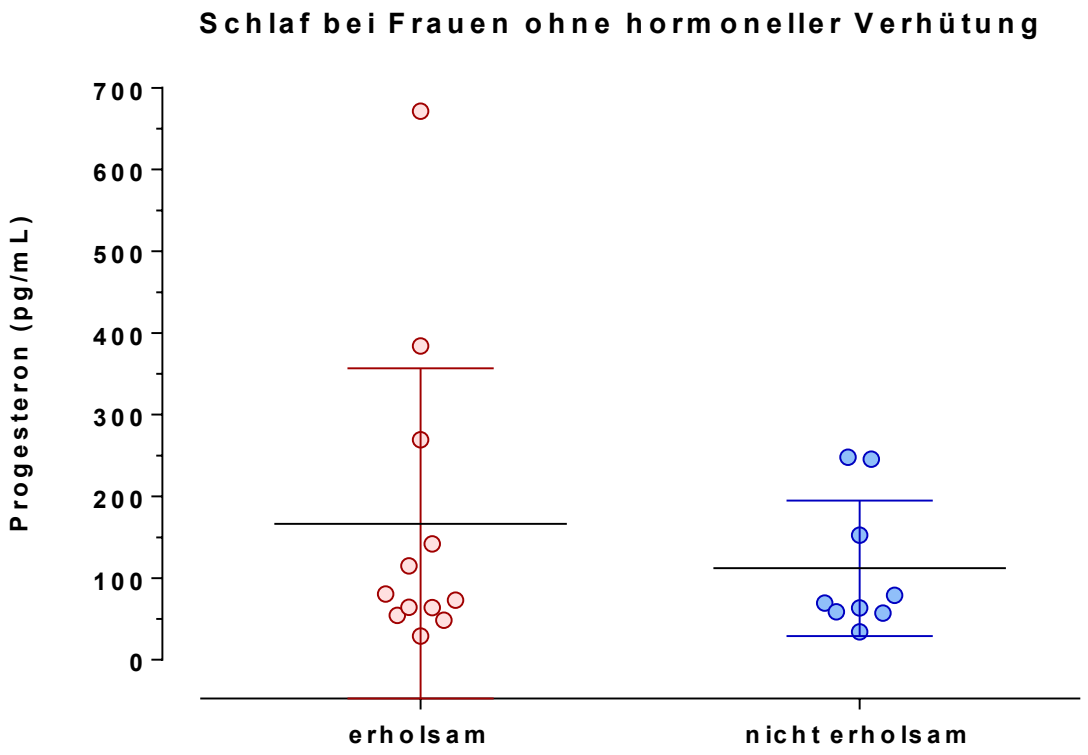


*Abbildung 46: Schlaf bei Frauen ohne hormoneller Verhütung*

*Tabelle 38: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 46*

| | |
|---|---|
| Column B | nicht erholsam |
| vs. | vs, |
| Column A | erholsam |
| Unpaired t test | |

| | |
|---|---|
| P value | 0,4353 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0,7970 df=19 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 166,3 ± 54,95, n=12 |
| Mean ± SEM of column B | 112,0 ± 27,66, n=9 |
| Difference between means | -54,30 ± 68,13 |
| 95% confidence interval | -196,9 to 88,30 |
| R squared | 0,03235 |

Um herauszufinden, ob die Schlafqualität der Probandinnen tatsächlich vom Progesteronsspiegel und damit von der jeweiligen Zyklusphase abhängig ist, wurde mit Hilfe des Fragebogens nach vorliegenden Schlafproblemen gefragt. Alle Frauen, die nicht mit Hormonpräparaten verhüten, wurden zu Beginn betrachtet. Die Annahme, dass Frauen in der Lutealphase mit höherer Gelbkörperhormonkonzentration schlechter schlafen, kann nicht bestätigt werden.

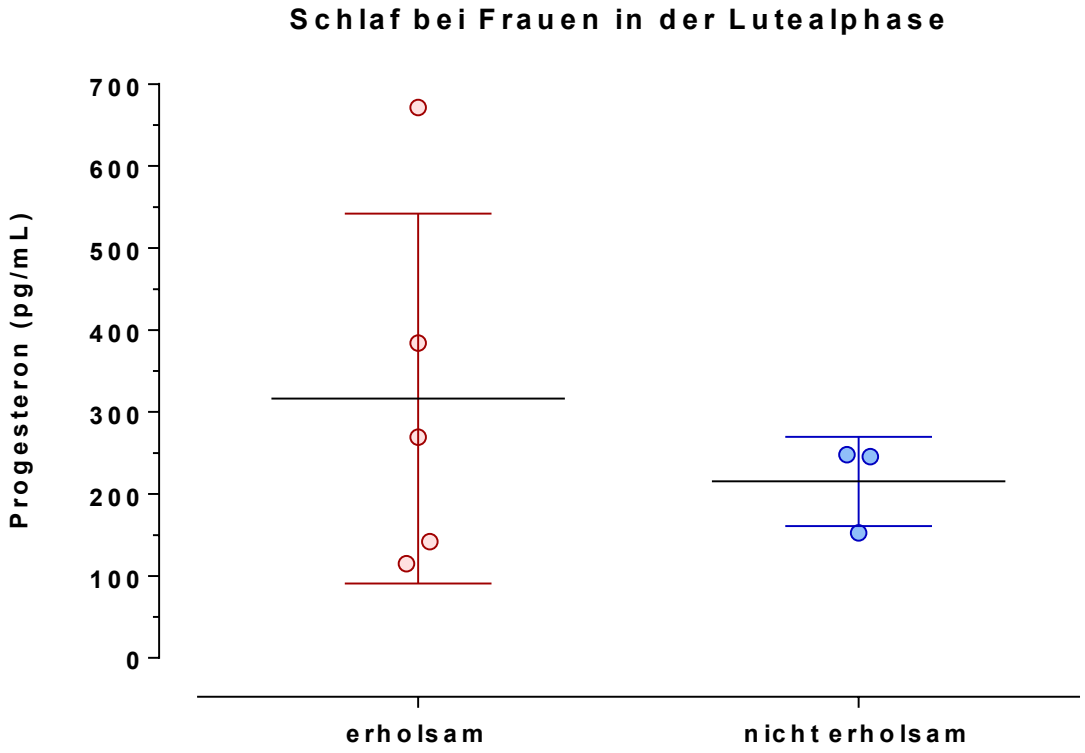


*Abbildung 47: Schlaf bei Frauen in der Lutealphase*

*Tabelle 39: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 47*

| | |
|---|---|
| Column B | nicht erholsam |

| | |
|---|---|
| vs. | vs, |
| Column A | erholsam |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,4873 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0,7399 df=6 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 316,3 ± 100,9, n=5 |
| Mean ± SEM of column B | 215,3 ± 31,34, n=3 |
| Difference between means | -101,0 ± 136,5 |
| 95% confidence interval | -435,1 to 233,0 |
| R squared | 0,08362 |

In dieser Analyse soll aufgedeckt werden, ob Frauen nach dem Eisprung in Abhängigkeit der Höhe ihres Progesteronspiegels Schwierigkeiten haben zu schlafen. Obwohl wenige Werte vorliegen, ist aus Abbildung 47 und den dazugehörigen Daten in Tabelle 39 ersichtlich, dass höhere Progesteronkonzentrationen nicht zu einer verminderten Schlafqualität führen.

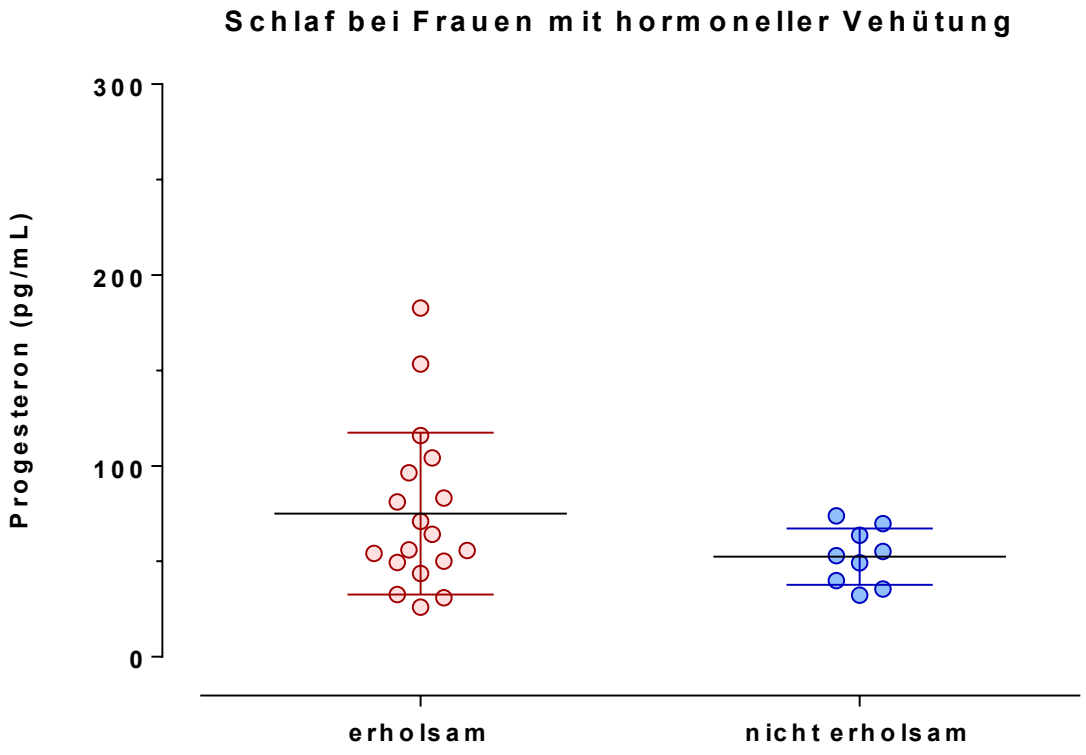


*Abbildung 48: Schlaf bei Frauen mit hormoneller Verhütung*

*Tabelle 40: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 48*

| | |
|---|---|
| Column B | nicht erholsam |
| vs. | vs, |
| Column A | erholsam |
| Unpaired t test | |
| P value | 0,1365 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=1,538 df=25 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 75,06 ± 9,992, n=18 |
| Mean ± SEM of column B | 52,49 ± 4,926, n=9 |
| Difference between means | -22,57 ± 14,67 |
| 95% confidence interval | -52,79 to 7,648 |
| R squared | 0,08647 |

Manche der schlecht schlafenden Probandinnen, die hormonell verhüten, weisen zwar erhöhte Konzentrationen des physiologischen Gestagens auf, allerdings ist der Unterschied zu den Konzentrationen der Frauen mit erholsamen Schlaf nicht statistisch signifikant (P=0.1365).
Ebenso unwahrscheinlich ist, dass beim männlichen Kollektiv relevante Abweichungen in Verbindung mit einer verringerten Schlafqualität auftreten.

## 5.8 Einfluss des Zeitpunkts von der Probennahme

Dass viele Steroidhormone in Abhängigkeit der vorliegenden Uhrzeit sezerniert werden, ist bekannt. In der Früh können die höchsten Werte der biologisch aktiven Hormone nachgewiesen werden, danach sinkt der Gehalt. Ob sich die Speichelkonzentration von Progesteron ebenfalls tageszeitlich ändert, gilt herauszufinden. Dabei wurde unterschieden, ob die Speichelprobennahme bis spätestens 09:30 (morgens), 11:30 (vormittags) oder ab 13:00 (mittags oder später) durchgeführt wurde. Alle vier Kollektive wurden diesbezüglich getrennt voneinander betrachtet.

