

Aus der Medizinischen Klinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

**Ein Radioimmunoassay (RIA)
für die Messung von Dehydroepiandrosteron
(DHEA) im Speichel**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Tobias Fischer
aus Heilbronn

Würzburg, Januar 2004

Referent: Professor Dr. med. B. Allolio

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. E. Blind

Dekan: Professor Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2004

Der Promovend ist Assistenzarzt.

Abkürzungsverzeichnis:

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
B/B0	Verhältnis des gebundenen Anteils von Antigen an Antikörper (Ag-Ak-Komplexen) zum Nullstandard
DHEA(-S)	Dehydroepiandrosteron (-sulphat)
MCR	Metabolische Clearancerate
NNR	Nebennierenrinde
NSB	Nicht spezifische Bindung
RIA	Radioimmunoassay
RT	Raumtemperatur
TA	Total(radio)aktivität eines RIA-Ansatzes
VC	Variationskoeffizient

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	1
1.1	Dehydroepiandrosteron (DHEA)	1
1.1.1	Molekül und chemische Eigenschaften	1
1.1.2	Produktion	2
1.1.3	Metabolismus	3
1.1.4	Physiologische und therapeutische Wirkung	4
1.1.5	Konzentrationsverlauf	5
1.2	Physiologie und klinische Bedeutung von Steroidhormonen im Speichel	9
1.3	Bindungsassays und Radioimmunoassay (RIA)	11
1.3.1	Bindungsassay	11
1.3.2	Prinzip des Radioimmunoassays	14
1.4	Fragestellung	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Puffer	17
2.1.2	Antikörper	17
2.1.3	Tracer	18
2.1.4	Standards und Kontrollen	18
2.1.5	Inkubation	19
2.1.6	Trennung von freiem und antikörpergebundenem DHEA	20
2.1.7	Probengewinnung und Probenvorbereitung	20
2.2	Methoden	22
2.2.1	Radioimmunoassay	22
2.2.2	Spezifität	23
2.2.3	Statistische Verfahren	23

3	Ergebnisse	25
3.1	Originalstandardkurve	25
3.2	Reproduzierbarkeit der Standardkurve	26
3.3	Sensitivität	26
3.4	Messpräzision (Interassayvarianz und Intraassayvarianz)	26
3.5	Linearität der Verdünnung	28
3.6	Genauigkeit nach Zugabe von DHEA (accuracy)	28
3.7	Korrelation von Serum und Speichelproben	30
3.8	DHEA im Speichel von Erwachsenen	31
3.9	DHEA im Speichel von Klein- und Schulkindern	33
3.10	Speichelkonzentration nach Substitution von DHEA und Estradiol i.m.	35
3.11	Richtlinien zur Speichelprobengewinnung und deren Verarbeitung	36
4	Diskussion	38
5	Zusammenfassung	44
5.1	Serum- und Speichelassay-Protokolle im Vergleich	46
6	Literaturverzeichnis	47

1 Einleitung

1.1 Dehydroepiandrosteron (DHEA)

1.1.1 Molekül und chemische Eigenschaften

Das 1934 zum ersten Mal von A. Butenandt isolierte Hormon Dehydroepiandrosteron (3 β -hydroxy-5-androsten-17-on), ein ungesättigtes Hydroxyketon, geriet in den letzten Jahren immer mehr in das Blickfeld der medizinischen Forschung und wurde auch in der Gesundheitspresse des Öfteren thematisiert. Dieses C-19-Steroid ist zusammen mit seiner konjugierten Form, dem Dehydroepiandrosteron-Sulphat (im folgenden DHEA-S genannt), das mengenmäßig häufigste Steroidhormon im menschlichen Kreislauf.¹ Dabei übersteigt die Serumkonzentration von DHEA-S diejenige von Dehydroepiandrosteron (im folgenden DHEA genannt) um das 300- bis 500fache.² Bei jungen Menschen beträgt die durchschnittliche Serumkonzentration für DHEA 1 bis 4 ng/ml, für DHEA-S liegt sie zwischen 2 und 6 μ g/ml. Bei alten Menschen liegt sie nach Untersuchungen bei 0,3 ng/ml (DHEA) und 2 μ g/ml (DHEA-S).³ Diese durch Sulphotransferase und Sulphatase ineinander umwandelbaren Formen (vergleiche Abbildung 1, S.2) unterscheiden sich in wesentlichen Eigenschaften: DHEA-S ist chemisch stabil, löslich, und wird deswegen auch als Transportform angesehen. DHEA ist die hormonell aktive Form, die schnell metabolisiert wird.⁴ Beide existieren im Blut als Moleküle, die vorwiegend an Albumin, weniger an Sexualhormon-bindendes-Globulin (SHBG) assoziiert sind. DHEA-S ist zu 97,7 Prozent relativ fest an Proteine gebunden.⁴ Damit vergleichbar beträgt bei DHEA der gebundene Anteil 96 Prozent bzw. der freie Anteil etwa 4 Prozent, wobei der gebundene Anteil wesentlich leichter von Albumin dissoziiert als bei der sulphatierten Form.^{5/6}

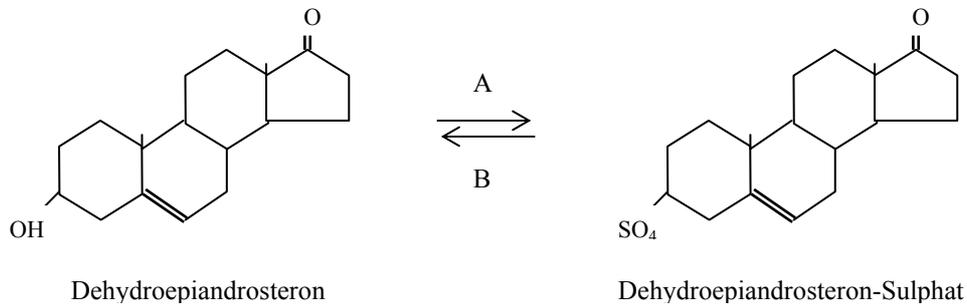


Abbildung 1. Chemische Struktur von Dehydroepiandrosteron und Dehydroepiandrosteron-Sulphat und ihre enzymatische Umwandlung ineinander durch Steroidsulphotransferase (Inaktivierung, A) und Steroidsulphatase (Aktivierung, B)

Swinkels et al. wiesen die starke Korrelation von freiem bzw. dem Gesamt-DHEA mit im Speichel gemessenem DHEA nach. Auch gaben dynamische Tests Hinweis auf einen schnellen Übertritt von DHEA in den Speichel (s.u.).⁷

1.1.2 Produktion

Beim Feten wird DHEA(S) ab der 25. Schwangerschaftswoche in der fetalen Zone der Nebennierenrinde (NNR) gebildet (Ausgangssubstrat der Östrogenproduktion der fetoplazentaren Einheit). Diese involutiert kurz nach der Geburt und demnach fallen die gemessenen DHEA-Spiegel im Serum in den ersten Wochen bis Monaten steil ab (siehe Abbildung 3, S.6). Später im Kindesalter bildet sich in der NNR eine androgenproduzierende Zone (Zona reticularis) aus einzelnen Zellinseln.⁸ Hier wird aus Cholesterin unter dem Einfluss des Steuerhormons ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) aus der Hypophyse die größte Menge an DHEA(S) produziert (ca. 75-90 Prozent).⁹ Hoden und Ovarien steuern ungefähr 5 Prozent zur Gesamtmenge bei.^{10/11} Täglich werden so etwa 4 mg DHEA, dagegen aber eine um etwas mehr als das 6-fache größere Menge DHEA-S (25mg) bei jungen Erwachsenen gebildet. Dabei bildet

DHEA-Sulphat durch Umwandlung mittels Hydrolyse im peripheren Gewebe die größte Quelle für DHEA.¹²

1.1.3 Metabolismus

Wie aus den unterschiedlichen Serumkonzentrationen und Produktionsraten zu vermuten, unterscheiden sich die beiden Formen in Halbwertszeit und Ausscheidung: DHEA hat eine Halbwertszeit von 15-30 Minuten mit einer metabolischen Clearancerate (MCR) von 2000 l/Tag. Bei DHEA-S wurden wegen der höheren Plasmaalbuminbindung Halbwertszeiten von 7 bis 10 Stunden bzw. eine MCR von nur 5 bis 20 l/Tag gemessen.³