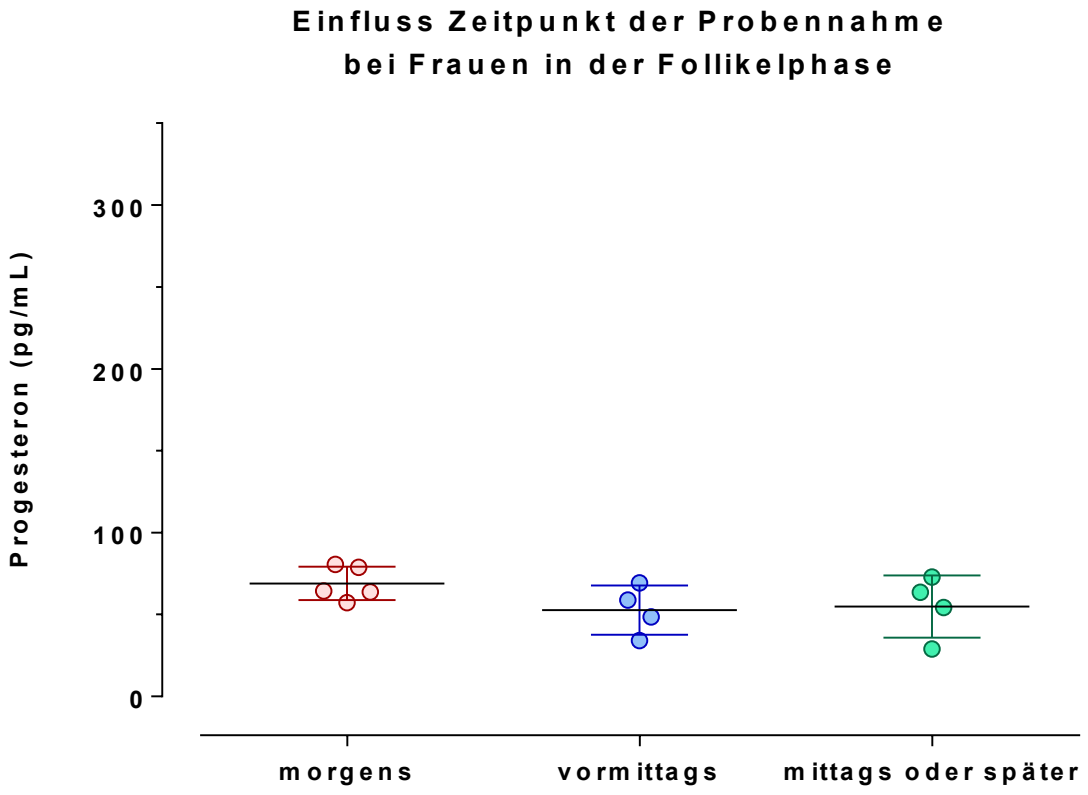


*Abbildung 49: Einfluss Zeitpunkt der Probennahme bei Frauen in der Follikelphase*

*Tabelle 41: Resultat ANOVA zu Abbildung 49*

| | |
|---|---|
| ANOVA summary | |
| F | 1,653 |
| P value | 0,2398 |
| P value summary | ns |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | No |
| R square | 0,2485 |
| | |
| Brown-Forsythe test | |
| F (DFn, DFd) | 0,4490 (2, 10) |
| P value | 0,6505 |
| P value summary | ns |
| Significantly different standard deviations? (P < 0.05) | No |
| | |
| Bartlett's test | |
| Bartlett's statistic (corrected) | 1,149 |
| P value | 0,5630 |
| P value summary | ns |
| Significantly different standard deviations? (P < 0.05) | No |
| | |
| ANOVA table | SS |

| | |
|---|---|
| Treatment (between columns) | 719,6 |
| Residual (within columns) | 2177 |
| Total | 2896 |
| DF MS F (DFn, DFd)P value<br>2 359,8 F (2, 10) = 1,653 P = 0,2398<br>10 217,7<br>12<br>Data summary | |
| Number of treatments (columns) | 3 |
| Number of values (total) | 13 |

Aus Abbildung 49 ist zu entnehmen, dass der Mittelwert des morgendlichen Speichelprogesterons minimal höher ist. Der Unterschied zu den vormittags beziehungsweise später gemessenen Progesteronkonzentrationen zeigt jedoch keine statistische Signifikanz.

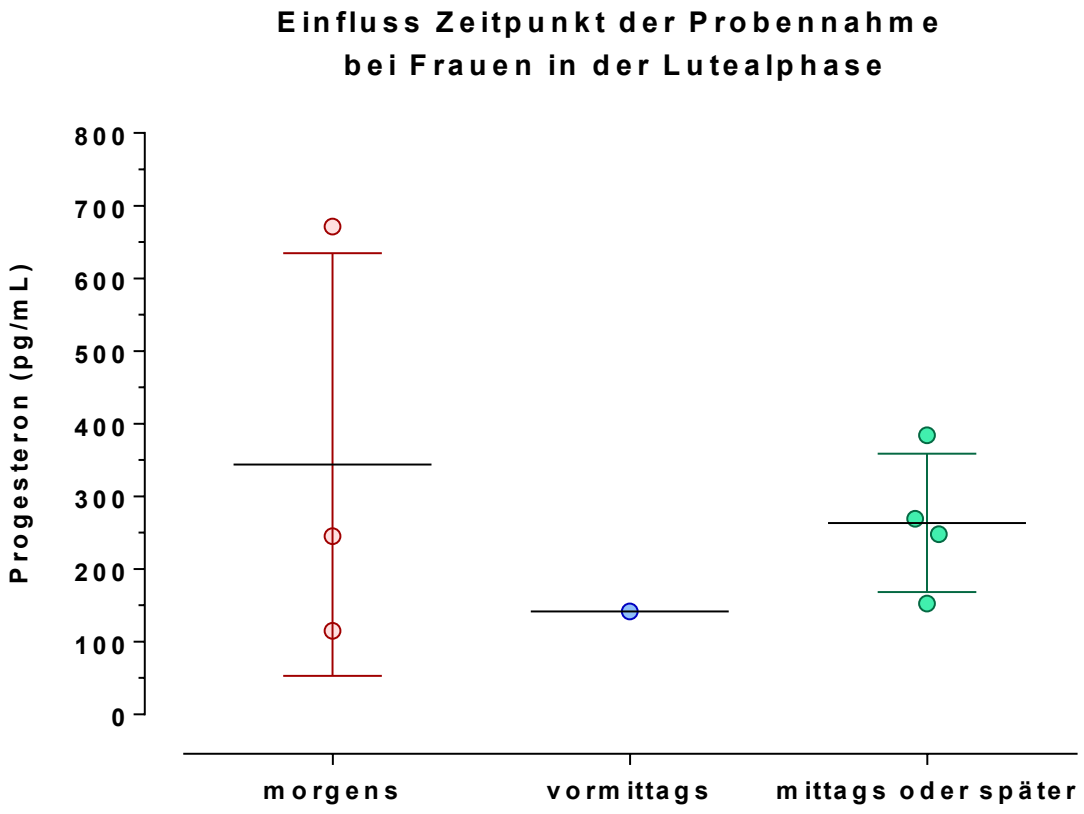


*Abbildung 50: Einfluss Zeitpunkt der Probennahme bei Frauen in der Lutealphase*

*Tabelle 42: Resultat ungepaarter t-Test zu Abbildung 50*

| | |
|---|---|
| Column C | mittags oder später |
| vs. | vs, |
| Column A | morgens |
| | |

| | |
|---|---|
| Unpaired t test | |
| P value | 0,6182 |
| P value summary | ns |
| Significantly different? (P < 0.05) | No |
| One- or two-tailed P value? | Two-tailed |
| t, df | t=0,5310 df=5 |
| How big is the difference? | |
| Mean ± SEM of column A | 343,9 ± 168,0, n=3 |
| Mean ± SEM of column C | 263,5 ± 47,55, n=4 |
| Difference between means | -80,38 ± 151,4 |
| 95% confidence interval | -469,5 to 308,7 |
| R squared | 0,05338 |

Aufgrund der wenigen Werte kann in diesem Kollektiv keine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt werden. Die morgens abgegebenen Probenergebnisse wurden daher mittels einem ungepaarten t-Test mit den mittags oder später gewonnenen Speichelwerten verglichen.

Auch in diesem Kollektiv kann keine bedeutsame Abweichung der Progesteronwerte festgestellt werden. Die Speichelkonzentration der einzelnen Testteilnehmerinnen variiert stark aufgrund der unterschiedlichen Zyklustage. Von der vorliegenden Uhrzeit sind die Messwerte jedoch nicht abhängig.

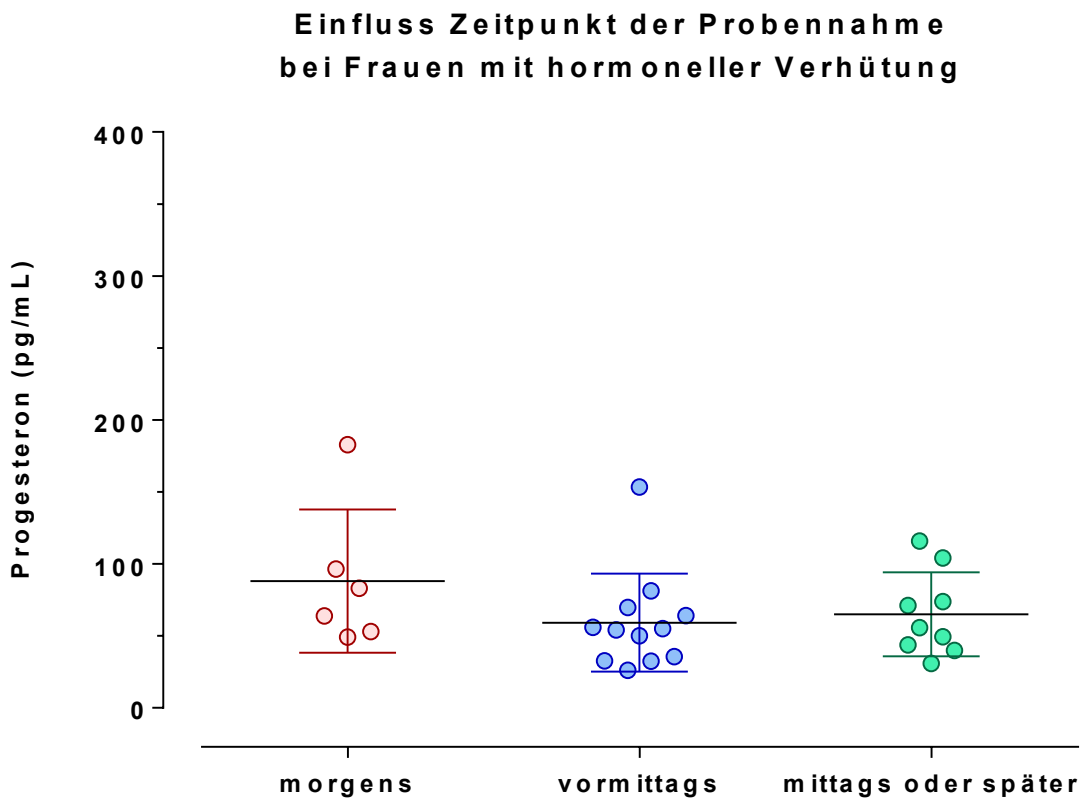


*Abbildung 51: Einfluss Zeitpunkt der Probennahme bei Frauen mit hormoneller Verhütung*

*Tabelle 43: Resultat ANOVA zu Abbildung 51*

| | |
|---|---|
| ANOVA summary | |
| F | 1,283 |
| P value | 0,2956 |
| P value summary | ns |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | No |
| R square | 0,09656 |
| Brown-Forsythe test | |
| F (DFn, DFd) | 0,4004<br>(2, 24) |
| P value | 0,6745 |
| P value summary | ns |
| Significantly different standard deviations? (P < 0.05) | No |
| Bartlett's test | |
| Bartlett's statistic (corrected) | 1,871 |
| P value | 0,3923 |
| P value summary | ns |
| Significantly different standard deviations? (P < 0.05) | No |
| ANOVA table | SS |
| Treatment (between columns) | 3414 |
| Residual (within columns) | 31938 |
| Total | 35351 |
| DF MS F (DFn, DFd)P value<br>2 1707 F (2, 24) = 1,283 P = 0,2956<br>24 1331<br>26<br>Data summary | |
| Number of treatments (columns) | 3 |
| Number of values (total) | 27 |

Wieder kann man einen leicht erhöhten Mittelwert der Konzentrationen in den morgendlich abgenommen Proben entdecken. Da P > 0.05 liegt ist dieser Unterschied nicht statistisch signifikant und kann daher vernachlässigt werden.

Bei Betrachtung der männlichen Testpersonen sind ebenfalls keine bedeutsamen tageszeitlichen Schwankungen zu beobachten.

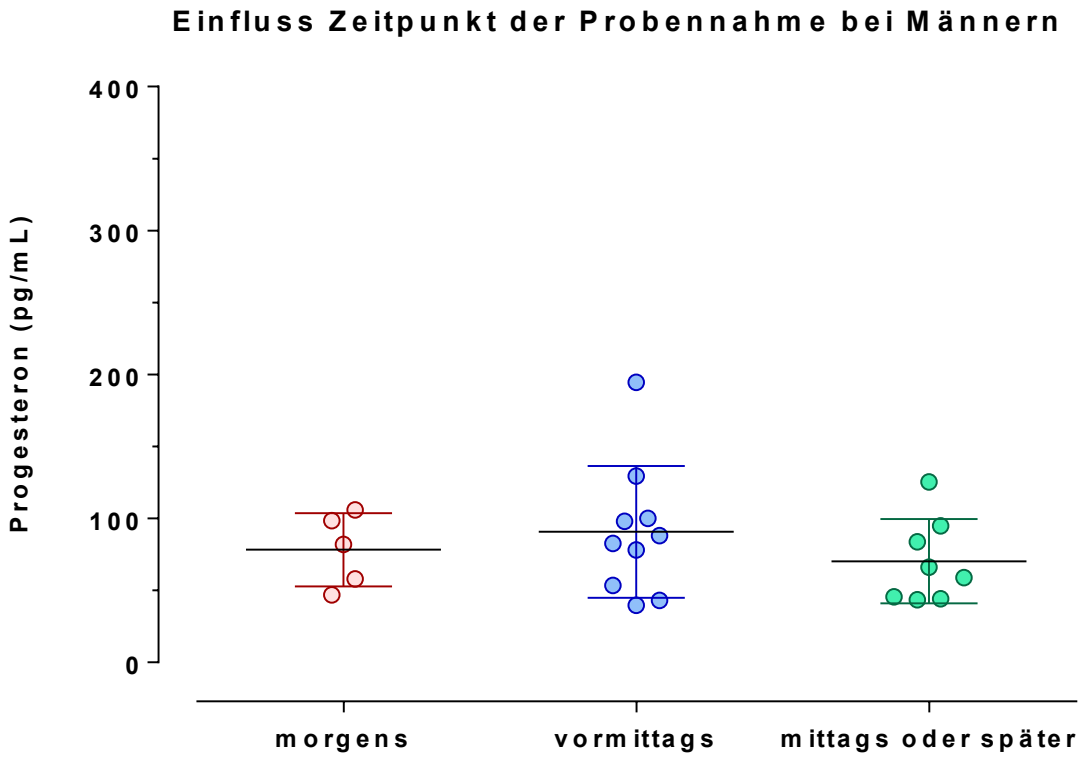


*Abbildung 52: Einfluss Zeitpunkt der Probennahme bei Männern*

*Tabelle 44: Resultat ANOVA zu Abbildung 52*

| | |
|---|---|
| ANOVA summary | |
| F | 0,6918 |
| P value | 0,5122 |
| P value summary | ns |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | No |
| R square | 0,06471 |
| Brown-Forsythe test | |
| F (DFn, DFd) | 0,4569 (2, 20) |
| P value | 0,6397 |
| P value summary | ns |
| Significantly different standard deviations? (P < 0.05) | No |
| Bartlett's test | |
| Bartlett's statistic (corrected) | 2,334 |
| P value | 0,3112 |
| P value summary | ns |
| Significantly different standard deviations? (P < 0.05) | No |
| ANOVA table | SS |
| Treatment (between columns) | 1901 |
| Residual (within columns) | 27474 |
| Total | 29375 |
| DF MS F (DFn, DFd)P value | |

| | |
|---|---|
| 2 950,4 F (2, 20) = 0,6918 P = 0,5122<br>20 1374<br>22<br>Data summary | |
| Number of treatments (columns) | 3 |
| Number of values (total) | 23 |