Abgesehen von der Umwandlung von DHEA in seine sulphatierte Form, wird es rasch in das schwach androgene Androstendion (Δ 4-Androstendion) als Hauptmetabolit, sowie in Testosteron überführt. Darüber hinaus wird Androstendion selbst in Testosteron umgewandelt. Auf der anderen Seite kann Androstendion aber auch in das östrogen wirkende Östron (E1) metabolisiert werden und hat damit eine Art Verteilerfunktion in der Sexualhormonbalance des Körpers. Ein weiteres, schwach östrogenes Produkt ist (Δ 5-)Androstendiol (s.u. Abbildung 2).³ Von diesen, an androgenen und östrogenen Rezeptoren aktiven Liganden, leiten sich die hormonell inaktiven, renalen Ausscheidungsprodukte von DHEA ab, wie DHEA-Glucuronsäure und DHEA-Fettsäureester.³

Somit kann man sagen, dass DHEA(S) als peripherer „Steroidkonversionspool“ und Hormonvorstufe fungiert, von der aus ein großer Anteil der Androgene beim Mann und die meisten Östrogene der Frau im peripheren Körpergewebe metabolisiert werden (sog. intrakrine Wirkung durch Weiterverarbeitung in der Zielzelle).¹³ Von Regelson wurde deswegen auch der Begriff „mother steroid“ (Muttersteroid) geprägt.¹⁴

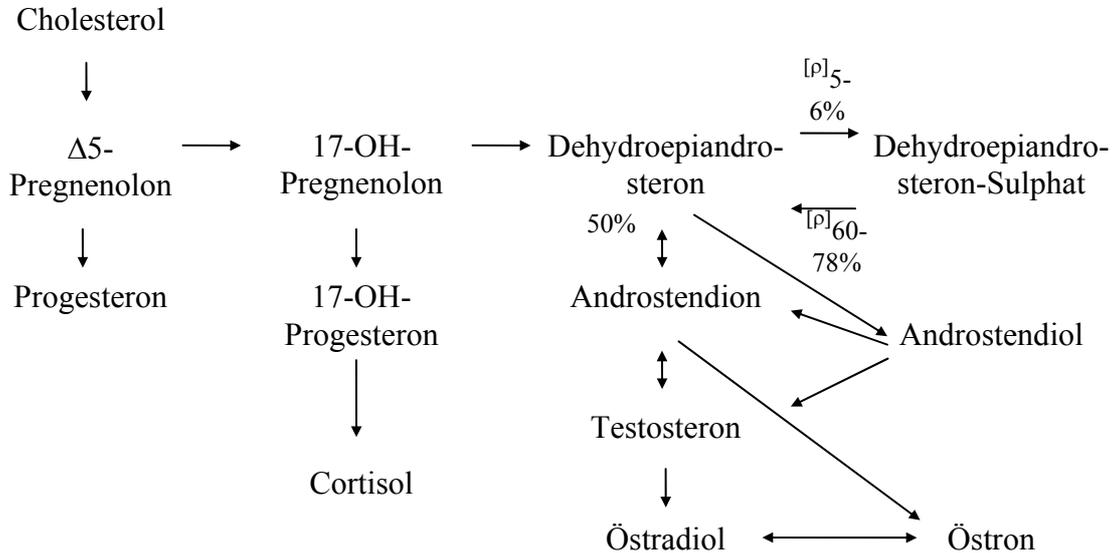


Abbildung 2. Diagramm der Produktion und des Metabolismus von Dehydroepiandrosteron und Dehydroepiandrosteron-Sulphat (modifiziert nach Nafziger et al. 1991).¹⁵ [p] bezeichnet den Prozentsatz, der nach der Konversion als DHEA bzw. als DHEA-S gemessen werden kann (Westphal 1971).¹⁶

1.1.4 Physiologische und therapeutische Wirkung

Obwohl DHEA immer wieder als ein „schwaches Androgen“ bezeichnet wird, bindet es selbst nicht an einen Androgenrezeptor. Jedoch wird diese Bezeichnung aus der Metabolisierung zu Androstendion und Testosteron bzw. Dihydrotestosteron (DHT) verständlich. Auch seine östrogene „Wirkung“ ist durch die Funktion als Vorläuferhormon für Östrogene wie Östron und 17β-Östradiol zu erklären.¹⁴ So rühren viele (indirekte) Effekte einer Verabreichung von DHEA an Tiere oder Menschen von den androgenen und östrogenen Metaboliten.¹⁷

Auch wenn die genaue Wirkungsweise noch weitgehend unbekannt ist, gibt es Hinweise auf einige therapeutische Aktivitäten, wie z.B. gegen Übergewicht und Diabetes mellitus.¹⁸ Einige Autoren vermuten einen positiven Effekt auf

Arteriosklerose, sowie auf Osteoporose und andere postmenopausale Beschwerden.^{19/20} Tierversuche zeigten darüber hinaus einen antiproliferativen Effekt von DHEA auf Tumorzellen.²¹

Weitere Studien wiesen eine signifikante Korrelation mit dem subjektiven Wohlbefinden von älteren Menschen und deren Aktivitätsniveau nach, was der Substanz den Ruf eines „Jungbrunnens“ einbrachte.^{22/3} In einer Substitutionsstudie von Arlt et al. bei Frauen mit NNR-Insuffizienz zeigte sich eine messbare Besserung von Wohlbefinden, Müdigkeit und Sexualität.²³ Insgesamt ergibt sich für Dehydroepiandrosteron das Bild einer bedeutsamen physiologischen Rolle im menschlichen Organismus.

1.1.5. Konzentrationsverlauf

Für DHEA lässt sich eine durch ACTH stimulierbare, und deswegen der Cortisolsekretion parallele zirkadiane Rhythmik nachweisen.²⁴ Diese sistiert allerdings im Alter (Adrenopause).²⁵ Die Tagesmaxima liegen zwischen 5 und 10 Uhr morgens. Hingegen ist die Tagesrhythmik von DHEA-S deutlich weniger ausgeprägt auf Grund seiner längeren Halbwertszeit und seiner Bildung aus Sekretion und Metabolisierung. Wie oben erwähnt, lassen sich gleich nach der Geburt sehr hohe Werte von DHEA messen. Danach kommt es in den ersten Lebensmonaten mit Involution der Fetalzone der NNR zu einem starkem Abfall der Steroidhormone auf eine Minimalsekretion während der Kleinkindzeit (ca. bis zum 6. Lebensjahr).

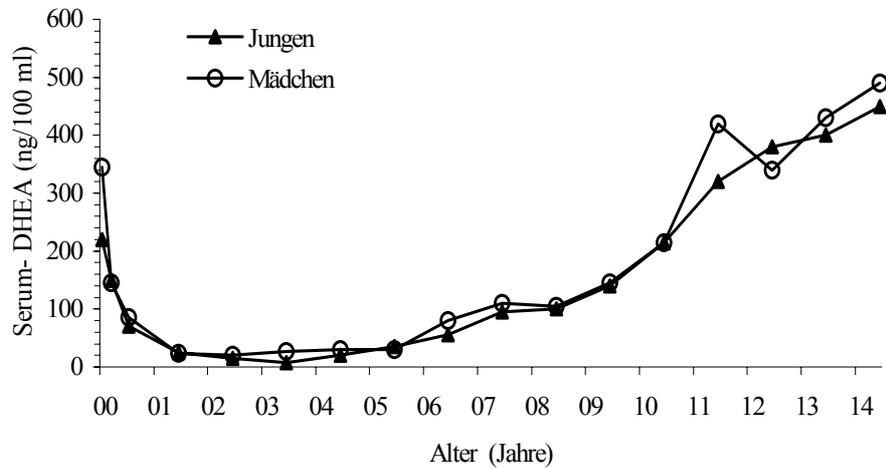


Abbildung 3. DHEA im Serum von Geburt bis zum 14. Lebensjahr bei Jungen und Mädchen (Daten nachgezeichnet; De Peretti und Forest 1976)