## 5.9 Korrelations- und Regressionsanalyse von Progesteron und Testosteron

Die Produktion und Sekretion des männlichen Steroidhormons Testosteron wird, wie das Progesteron, durch LH aus der Hypophyse gesteuert. Während das männliche Geschlecht täglich bis zu 7 mg des „Männerhormons“ bilden, beträgt die Syntheserate bei Frauen nur etwa 10% davon. Bei Männern stellen die Leydig-Zwischenzellen im Hoden den Hauptproduktionsort dar. Im weiblichen Organismus erfolgt die Fertigstellung einerseits im Ovar, andererseits in der Nebenniere. (Aktories et al., 2009, S. 709)

Testosteron wirkt bei beiden Geschlechtern androgen, anabol und wird außerdem zur Estrogensynthese benutzt. Somit kommt dem männlichen Sexualhormon auch im weiblichen Reproduktionssystem eine wichtige Rolle zu. Die Testosteronfreisetzung folgt einem circadianen Rhythmus pulsatil. (Leidenberger et al., 2014, S. 33)

Der Testosterongehalt teilnehmender Pharmaziestudierender wurde im Rahmen des Praktikums aus dem Speichel mittels einem Luminiszenz Immunoassay gemessen. Die Ergebnisse werden im Anschluss mit dem Speichelprogesteron korreliert.

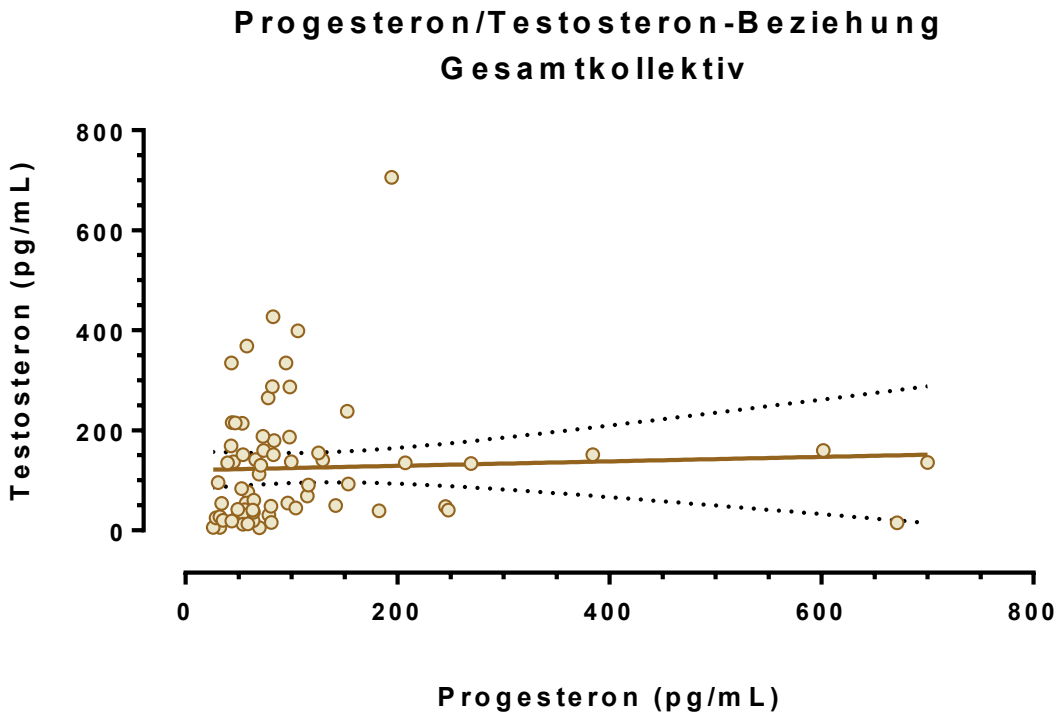


*Abbildung 53: Regressionsanalyse Progesteron/Testosteron vom Gesamtkollektiv*

*Tabelle 45: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 53*

| | |
|---|---|
| Best-fit values | |
| Slope | 0,04461 ± 0,1137 |
| Y-intercept when X=0.0 | 120,2 ± 19,77 |
| X-intercept when Y=0.0 | -2694 |
| 1/slope | 22,41 |
| 95% Confidence Intervals | |
| Slope | -0,1825 to 0,2717 |
| Y-intercept when X=0.0 | 80,72 to 159,7 |
| X-intercept when Y=0.0 | -infinity to -331,4 |
| Goodness of Fit | |
| R square | 0,002258 |
| Sy.x | 125,2 |
| Is slope significantly non-zero? | |
| F | 0,1539 |
| DFn, DFd | 1,000, 68,00 |
| P value | 0,6960 |
| Deviation from zero? | Not Significant |
| Data | |
| Number of X values | 70 |
| Maximum number of Y replicates | 1 |
| Total number of values | 70 |
| Number of missing values | 143 |

*Tabelle 46: Resultat Korrelationsanalyse Progesteron/Testosteron vom Gesamtkollektiv*

| | |
|---|---|
| Spearman r | |
| r | 0,2750 |
| 95% confidence interval | 0,03575 to 0,4845 |
| P value | |
| P (two-tailed) | 0,0212 |
| P value summary | * |
| Exact or approximate P value? | Approximate |
| Significant? (alpha = 0.05) | Yes |
| Number of XY Pairs | 70 |

Laut Spearman-Korrelationsanalyse ist ersichtlich, dass ein minimaler, direkter Zusammenhang zwischen den Sexualhormonen Progesteron und Testosteron vorliegt. Der Koeffizient r beträgt 0.275 und liegt daher nicht besonders weit von Null entfernt. Somit kann man davon ausgehen, dass die beiden Variablen nur gering miteinander korrelieren. Trotzdem ist es möglich, dass ProbandInnen mit hohem Progesterongehalt im Speichel auch zu einer höheren Testosteronkonzentration neigen oder umgekehrt. Die statistische Bewertung der Spearman-Korrelation ist in diesem Fall statistisch signifikant (P=0.0212). Die Regressionsanalyse ergibt keine lineare Beziehung der Steroidhormone ($r^2$=0.0023).

Ähnliche Ergebnisse tauchen auch in der Literatur auf. Mit Korrelationskoeffizient-Werten von r=0.42 und r=0.59 ist ein Zusammenhang von Progesteron und Testosteron in Frauen beziehungsweise Männern nach emotionaler Belastung bekannt. Partielle Korrelationsanalysen zeigen allerdings auch hier keine Beziehung zwischen Progesteron- und Testosterongehalt im Speichel. (Wirth et al., 2007, S. 105)

In dieser Untersuchung wurde die Progesteron/Testosteron-Korrelationsanalyse zuerst bei Frauen, die nicht hormonell verhüten, durchgeführt (Abbildung 54). Hierbei konnte keine Verbindung zwischen den Hormonen festgestellt werden.

Im Anschluss sind Frauen mit Hormoneinnahme zur Verhütung betrachtet worden (Abbildung 55). Eine Tendenz zu einer direkten Progesteron/Testosteron-Korrelation ist in dieser Analyse zwar vorhanden, jedoch liegt keine statistische Signifikanz vor.

Im männlichen Kollektiv konnte keine direkte Beziehung nachgewiesen werden (Abbildung 56). Da der Koeffizient laut Korrelationsmethode nach Spearman mit r=-0.1617 sogar unter Null liegt, neigen Männer in diesem Test sogar zu einem indirekten Progesteron/Testosteron-Zusammenhang. Das Resultat ist allerdings nicht signifikant.

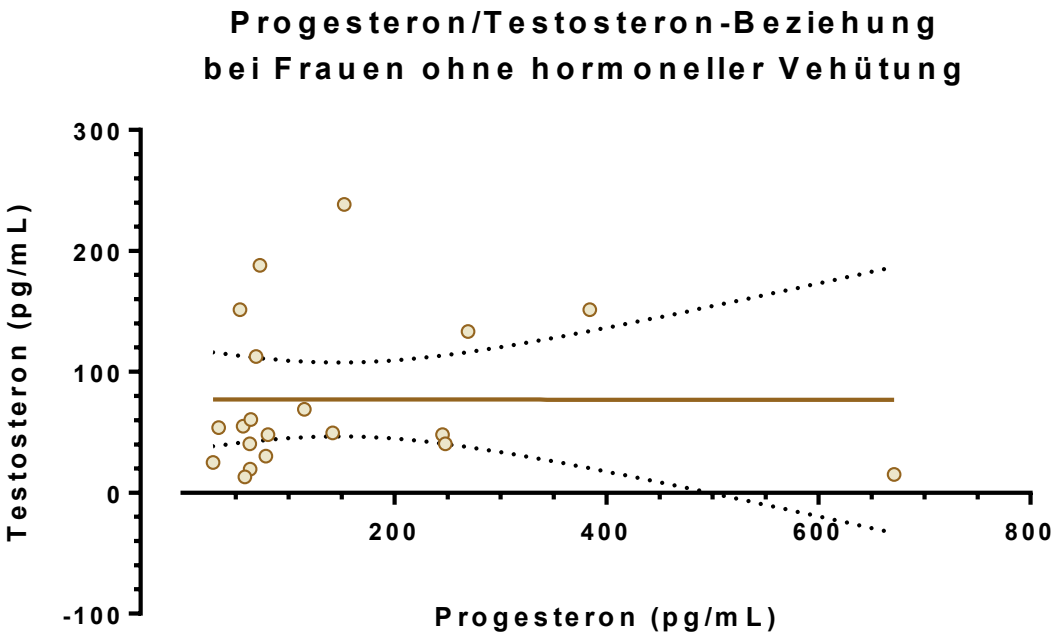


*Abbildung 54: Regressionsanalyse Progesteron/Testosteron bei Frauen ohne hormoneller Verhütung*

*Tabelle 47: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 54*

| | |
|---|---|
| Best-fit values | |
| Slope | -0,0007973 ± 0,09610 |
| Y-intercept when X=0.0 | 77,27 ± 20,34 |
| X-intercept when Y=0.0 | 96912 |
| 1/slope | -1254 |
| 95% Confidence Intervals | |
| Slope | -0,2027 to 0,2011 |
| Y-intercept when X=0.0 | 34,54 to 120,0 |
| X-intercept when Y=0.0 | 497,0 to +infinity |
| Goodness of Fit | |
| R square | 3,825e-006 |
| Sy.x | 65,13 |
| Is slope significantly non-zero? | |
| F | 6,884e-005 |
| DFn, DFd | 1,000, 18,00 |
| P value | 0,9935 |
| Deviation from zero? | Not Significant |
| Data | |
| Number of X values | 20 |
| Maximum number of Y replicates | 1 |
| Total number of values | 20 |
| Number of missing values | 40 |

*Tabelle 48: Resultat Korrelationsanalyse Progesteron/Testosteron bei Frauen ohne hormoneller Verhütung*

| | |
|---|---|
| Spearman r | |
| r | 0,1534 |
| 95% confidence interval | -0,3228 to 0,5676 |
| P value | |
| P (two-tailed) | 0,5185 |
| P value summary | ns |
| Exact or approximate P value? | Approximate |
| Significant? (alpha = 0.05) | No |
| Number of XY Pairs | 20 |

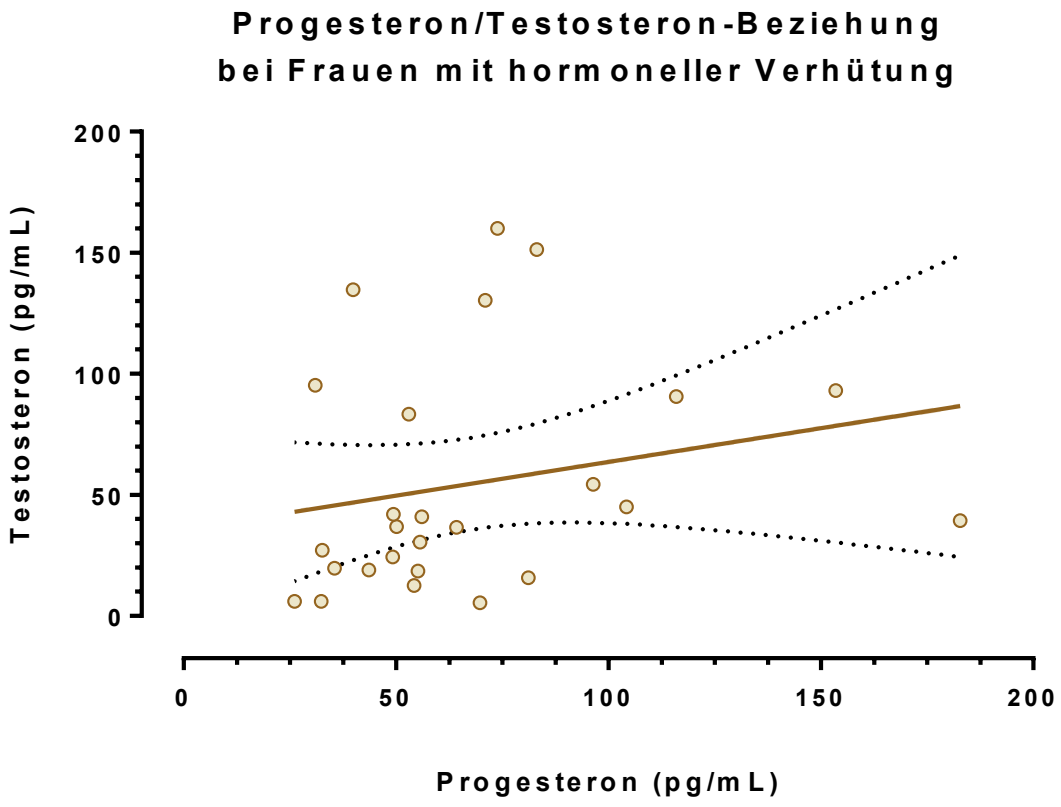


*Abbildung 55: Regressionsanalyse Progesteron/Testosteron bei Frauen mit hormoneller Verhütung*

*Tabelle 49: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 55*

| | |
|---|---|
| Best-fit values | |
| Slope | 0,2787 ± 0,2497 |
| Y-intercept when X=0.0 | 35,72 ± 19,25 |
| X-intercept when Y=0.0 | -128,2 |
| 1/slope | 3,589 |
| 95% Confidence Intervals | |
| Slope | -0,2367 to 0,7941 |
| Y-intercept when X=0.0 | -4,001 to 75,45 |

| | |
|---|---|
| X-intercept when Y=0.0 | -infinity to 5,505 |
| Goodness of Fit | |
| R square | 0,04933 |
| Sy.x | 46,94 |
| Is slope significantly non-zero? | |
| F | 1,245 |
| DFn, DFd | 1,000, 24,00 |
| P value | 0,2755 |
| Deviation from zero? | Not Significant |
| Data | |
| Number of X values | 26 |
| Maximum number of Y replicates | 1 |
| Total number of values | 26 |
| Number of missing values | 55 |

*Tabelle 50:Resultat Korrelationsanalyse Progesteron/Testosteron bei Frauen ohne hormoneller Verhütung*

| | |
|---|---|
| Spearman r | |
| r | 0,3744 |
| 95% confidence interval | -0,02727 to 0,6719 |
| P value | |
| P (two-tailed) | 0,0595 |
| P value summary | ns |
| Exact or approximate P value? | Approximate |
| Significant? (alpha = 0.05) | No |
| Number of XY Pairs | 26 |

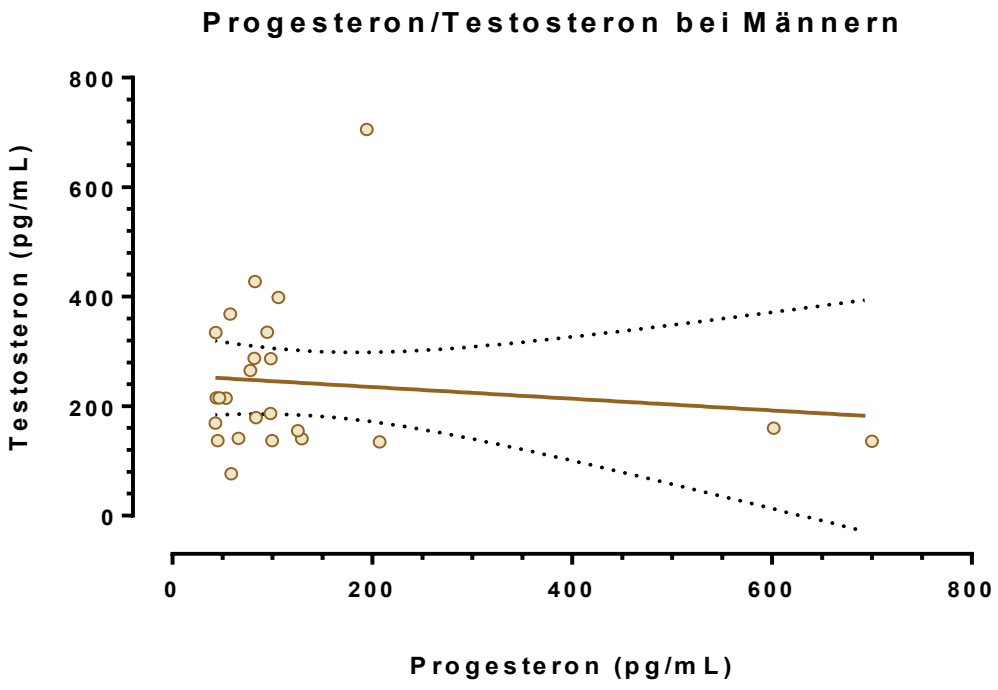


*Abbildung 56: Regressionsanalyse Progesteron/Testosteron bei Männern*

*Tabelle 51: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 56*

| | |
|---|---|
| Best-fit values | |
| Slope | -0,1069 ± 0,1756 |
| Y-intercept when X=0.0 | 256,4 ± 37,00 |
| X-intercept when Y=0.0 | 2398 |
| 1/slope | -9,352 |
| 95% Confidence Intervals | |
| Slope | -0,4711 to 0,2572 |
| Y-intercept when X=0.0 | 179,7 to 333,2 |
| X-intercept when Y=0.0 | 628,8 to +infinity |
| Goodness of Fit | |
| R square | 0,01658 |
| Sy.x | 139,1 |
| Is slope significantly non-zero? | |
| F | 0,3709 |
| DFn, DFd | 1,000, 22,00 |
| P value | 0,5487 |
| Deviation from zero? | Not Significant |
| Data | |
| Number of X values | 24 |
| Maximum number of Y replicates | 1 |
| Total number of values | 24 |
| Number of missing values | 48 |

*Tabelle 52: Resultat Korrelationsanalyse Progesteron/Testosteron bei Männern*

| | |
|---|---|
| Spearman r | |
| r | -0,1617 |
| 95% confidence interval | -0,5395 to 0,2703 |
| P value | |
| P (two-tailed) | 0,4502 |
| P value summary | ns |
| Exact or approximate P value? | Approximate |
| Significant? (alpha = 0.05) | No |

## 5.10 Korrelations- und Regressionsanalyse von Progesteron und freien Radikalen

Freie Radikale sind zwar an der Abwehr fremder Organismen sowie am physiologischen Zellstoffwechsel beteiligt, können jedoch auch zur Entstehung verschiedener Erkrankungen beitragen. Dies geschieht vor allem dann, wenn eine Dysbalance zwischen zellulären Abwehrmechanismen und der Radikale vorliegt.

Dieses Phänomen wird „oxidativer Stress“ genannt und stimuliert unter anderem Alterungsprozesse. (Siems et al., 2005, S. 11f)

Die Radikalmessung der teilnehmenden Pharmaziestudierenden erfolgte mit Hilfe des Free Oxygen Radicals Tests (FORT). Alkoxyl- und Peroxyl-Radikale werden hierbei aus dem Blut der ProbandInnen photometrisch quantifiziert. Die Werte werden in Form von FORT Units angezeigt und können im Bereich von 160 bis 600 FORT Units exakt angegeben werden. Als physiologische Radikalbelastung ist, laut Hersteller des Testes, ein Ergebnis bis 310 FORT Units anzusehen. (MICRO-MEDICAL Instrumente GmbH, 2009, S. 15)

Die Entstehung von freien Radikalen wird durch zahlreiche endogene sowie exogene Faktoren gesteuert. Auch Hormone können das Oxidative/Antioxidative-Gleichgewicht beeinflussen. Studien haben gezeigt, dass oxidativer Stress vor allem gegen Ende der Follikel- beziehungsweise Anfang der Lutealphase vermehrt vorliegt. Die steigende Progesteronsynthese soll in der zweiten Phase des Menstruationszyklus dagegen zu einer Erholung der Radikalbelastung führen. (Cornelli et al., 2013, S. 1)

In den folgenden Regressions- und Korrelationsanalysen soll abgeklärt werden, ob der Progesterongehalt im Speichel mit dem FORT-Messwert der Studierenden in Verbindung steht.

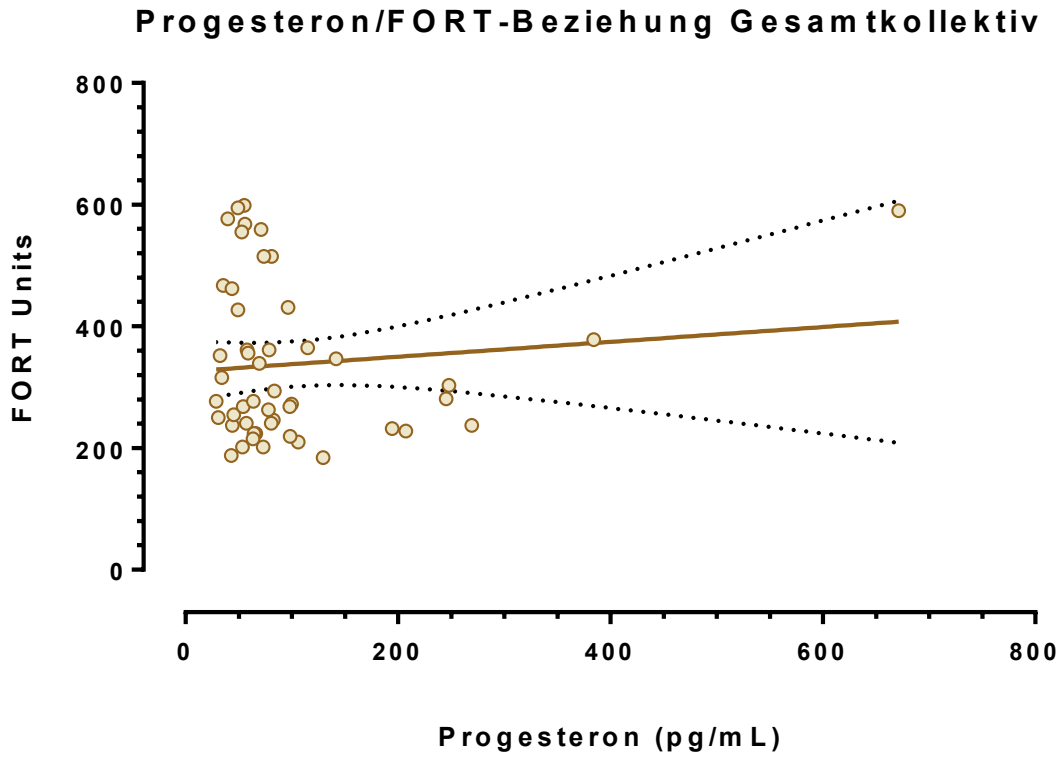


*Abbildung 57: Regressionsanalyse Progesteron/FORT vom Gesamtkollektiv*

*Tabelle 53: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 57*

| | |
|---|---|
| Best-fit values | |
| Slope | 0,1222 ± 0,1709 |
| Y-intercept when X=0.0 | 325,6 ± 25,54 |
| X-intercept when Y=0.0 | -2664 |
| 1/slope | 8,181 |
| 95% Confidence Intervals | |
| Slope | -0,2219 to 0,4663 |
| Y-intercept when X=0.0 | 274,2 to 377,0 |
| X-intercept when Y=0.0 | -infinity to -616,1 |
| Goodness of Fit | |
| R square | 0,01077 |
| Sy.x | 129,2 |
| Is slope significantly non-zero? | |
| F | 0,5117 |
| DFn, DFd | 1,000, 47,00 |
| P value | 0,4779 |
| Deviation from zero? | Not Significant |
| Data | |
| Number of X values | 49 |
| Maximum number of Y replicates | 1 |
| Total number of values | 49 |
| Number of missing values | 125 |

*Tabelle 54: Resultat Korrelationsanalyse Progesteron/FORT vom Gesamtkollektiv*

| | |
|---|---|
| Spearman r | |
| r | -0,1441 |
| 95% confidence interval | -0,4158 to 0,1512 |
| P value | |
| P (two-tailed) | 0,3232 |
| P value summary | ns |
| Exact or approximate P value? | Approximate |
| Significant? (alpha = 0.05) | No |
| Number of XY Pairs | 49 |

Das Gesamtkollektiv zeigt keinen linearen Zusammenhang in der Regressions-analyse ($r^2$=0.0108). Die Korrelationsanalyse nach Spearman ergibt mit r=-0.1411, dass je größer die vorliegende Speichelprogesteronkonzentrationen ist, desto geringer ist die Radikalbelastung. Das Resultat ist allerdings nicht signfikant (P=0.3232).

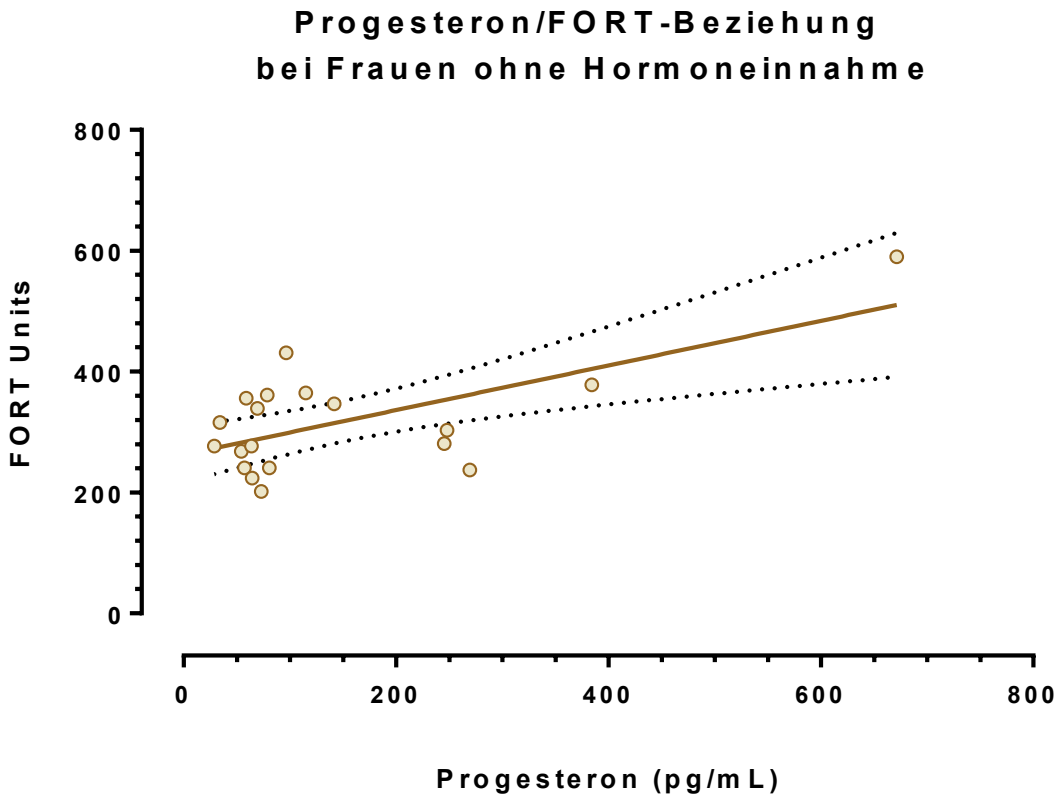


*Abbildung 58: Regressionsanalyse Progesteron/FORT bei Frauen ohne Hormoneinnahme*

*Tabelle 55: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 58*

| | |
|---|---|
| Best-fit values | |
| Slope | 0,3693 ± 0,1038 |
| Y-intercept when X=0.0 | 262,5 ± 22,31 |
| X-intercept when Y=0.0 | -710,8 |
| 1/slope | 2,708 |
| 95% Confidence Intervals | |
| Slope | 0,1503 to 0,5882 |
| Y-intercept when X=0.0 | 215,4 to 309,5 |
| X-intercept when Y=0.0 | -1972 to -382,5 |
| Goodness of Fit | |
| R square | 0,4269 |
| Sy.x | 69,99 |
| Is slope significantly non-zero? | |
| F | 12,66 |
| DFn, DFd | 1,000, 17,00 |
| P value | 0,0024 |
| Deviation from zero? | Significant |
| Data | |
| Number of X values | 19 |

| | |
|---|---|
| Maximum number of Y replicates | 1 |
| Total number of values | 19 |
| Number of missing values | 41 |

*Tabelle 56: Resultat Korrelationsanalyse Progesteron/FORT bei Frauen ohne Hormoneinnahme*

| | |
|---|---|
| Pearson r | |
| r | 0,6534 |
| 95% confidence interval | 0,2832 to 0,8541 |
| R squared | 0,4269 |
| P value | |
| P (two-tailed) | 0,0024 |
| P value summary | ** |
| Significant? (alpha = 0.05) | Yes |
| Number of XY Pairs | 19 |

Frauen, deren FORT-Wert nicht von Hormonpräparaten beeinflusst werden kann, zeigen in der Regressionsanalyse mit $r^2$=0.4269 eine statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Progesteron und freien Radikalen. Auch die Korrelationsanalyse nach Pearson (r=0.6534) ergibt eine direkte Verbindung zwischen den beiden Variablen. Das bedeutet, dass die Progesteronkonzentration im Speichel direkt proportional zur Anzahl von freien Radikalen im Blut ist. Ob die Probandinnen aber tatsächlich oxidativen Stress aufweisen, hängt von deren antioxidativer Kapazität ab.

Im Rahmen der Korrelations- und Regressionsanalyse von Progesteron und Radikalen sind alle Frauen ohne Hormoneinnahme zusätzlich in Abhängigkeit ihrer Zyklusphase kontrolliert worden.

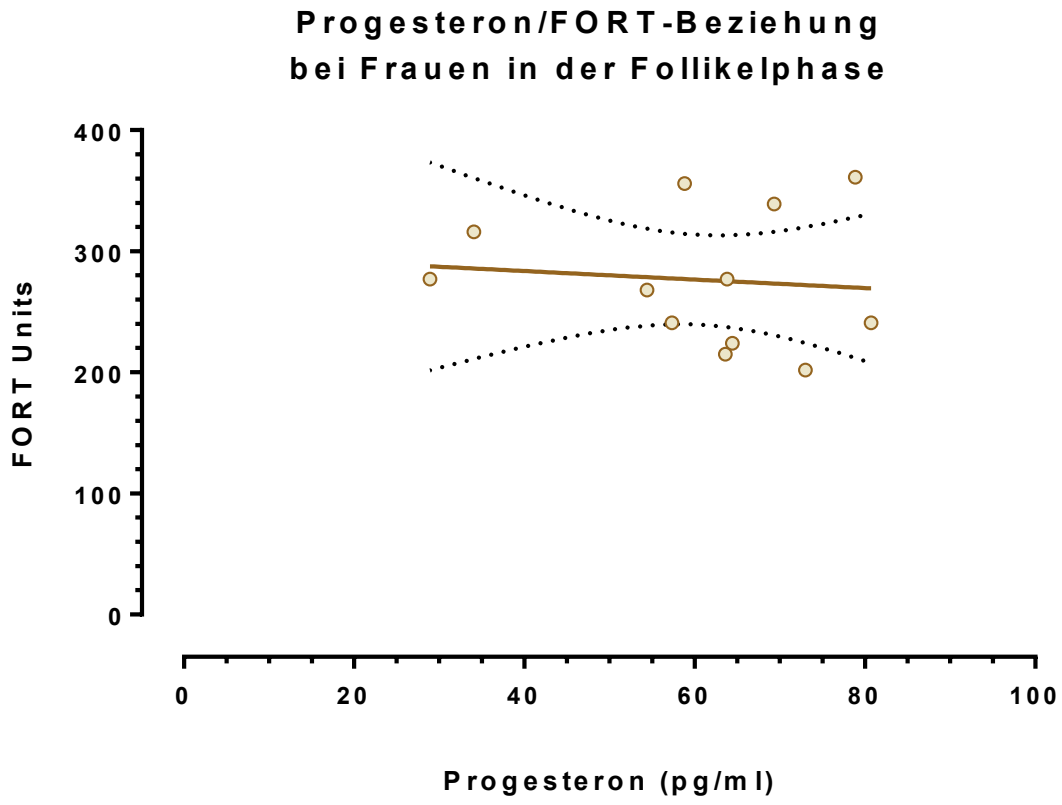


*Abbildung 59: Regressionsanalyse Progesteron/FORT bei Frauen in der Follikelphase*

*Tabelle 57: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 59*

| | |
|---|---|
| Best-fit values | |
| Slope | -0,3514 ± 1,097 |
| Y-intercept when X=0.0 | 297,7 ± 68,54 |
| X-intercept when Y=0.0 | 847,2 |
| 1/slope | -2,846 |
| 95% Confidence Intervals | |
| Slope | -2,796 to 2,093 |
| Y-intercept when X=0.0 | 145,0 to 450,4 |
| X-intercept when Y=0.0 | 158,4 to +infinity |
| Goodness of Fit | |
| R square | 0,01015 |
| Sy.x | 57,68 |
| Is slope significantly non-zero? | |
| F | 0,1026 |
| DFn, DFd | 1,000, 10,00 |
| P value | 0,7554 |
| Deviation from zero? | Not Significant |
| Data | |
| Number of X values | 12 |
| Maximum number of Y replicates | 1 |

| | |
|---|---|
| Total number of values | 12 |
| Number of missing values | 24 |

*Tabelle 58: Resultat Korrelationsanalyse Progesteron/FORT bei Frauen in der Follikelphase*

| | |
|---|---|
| Spearman r | |
| r | -0,1123 |
| 95% confidence interval | -0,6558 to 0,5079 |
| P value | |
| P (two-tailed) | 0,7279 |
| P value summary | ns |
| Exact or approximate P value? | Exact |
| Significant? (alpha = 0.05) | No |
| Number of XY Pairs | 12 |

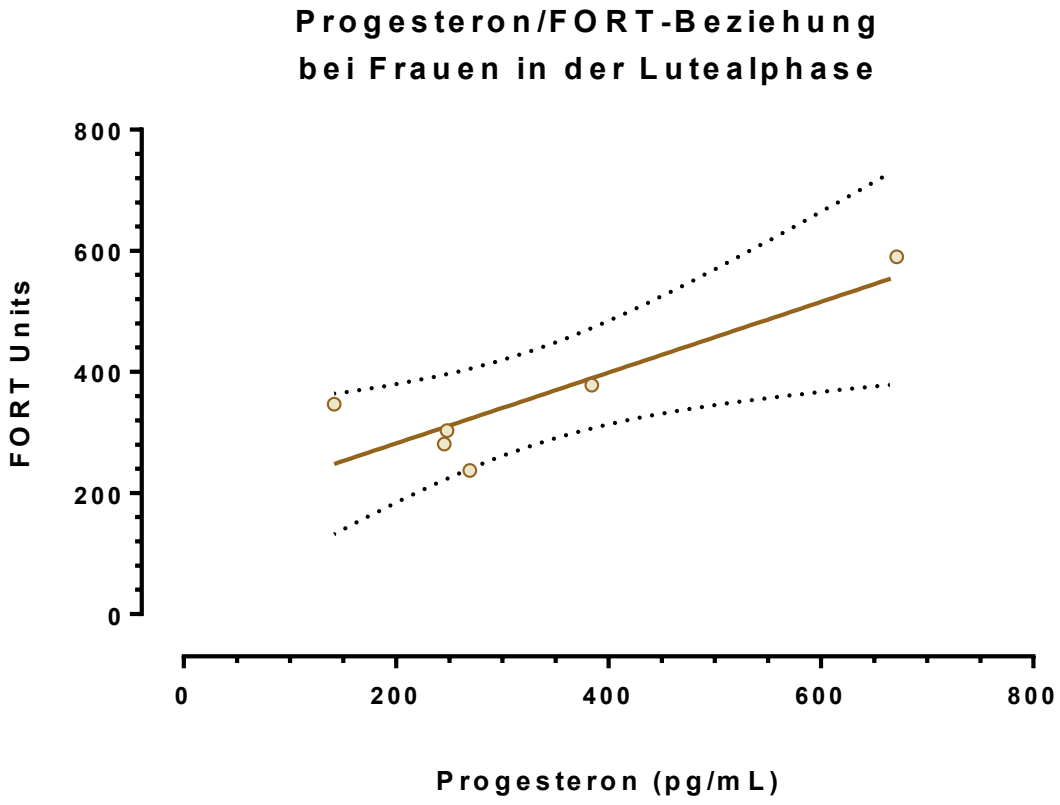


*Abbildung 60: Regressionsanalyse Progesteron/FORT bei Frauen in der Lutealphase*

*Tabelle 59: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 60*

| | |
|---|---|
| Best-fit values | |
| Slope | 0,5841 ± 0,1665 |
| Y-intercept when X=0.0 | 165,2 ± 61,29 |
| X-intercept when Y=0.0 | -282,8 |
| 1/slope | 1,712 |

| | |
|---|---|
| 95% Confidence Intervals | |
| Slope | 0,1218 to 1,046 |
| Y-intercept when X=0.0 | -4,929 to 335,3 |
| X-intercept when Y=0.0 | -2616 to 4,960 |
| Goodness of Fit | |
| R square | 0,7546 |
| Sy.x | 69,14 |
| Is slope significantly non-zero? | |
| F | 12,30 |
| DFn, DFd | 1,000, 4,000 |
| P value | 0,0247 |
| Deviation from zero? | Significant |
| Data | |
| Number of X values | 6 |
| Maximum number of Y replicates | 1 |
| Total number of values | 6 |
| Number of missing values | 15 |

*Tabelle 60: Resultat Korrelationsanalyse Progesteron/FORT bei Frauen in der Lutealphase*

| | |
|---|---|
| Pearson r | |
| r | 0,8687 |
| 95% confidence interval | 0,1936 to 0,9855 |
| R squared | 0,7546 |
| P value | |
| P (two-tailed) | 0,0247 |
| P value summary | * |
| Significant? (alpha = 0.05) | Yes |
| Number of XY Pairs | 6 |

Wie man aus den Abbildungen und statistischen Parametern entnehmen kann, liegt vor allem bei Personen in der Lutealphase ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Gelbkörperhormon und dem FORT-Messwert vor. In der Follikelphase scheint die Radikalbelastung dagegen unabhängig von Progesteron zu sein.

Frühere Diplomarbeiten haben gezeigt, dass Frauen, die Hormonpräparate einnehmen, um einiges höhere Radikalwerte besitzen als nicht hormonell verhütende Frauen (Donhauser, 2010, S. 38). Ob auch ein direkter Zusammenhang mit dem Progesterongehalt im Speichel vorliegt, soll in folgenden Analysen aufgeklärt werden.

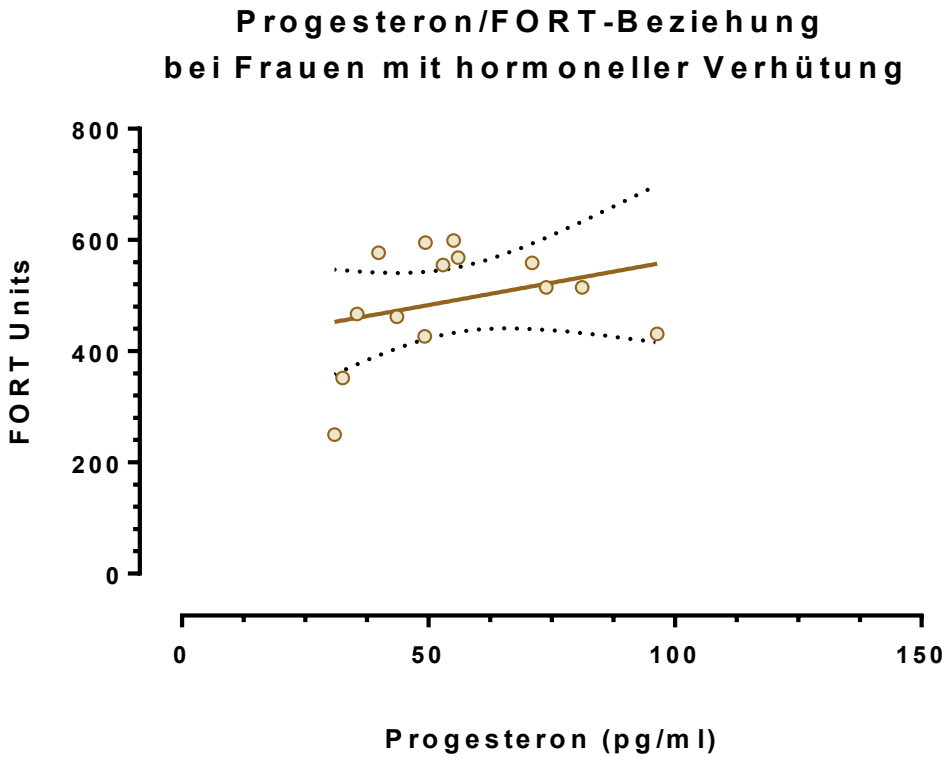


*Abbildung 61: Regressionsanalyse Progesteron/FORT bei Frauen mit hormoneller Verhütung*

*Tabelle 61: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 61*

| | |
|---|---|
| Best-fit values | |
| Slope | 1,601 ± 1,427 |
| Y-intercept when X=0.0 | 403,0 ± 82,71 |
| X-intercept when Y=0.0 | -251,8 |
| 1/slope | 0,6247 |
| 95% Confidence Intervals | |
| Slope | -1,509 to 4,711 |
| Y-intercept when X=0.0 | 222,8 to 583,3 |
| X-intercept when Y=0.0 | -infinity to -48,24 |
| Goodness of Fit | |
| R square | 0,09489 |
| Sy.x | 99,85 |
| Is slope significantly non-zero? | |
| F | 1,258 |
| DFn, DFd | 1,000, 12,00 |
| P value | 0,2840 |
| Deviation from zero? | Not Significant |
| Data | |
| Number of X values | 14 |
| Maximum number of Y replicates | 1 |
| Total number of values | 14 |

| | |
|---|---|
| Number of missing values | 49 |

*Tabelle 62: Resultat  Korrelationsanalyse Progesteron/FORT bei Frauen mit hormoneller Verhütung*

| | |
|---|---|
| Spearman r | |
| r | 0,3476 |
| 95% confidence interval | -0,2408 to 0,7492 |
| P value | |
| P (two-tailed) | 0,2222 |
| P value summary | ns |
| Exact or approximate P value? | Exact |
| Significant? (alpha = 0.05) | No |
| Number of XY Pairs | 14 |

Dieser Vergleich bestätigt frühere Forschungsergebnisse: die Einnahme von Hormonen hat höhere FORT-Werte zufolge. Eine signifikante Korrelation oder Regression liegt in diesem Kollektiv allerdings nicht vor.

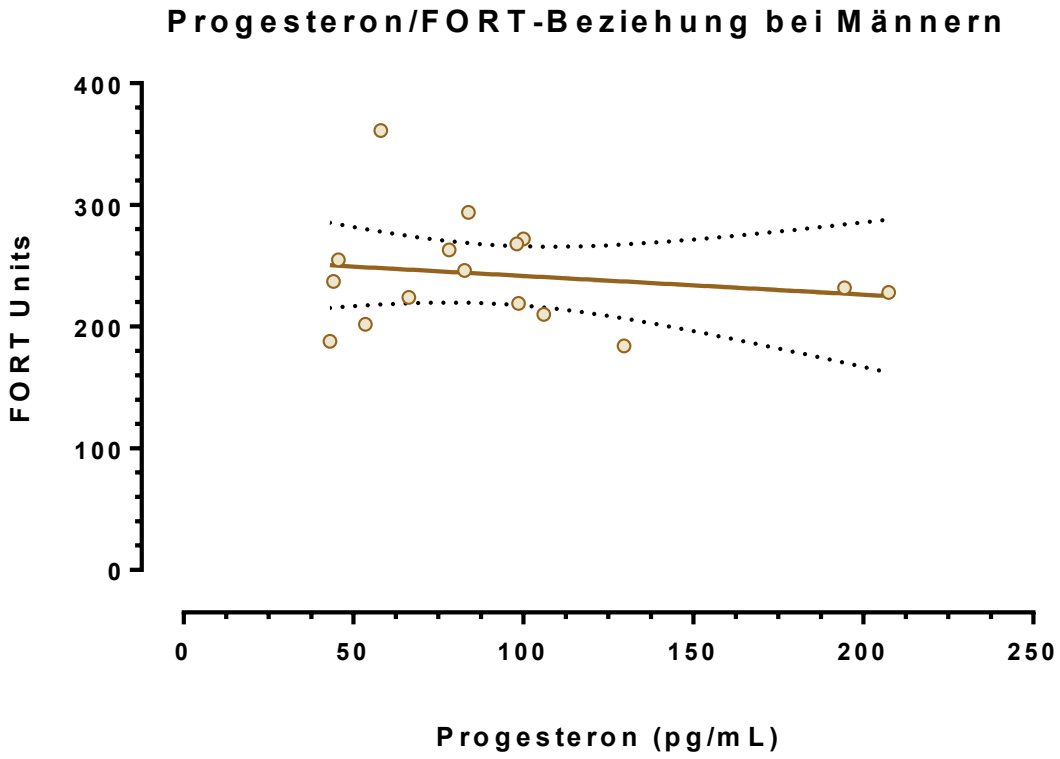


*Abbildung 62: Regressionsanalyse Progesteron/FORT bei Männern*

*Tabelle 63: Resultat Regressionsanalyse zu Abbildung 62*

| | |
|---|---|
| Best-fit values | |
| Slope | -0,1538 ± 0,2367 |
| Y-intercept when X=0.0 | 257,0 ± 24,73 |

| | |
|---|---|
| X-intercept when Y=0.0 | 1671 |
| 1/slope | -6,504 |
| 95% Confidence Intervals | |
| Slope | -0,6615 to 0,3540 |
| Y-intercept when X=0.0 | 204,0 to 310,0 |
| X-intercept when Y=0.0 | 457,6 to +infinity |
| Goodness of Fit | |
| R square | 0,02926 |
| Sy.x | 44,95 |
| Is slope significantly non-zero? | |
| F | 0,4219 |
| DFn, DFd | 1,000, 14,00 |
| P value | 0,5265 |
| Deviation from zero? | Not Significant |
| Data | |
| Number of X values | 16 |
| Maximum number of Y replicates | 1 |
| Total number of values | 16 |
| Number of missing values | 32 |

*Tabelle 64: Resultat Korrelationsanalyse Progesteron/FORT bei Männern*

| | |
|---|---|
| Spearman r | |
| r | -0,07353 |
| 95% confidence interval | -0,5603 to 0,4510 |
| P value | |
| P (two-tailed) | 0,7882 |
| P value summary | ns |
| Exact or approximate P value? | Exact |
| Significant? (alpha = 0.05) | No |
| Number of XY Pairs | 16 |

Laut Analyse nach Spearman weist das Kollektiv der Männer die Tendenz zu einer negativen Korrelation auf. Die Parameter der Regressions- und Korrelationsanalyse sind statistisch unbedeutend.

# 6 Diskussion

## 6.1 Besprechung der Auswertung

Zunächst wurden alle Werte der weiblichen Testpersonen, die laut Fragebogen nicht hormonell verhüten, interpretiert. Anhand der bestimmten Progesteronkonzentrationen war es möglich den Frauen die jeweilige Zyklusphase zuzuordnen. Wie erwartet ist bei Testteilnehmerinnen in der Lutealphase ein höherer Speichelwert vom Gelbkörperhormon dokumentiert worden als bei Probandinnen in der Follikelphase oder hormonell verhütenden Frauen. Im Kollektiv der Männer sind durchschnittlich größere Speichelprogesteronwerte als erwartet nachgewiesen worden. In manchen Probanden wurde sogar eine Progesteronmenge, die üblicherweise bei Frauen nach dem Eisprung vorliegt, festgestellt. Anhand der Ergebnisse des ELISA-Tests ist es somit nicht möglich das Geschlecht der vorliegenden Person in Erfahrung zu bringen. Bei der Gegenüberstellung von Frauen mit oder ohne hormoneller Verhütung und männlichen Probanden konnte ein statistisch signfikanter Unterschied der Testergebnisse herausgefiltert werden.

Welche Lebensstilumstände oder endogene Faktoren Einfluss auf den Progesterongehalt im Speichel haben können, wurde anschließend ermittelt. Dabei ist die Einnahme von Hormonen, das Alter der ProbandInnen, deren sportliche Betätigung beziehungsweise Gewicht und Ernährungsgewohnheiten betrachtet worden. Weiters wurde die Bedeutung von Stress, die Uhrzeit der Speichelprobennahme und die Wichtigkeit von Progesteron auf die Schlafqualität bewertet.

Frauen, die Hormonpräparate zur Verhütung anwenden, besitzen signifikant niedrigere Progesteronwerte als nicht Steroidhormon einnehmende Testteilnehmerinnen. Ob es sich bei den Kontrazeptiva um Kombinationspräparate oder reine Gestagenpharmaka handelt, ist hinsichtlich der Progesteronkonzentration nebensächlich. Es muss allerdings angeführt werden, dass nur vier miteinbezogene Probandinnen mit gestagenhaltigen Präparaten verhüten. Weitere Untersuchungen mit einem größeren Kollektiv sollten daher zukünftig durchgeführt werden. Dasselbe gilt für Schilddrüsenhormon einnehmende Personen. Die Einnahme von

Schilddrüsenhormonen scheint keinen Einfluss auf die vorliegende Menge des Gestagens zu haben. Auch die Anwendungsdauer der Verhütungsmittel ist für die Immunoassay-Ergebnisse nicht von Bedeutung.
Die Probandinnen gaben zwar an, ob sie mit einem Kombinations- oder Gestagenpräparat verhüten, aber in welcher Dosierung die eingenommen Hormone vorliegen, ist nicht bekannt. Korrelationen zwischen großen Mengen an eingenommenen Gestagenen und hohen Progesteronkonzentrationen zu setzen, ist somit nicht möglich.
Bei Nutzung eines Kombinationspräparats (Mikropille) muss auch berücksichtigt werden, dass hier einnahmefreie Tage den Hormonspiegel verändern können. Zwei- oder Dreistufenpräparate versuchen die natürliche Hormonsekretion zu imitieren, indem dementsprechend unterschiedliche Gestagen- und Estrogendosen vorliegen (Aktories et al., 2009, S. 706). Zeitpunkt des Einnahmezyklus und Mikropillen-Typ wurde in der Auswertung des Speichelprogesterons nicht berücksichtigt.
Auch unklar ist, ob die weiblichen Testpersonen die Pharmaka fehlerfrei eingenommen haben. Studien haben gezeigt, dass während der Einnahmepause der Mikropille das Ovar seine Tätigkeit wieder aufnimmt. Je knapper ein Einnahmefehler zur Pillenpause erfolgt, desto höher ist das Risiko für follikuläre Aktivität und damit auch für eine steigende Progesteronkonzentration. (Zapata et al., 2013, S. 891)

Im Rahmen der Untersuchung konnten keine voneinander abweichenden Ergebnisse in den beiden Alterskategorien < 25 beziehungsweise ≥ 25 dargelegt werden. Da der Speichel-ELISA-Test hauptsächlich an freiwilligen Studierenden durchgeführt wurde, liegt das Durchschnittsalter bei 26 Jahren. Bei den teilnehmenden Testpersonen gab es somit auch keine großen Altersunterschiede.

Laut Auswertung der Fragebögen führt etwa die Hälfte aller ProbenspenderInnen mindestens zwei Mal wöchentlich Sport aus. In welcher Intensität die ProbandInnen Sport ausüben, ist nicht bekannt. Da im Rahmen der Auswertung keine statistisch relevanten Unterschiede der Progesteronwerte vorliegen, kann angenommen werden, dass auch bei regelmäßiger körperlicher Betätigung die Hormonproduktion nicht beeinträchtigt wird. Aussagen über den Einfluss des Gewichts auf den Progesteronspiegel im Speichel sind insofern schwierig zu treffen, da nur wenige bis gar keine unter- oder übergewichtige ProbandInnen am Test teilgenommen haben.

Dennoch sind bei den getesteten Personen mit einem BMI unter oder über den Normbereich keine auffallend abweichenden Konzentrationen zu Normalgewichtigen registriert worden. Auch in der Literatur beschriebene Progesteronsspeicheltests zeigen, dass keine Beziehung zwischen dem Hormonspiegel und dem Body-Mass-Index vorliegt (Konishi et al., 2012, S. 240).

Lebensstilfaktoren wie Ernährung und eine vorliegende Stresssituation haben ebenfalls keine Auswirkungen auf Poduktions- oder Sekretionsrate von Progesteron. Der Hormongehalt im Speichel bleibt durch Fleischkonsum und äußere oder persönliche Stressoren unbeeinflusst. Da Stress subjektiv wahrgenommen wird und jede Person unterschiedlich belastbar gegenüber Stressfaktoren ist, kann ein direkter Bezug von Stress auf den Progesteronspiegel trotzdem nicht ausgeschlossen werden.

Das lebenswichtige Steroidhormon Cortisol wird unter Stress vermehrt gebildet, um dem Körper die nötige Energie in Stresssituationen zu liefern. Leicht erhöhte Cortisolkonzentrationen können daher daraufhin deuten, dass sich die getestete Person in einer stressigen Lage befindet. Mittels Korrelations- und Regressionsanalysen von Cortisol und Progesteron ist es somit möglich herauszufinden, ob sich die Speichelkonzentration von Progesteron stressabhängig verändert. Obwohl vergangene Untersuchungen einen direkten Zusammenhang zwischen dem Gelbkörperhormon und Cortisol beziehungsweise Stresssituationen in manchen Kollektiven bewiesen haben (Wirth et al., 2007, S. 104), konnte diese Annahme durch die durchgeführten Analysen nicht belegt werden. Zu beachten ist, dass die Cortisolfreisetzung einem circadianen Rhythmus folgt. Da nicht alle ProbandInnen zum selben Zeitpunkt ihre Probe abgegeben haben, könnten tageszeitliche Schwankungen von Cortisol Korrelations- und Regressionsanalyse beeinträchtigt haben.

In vergangenen Untersuchungen wurde eine sedativ ähnliche Wirkung durch externes Progesteron beobachtet (Söderpalm et al., 2004, S. 352). Dieser Effekt taucht sowohl bei Frauen, als auch bei Männern auf. Ob auch endogen produziertes Progesteron aus dem Speichel Erschöpfung und Schlaf herbeiführen kann, wurde mit Hilfe des Fragebogens abgeklärt. Hierbei wurde zwar die subjektive Schlafqualität der ProbandInnen erfasst, jedoch wurde keine objektive Bewertung, wie beispielsweise

durch Pulsmessung oder einem EEG, des Schlafes durchgeführt. Die Analysen zeigen, dass die Progesteronkonzentration im Speichel nicht im Zusammhang mit subjektiven Schlafproblemen steht.

Um die Quantifizierungsmethode von Progesteron aus dem Speichel durchzuführen, kann der Zeitpunkt der Probennahme vernachlässigt werden. Im Zuge der Auswertung ist hier kein Unterschied die Uhrzeit betreffend festgestellt worden.

Damit eine eventuell vorhandene Abhängigkeit Progesterons von anderen endogenen Faktoren aufgezeigt werden kann, sind neben Cortisol zusätzlich Korrelations- und Regressionsanalysen mit dem Testosterongehalt und der Radikalbelastung durchgeführt worden. Testosteron- und Progesteronspiegel im Speichel nehmen laut Auswertung des Gesamtkollektivs gemeinsam ab und zu. Die beiden Sexualhormone korrelieren daher miteinander. Die Streuung um die erstellte Regressionsgerade ist allerdings stark ausgeprägt und die lineare Regressionsanalyse ergibt keine signfikanten Ergebnisse. Auch die im Anschluss gebildeten Teilkollektive Männer, Frauen mit beziehungsweise ohne Verhütung weisen keine statistisch relevanten Zusammenhänge auf. Ob sich die nachgewiesenen Testosteronwerte im vom Test vorgegebenen Normbereich befinden, wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Außerdem wurde bei den Analysen nicht beachtet, dass die Freisetzung des männlichen Sexualhormons einem zirkadianen Rhythmus folgt. Die Abgabe der Speichelproben für den Testosterontest wurde parallel zur Progesteronprobennahme durchgeführt und hat damit nicht bei allen Studierenden zum gleichen Zeitpunkt statt gefunden.

Ein Zusammenhang zwischen Progesteron und freien Radikalen konnte mittels FORT-Messung der am Test teilnehmenden Pharmaziestudierenden nicht belegt werden. Bei der Analyse aller Frauen, die nicht hormonell verhüten, konnte allerdings eine lineare Regression nachgewiesen werden. Der ermittelte Korrelationskoeffizient nach Pearson zeigt, dass in dieser Gruppe die Menge vom Speichelprogesteron in einer direkten Beziehung zur Radikalbelastung steht. Vor allem Frauen in der Lutealphase zeigen diesen linearen Zusammenhang. Bei Frauen in der Follikelphase geht eine zunehmende Progesteronkonzentration dagegen nicht mit höheren Mengen freier

Radikale einher. Dasselbe gilt für hormonell verhütende Probandinnen und männnliche Testpersonen.

Mit Hilfe des Fragebogens wurden auch Wohngegend und vorangegangene Medikamenteneinnahmen der TestteilnehmerInnen erfasst. Weil die Fallzahl der einzelnen Teilkollektive sehr gering war und kein nennenswertes Ergebnis der Daten ermittelt wurde, sind keine Resultate der Auswertung in Abschnitt 4 angeführt worden. Ob noch andere Gegegebenheiten der Lebensführung Auswirkungen auf die gemessene Speichelprogesteronmenge von Männern und Frauen haben, bleibt offen. Weitere Untersuchungen und Analysen sind nötig, um beeinflussende Parameter und Zusammenhänge mit endogenen Faktoren aufzudecken.
Abschließend muss erwähnt werden, dass insgesamt nur 77 ProbandInnen mittels dem Speichelprogesteron-Immunoassay vermessen wurden. Die einzelnen Kollektive, vor allem „Frauen in der Lutealphase“ und „Frauen in der Follikelphase“, beinhalten daher ebenfalls nur wenige Testpersonen. Um repräsentative Ergebnisse zu erlangen, wäre es sinnvoll, eine größere Zahl von Frauen mit und ohne hormoneller Verhütung sowie Männer auf deren Progesteronkonzentration im Speichel zu testen.

## 6.2 Beurteilung der Testmethode

Bei der Quantifizierungsmethode von Progesteron sind trotz fehlerfreier Durchführung nach der Bedienungsanleitung des ELISA-Tests Hormonkonzentrationen erfasst worden, die von der vorgegebenen Normwerttabelle abweichen. Alle Test-teilnehmerInnen haben sich vor Probenabgabe zwar die Mundhöhle mit Wasser ausgewaschen, jedoch ist nicht nachvollziehbar, wie sorgfältig dieser Vorbereitungsschritt ausgeführt wurde. Auch unbekannt ist, ob die ProbandInnen vorher gegessen oder getrunken haben. Lebensmittel können den Speichel-pH-Wert verändern und somit validierbare Salivamessungen erschweren. Literaturrecherchen haben ergeben, dass eine pH-Wert-Senkung zu erhöhten Speichelprogesteronwerten führt (Gröschl et al., 2001, S. 738). Zukünftige Gestagenbestimmungen aus dem Speichel sollten nüchtern durchgeführt werden, um Nahrungsmitteleinflüsse ausschließen zu können.
Mindestens eine halbe Stunde vor Speichelabgabe sollte der Proband oder die Probandin nicht Zähne putzen oder Mundspülungen anwenden (IBL International

GmbH, 2012, S. 2). Im Rahmen der Untersuchung ist diese Vorkehrung nicht explizit getroffen worden. Die Pflege der Zähne soll zwar keine Auswirkung auf die Speichelkonzentration von Steroidhormonen haben (Gröschl et al., 2001, S. 738), allerdings kann es durch Zähneputzen zu kleinen Mundverletzungen kommen und dadurch die Proben durch Blut kontaminiert werden.
Laut Beilage des Testkits können bei mit Blut verunreinigten Salivaproben erhöhte Progesteronwerte auftreten (IBL International GmbH, 2012, S. 5). Obwohl vor Beginn des Immunoassays jedes einzelne Probengefäß auf eine rötliche Färbung kontrolliert wurde, könnte mit Blut kontaminierter Speichel Grund für zu hohe Ergebniswerte gewesen sein. Auch andere Veruneinigungen des Speichels können nicht zur Gänze ausgeschlossen werden.
Um überhöhte Ergebnisse zu vermeiden und vergleichbare Speichelprogesteron-konzentrationen ohne großer Streuung zu erlangen, sollten für alle Proben-spenderInnen idente Bedingungen vor der Speichelabgabe festgesetzt werden.

Im Zuge der Diplomarbeit wurden hauptsächlich Einzelbestimmungen der Speichelproben durchgeführt. Pipettierfehler und Außenkontaminationen sind dadurch eventuell nicht erkannt worden. Speichelproben sollten daher in zukünftigen Untersuchungen doppelt oder dreifach gemessen werden.
Weiters könnte auch ein nicht sorgsam ausgeführter Waschvorgang zu verfälschten Werten geführt haben. Hierbei besteht vor allem das Risiko von Flüssigkeits-rückständen und Beschädigung der Wells während des Waschvorganges. (IBL International GmbH, 2012, S. 3f)

Warum vor allem beim männlichen Geschlecht höhere Speichelprogesteron-konzentrationen nachgewiesen wurden, ist unklar. Trotz geringer Kreuzreaktivität (0.02%) könnte die Ursache für dieses Analysenergebnis männliche Sexualhormone, wie Androstendion oder Testosteron, gewesen sein.

Der Progesteron Saliva ELISA-Test ist insofern gegenüber invasive Methoden vorteilhaft, weil ausschließlich der physiologisch aktive Anteil des Steroidhormons erfasst wird. Zudem können Speicheltests bequem von zuhause durchgeführt werden, wodurch die Probenabgabe stressfrei abläuft (Gröschl et al., 2001, S. 737). Allerdings besteht durch oben genannten Fehlerquellen das Risiko verfälschter Werte. Die

Bestimmungsmethode des Gelbkörperhormons hat gezeigt, dass eine exakte Testvorbereitung sowie -durchführung Voraussetzungen für repräsentative Ergebnisse sind. Die Salivaprogesteronmessung kann im Zusammenhang dieser Diplomarbeit nicht als robust bezeichnet werden. Zuverlässige Ergebnisse mittels der Quantifizierungsmethode aus dem Speichel können nur gewonnen werden, wenn das komplette Verfahren standardisiert abläuft und etwaige Einflussfaktoren berücksichtigt werden.

# 7 Conclusio

Das physiologische Gestagen Progesteron gilt als eines der wichtigsten Sexualhormone der Frau. Das beinahe gesamte weibliche Reproduktionssystem steht unter Kontrolle von Progesteron. Aus diesem Grund wird oftmals der Gehalt des Hormons bestimmt, um Zyklusstörungen zu diagnostizieren oder erforderliche Progesteronmengen zu kontrollieren. Die Quantifizierung im Speichel stellt dabei eine unkomplizierte, schnelle Methode mit wenig apparativem Aufwand dar.

Durch die zyklusabhängige Progesteronproduktion kann man anhand der Speichelprogesteronwerte die Zyklusphase der Frauen feststellen. Zwischen weiblichen Testpersonen, die hormonell verhüten, Frauen mit niedrigen Progesteron-spiegeln in der ersten Phase des Menstruationszyklus und Männern können keine unterschiedlichen Salivawerte festgestellt werden. Frauen nach dem Eisprung weisen signifikant höhere Speichelkonzentrationen von Progesteron auf.

Zusammensetzung und Einnahmedauer von Hormonpräparaten zur Kontrazeption haben keine Auswirkung auf die Progesteronmenge. Dem Alter der Testpersonen, deren sportliche Betätigung, Körpergewicht, Ernährung und vorhandenen Stresssituationen konnten ebenfalls keinen Einfluss auf den Hormongehalt nachgewiesen werden.

Regressionsanalysen mit Cortisol und Testosteron zeigen, dass kein linearer Zusammenhang zwischen Progesteron und den anderen beiden Steroidhormonen besteht. Eine geringe Korrelation zu Testosteron konnte im Rahmen der Auswertung offen gelegt werden. Desweiteren demonstrieren Frauen nach der Ovulation einen direkten Zusammenhang von hohen Speichelprogesteronwerten und freien Radikalen im Blut. Dieses Phänomen taucht bei Frauen mit niedrigen Progesteronmengen sowie bei männlichen Testteilnehmern nicht auf.

Der im Rahmen der Diplomarbeit angewandte ELISA-Test ist zwar praktikabel, kann allerdings durch Verunreinigungen der Proben und nicht nachweisbaren Fehlerquellen leicht zu Ausreißerwerten führen. Zukünftige Untersuchungen sollten die Speichel-progesteronmessung mehrmals durchführen, um die pulsatile Sekretion des Hormons zu berücksichtigen. Bei der Quantifizierung von Progesteron als diagnostisches Mittel wäre es außerdem sinnvoll Informationen über den vorliegenden Zyklustag der gemessenen Frauen zu erhalten.

# 8 Literaturverzeichnis


Ahrens, K., Vladutiu, C., Mumford, S., Schliep, K., Perkins, N., Wactawski-Wende, J., & Schisterman, E. (Feb 2014). The effect of physical activity across the menstrual cycle on reproductive function. *Annals of Epidemiology*, S. 127-134.

Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., & Starke, K. (2009). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* München: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag .

Ammon, H. (2004). *Hunnius: Pharmazeutisches Wörterbuch.* Berlin: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG.

Baker, F., & Driver, H. (Sep 2007). Circadian rhythms, sleep, and the menstrual cycle. *Sleep Medicine*, S. 613-622.

Bitzer, J. (01. Dez 2010). Progesterone, progestins and psychosomatic health of women. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, S. 477-480.

Childs, E., Van Dam, N., & de Wit, H. (Feb 2010). Effects of acute progesterone administration upon responses to acute psychosocial stress in men. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, S. 78-86.

Cornelli, U., Belcaro, G., Cesarone, M., & Finco, A. (02. Aug 2013). Analysis of oxidative stress during the menstrual cycle. *Reproductive Biology and Endocrinology*, S. 1-6.

Diedrich, K., Holzgreve, W., Jonat, W., Schneider, K.-T., & Weiss, J. (2007). *Gynäkologie & Geburtshilfe.* Heidelberg: Springer Medizin Verlag.

Donhauser, L., Diplomarbeit Universität Wien (Jul 2010). Untersuchungen zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspecies bei der kontinuierlichen Einnahme ausgewählter Hormonpräparate . Wien.

Fiala, C., & Schweiger, P. (2015). *Österreichischer Verhütungsreport 2015.* Wien: Gynmed Ambulatorium Wien.

Forth, W., Henschler, D., & Rummel, W. (2001). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* München: Urban & Fischer Verlag.

Gerok, W., Huber, C., Meinertz, T., & Zeidler, H. (2007). *Die Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt.* Stuttgart: Schattauer GmbH.

GmbH, M.-M. I. (01. Jul 2009). FORM Free Oxygen Radicals Monitors. Königstein.

GraphPad Software, Inc. (2015). *GraphPad Statistics Guide*. Abgerufen am 22. Jän 2016 von http://www.graphpad.com/guides/prism/6/statistics/index.htm?stat_how_it_works_rout_method.htm

Gröschl , M., Rauh, M., Schmid, P., & Dörr, H.-G. (3. Sep 2001). Relationship between salivary progesterone, 17-hydroxyprogesterone, and cortisol levels throughout the normal menstrual cycle of healthy postmenarcheal girls. *Fertility and Sterility*, S. 615-617.

Gröschl, M., Wagner, R., Rauh, M., & Dörr, H. (Oct 2001). Stability of salivary steroids: the influences of storage, food and dental care. *Steroids*, S. 737-741.

IBL International GmbH. (20. Jän 2012). Progesterone Saliva ELISA: Instructions for Use.

Jasienska, G., & Ellison, P. (7. Oct 1998). Physical work causes suppression of ovarian function in women. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, S. 1847-1851.

Konishi, S., Brindle, E., Guyton, A., & O'Connor, K. (Oct 2012). Salivary Concentration of Progesterone and Cortisol Significantly Differs Across Individuals After Correcting for Blood Hormone Values. *American Journal of Physical Anthropology*, S. 231-241.

Kozloski, M., Schumm, P., & McClintock, M. (01. Nov 2014). The utility and dynamics of salivary sex hormone measurements in the National Social Life, Health, and Aging Project, Wave 2. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci*, S. 215-228.

Labhart, A. (1978). *Klinik der inneren Sekretion.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

Leidenberger, F., Strowitzki, T., & Ortmann, O. (2014). *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

Marischler, C. (2007). *BASICS Endokrinologie.* München: Elsevier GmbH.

Meulenberg, P., & Hofman, J. (Jan 1989). Salivary progesterone excellently reflects free and total progesterone in plasma during pregnancy. *Clinical Chemistry*, S. 168-172.

MICRO-MEDICAL Instrumente GmbH. (01. Jul 2009). FORM Free Oxygen Radicals Monitors. Königstein.

Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H., & Schäfer-Korting, M. (2001). *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.* Stuttgart: Wissenschaftliche VerlagsgesmbH.

Nóbrega, L., Azevedo, G., Lima, J., Ferriani, R., Spritzer, P., Sá, M., & Maranhaó, T. (Nov 2009). Analysis of testosterone pulsatility in women with ovulatory menstrual cycles. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, S. 1040-1046.

Raem, A., & Rauch, P. (2007). *Immunoassays.* München: Elsevier GmbH.

Reinwein, D., Benker, G., & Jockenhövel, F. (2000). *Checkliste Endokrinologie und Stoffwechsel.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Runnebaum, B., & Rabe, T. (1994). *Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin: Band 1: Gynäkologische Endokrinologie.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

Schumacher, M., Hussain, R., Gago, N., Oudinet, J.-P., Mattern, C., & Ghoumari, A. (08. Feb 2012). Progesterone synthesis in the nervous system: implications for myelination and myelin repair. *Frontiers in Neuroscience*, S. 1-22.

Sharkey, K., Crawford, S., Kim, S., & Joffe, H. (Jun 2014). Objective Sleep Interruption and Reproductive Hormone Dynamics in Menstrual Cycle. *Sleep Medicine*, S. 688-693.

Shechter, A., Varin, F., & Boivin, D. (May 2010). Circadian variation of sleep during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. *Sleep*, S. 647-656.

Siems, W., Krämer, K., & Grune, T. (2005). *Oxidativer Stress und Pharmaka.* Eschborn: Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH.

Silbernagl, S., & Despopoulos, A. (2012). *Taschenatlas Physiologie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

Silbernagl, S., & Lang, F. (2005). *Taschenatlas der Pathophysiologie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

Söderpalm, A., Lindsey, S., Purdy, R., Hauger, R., & de Wit, H. (Apr 2004). Administration of progesterone produces mild sedative-like effects in men and women. *Psychoneuroendocrinology* , S. 339-354.

Steinhilber, D., Schubert-Zsilavecz, M., & Roth, H. (2005). *Medizinische Chemie: Targets und Arzneistoffe.* Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag.

Sung, E., Han, A., Hinrichs, T., Vorgerd, M., Manchado, C., & Platen, P. (11. Nov 2014). Effects of follicular versus luteal phase-based strength training in young women. *Springerplus*, S. 1-10.

Träger, L. (1977). *Steroidhormone: Biosynthese, Stoffwechsel, Wirkung.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

Usman, S., Indusekhar, R., & O'Brien, S. (22. Apr 2008). Hormonal management of premenstrual syndrome. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, S. 251-260.

Walker, R., Read, G., & Riad-Fahmy, D. (Dez 1979). Radioimmunoassay of Progesterone in Saliva: Application to the Assessment of Ovarian Function. *Clinical Chemistry*, S. 2030-2033.

Warren, M., & Perlroth, N. (Jul 2001). The effects of intense exercise on the female reproductive system. *Journal of Endocrinology*, S. 3-11.

Westhoff, C., Torgal, A., Mayeda, E., Pike, M., & Stanczyk, F. (Jun 2010). Pharmacokinetics of a combined oral contraceptive in obese and normal-weight women. *Contraception*, S. 474-480.

Wirth, M., Meier, E., Fredrickson, B., & Schultheiss, O. (Jan 2007). Relationship between salivary cortisol and progesterone levels in humans. *Biological Psychology*, S. 104-107.

Zapata, L., Steenland, M., Brahmi, D., Marchbanks, P., & Curtis, K. (May 2013). Effect of missed combined hormonal contraceptives on contraceptive effectiveness: a systematic review. *Contraception*, S. 685-700.

Zöfel, P. (2001). *Statistik verstehen: Ein Begleitbuch zur computergestützten Anwendung.* München: Addison-Wesley Verlag.

„Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zu Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir."

# Anhang

## Zusammenfassung

Das Steroidhormon Progesteron wurde aus dem Speichel von ProbandInnen mit Hilfe eines ELISA-Tests bestimmt. Im Rahmen der Diplomarbeit wurde untersucht, welche exogenen oder endogenen Faktoren die Hormonkonzentration beeinflussen können. Weiters sind Korrelations- und Regressionsanalysen mit anderen Steroidhormonen und freien Radikalen durchgeführt worden.

Insgesamt wurden 77 freiwillige Testpersonen in die Auswertung miteinbezogen. Alle TeilnehmerInnen haben anonym eine Speichelprobe abgegeben und einen Fragebogen ausgefüllt.

Der Salivagehalt von Progesteron hängt vom Geschlecht, Zyklusstatus der Frauen und der Einnahme von Hormonpräparaten zur Kontrazeption ab. Frauen in der Follikelphase weisen signifikant niedrigere Progesteronmengen auf als Probandinnen in der Lutealphase. Hormonell verhütende Frauen und Männer besitzen einen Speichelhormonspiegel im Bereich von Teilnehmerinnen, die sich in der ersten Phase des Menstruationszyklus befinden. Unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich Zusammensetzung und Einnahmedauer der Kontrazeptiva sind nicht aufgezeigt worden. In dieser Untersuchung konnten Alter, Stress und modifizierbare Lebensgewohnheiten, wie Ernährung und Sport, nicht als beeinflussende Faktoren der Progesteronkonzentration registriert werden.

Ein geringer Zusammenhang ist zwischen Progesteron und dem, ebenfalls aus dem Speichel bestimmten, Steroidhormon Testosteron vorhanden. Zwischen dem Progesterongehalt und der Speichelcortisolmenge besteht keine Verbindung. Im Gegensatz zu allen anderen ProbandInnen weisen Frauen in der Lutealphase eine direkte Korrelation zwischen der Progesteronkonzentration und freien Radikalen auf.

Der Progesteron Saliva ELISA-Test ist eine schnelle Quantifizierungsmethode, die durch die untersuchten Einflussfaktoren kaum beeinträchtigt wird. Allerdings hat sich herausgestellt, dass die Ergebnisse leicht durch eine unsorgfältige Probenabgabe oder anderen nicht nachweislichen Fehlerquellen verfälscht werden können.

# Abstract

The concentration of salivary progesterone was determined using a competitive ELISA-test. Objective of the assay is to detect exogenous or endogenous causes that affect the hormone concentration. Furthermore correlations and regressions between progesterone and other steroid hormones or free radicals are discussed.

77 volunteers were admitted for measurement. All subjects completed a questionnaire and their participation has been anonymous.

Women after the ovulation show significant higher progesterone levels than the remaining collective. Data analysis revealed no differences between men and female participants during luteal phase or those who are taking hormonal contraceptions. In this context composition of hormone preparation and duration of intake is irrelevant. There are no evidences for progesterone to increase or decrease due to age, stress, nutrition or physical activity.

Interestingly, the research demonstrates that the steroid hormones progesterone and testosterone tend to correlate with each other. Nevertheless, neither linear regression analysis of salivary progesterone and testosterone, nor analysis of progesterone and cortisol present statistically significant results. However, the findings suggest significant positive correlation between progesterone and the amount of free radicals among women in luteal phase.

The direct determination of progesterone from saliva can be considered as a simple, stress-free and non-invasive method of hormone quantification. Despite missing verifications of considered influencing factors, these measurements seem to be very sensitive to saliva contamination and any modification of the test procedure. In conclusion, utilization of the progesterone saliva ELISA-test may be a good alternative to plasma determination, provided that the collection of samples takes place carefully and the test is performed following the instructions.

# Fragebogen

**Department für klinische Pharmazie**
**und chemische Diagnostik**
Fakultät für Lebenswissenschaften

universität wien

## *Fragebogen Testosteron und Progesteron*

Datum: _____ Uhrzeit: _____ Code: _____

Geschlecht: ☐ weiblich ☐ männlich Alter: _____Jahre
Gewicht: _____ kg Körpergröße: _____cm
Wohngegend: ☐ Stadt ☐ Stadtrand ☐ Land

- Betreiben Sie regelmäßig (mindestens zwei Mal pro Woche) Sport? ☐ ja ☐ nein
- Wie sieht Ihre Ernährung aus? ☐ fleischhaltig: ☐ mind. 1 x pro Tag
  ☐ mind. 1 x pro Woche
  ☐ seltener
  ☐ vegetarisch
  ☐ vegan
- Befinden Sie sich momentan in einer besonders stressreichen Situation? ☐ ja ☐ nein
- Haben Sie einen ausgewogenen, tiefen Schlaf? ☐ ja ☐ nein
- Hatten Sie schon einmal Probleme mit unreiner Haut (Akne etc.)? ☐ ja ☐ nein
- Nehmen Sie Hormonpräparate?

  Wenn ja, bitte ankreuzen: ☐ Östrogene / Gestagene
  ☐ Gestagene
  ☐ Schilddrüsenhormone

  Seit wann nehmen Sie Hormonpräparate? _____

  Wenn nein, haben Sie innerhalb des letzten Jahres Hormonpräparate eingenommen?

  ☐ ja ☐ nein

  Wenn ja, bitte ankreuzen: ☐ Östrogene / Gestagene
  ☐ Gestagene
  ☐ Schilddrüsenhormone

Messergebnis: Testosteron: _____ pg / ml
Progesteron: _____ pg / ml