Zwischen dem 7. und 9. Lebensjahr findet sich dann ein deutlicher Anstieg der Androgene bei gleichbleibenden Cortisol- und ACTH-Werten (die sog. Adrenarche, Reifung der NNR). Dieser Anstieg vollzieht sich in beiden Geschlechtern, wobei er sich bei Jungen etwas später (ca. 9. LJ.) und kontinuierlich, bei Mädchen etwas früher (ca. 7. LJ.) und abrupter zeigt (siehe Abbildung 4).^{26/27}

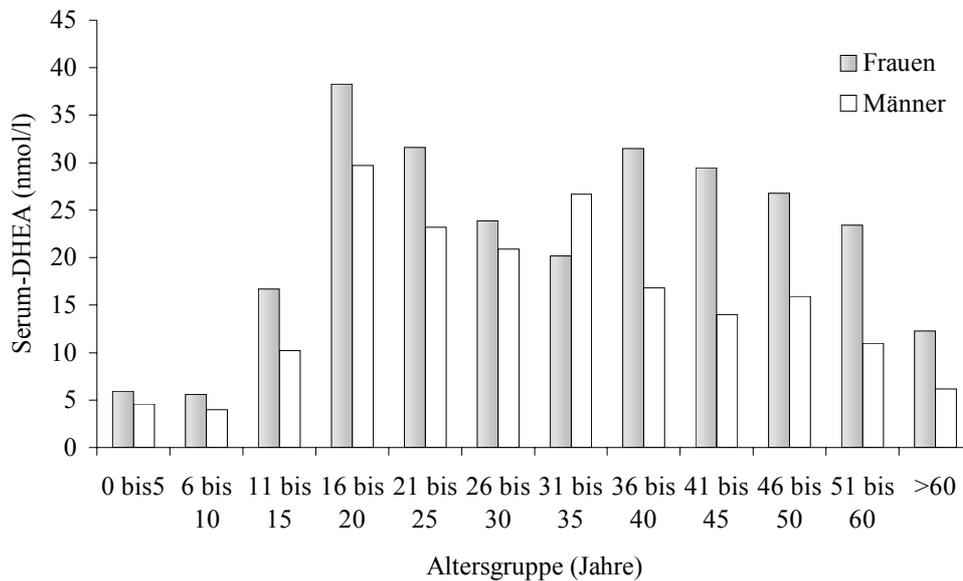


Abbildung 4. DHEA im Serum von Kindern, Frauen und Männern in bestimmten Altersgruppen (modifiziert nach Šulcová et al. 1997)²⁶

Dieser Sekretionssteigerung der NNR wird eine „permissive Rolle“ für die später einsetzenden hormonalen und körperlichen Veränderungen der Pubertät zugeschrieben.²⁸ Nach der Adrenarche wird ein gewisses Konzentrationsplateau erreicht, bis die Gonadarche (Reifung der Keimdrüsen) einen zweiten Anstieg der Androgene auf das Adultenniveau triggert.²⁹

Die Maximalkonzentration wurde von Šulcová et al. für Frauen und Männer im Alter von 20 Jahren gemessen (bei DHEA-S im Alter von 24 bzw. 30 Jahre). Es folgt ein kontinuierlicher Abfall beim Mann bis etwa 80 Jahren. Bei Frauen ließ sich nach einem anfänglichen Konzentrationsabfall ein zweiter Gipfel in der Altersgruppe von 36-40 Jahren (praemenopausal) nachweisen.²⁶

Im Vergleich der Geschlechter ergaben sich für DHEA höhere Werte für Frauen (im Gegensatz zu DHEA-S).³⁰ Bei Šulcová et al. waren diese Unterschiede nur in bestimmten Altersgruppen signifikant: in der Pubertät (11-15 Jahre), praemenopausal (36-40 Jahre) und im fortgeschrittenen Lebensalter (> 60 Jahre).²⁶

Der im Alter zu beobachtende kontinuierliche Abfall der DHEA-Werte (etwa 20% zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr) wird auf ein Absinken der NNR-Produktion (Adrenopause) zurückgeführt.

1.2 Physiologie und klinische Bedeutung von Steroidhormonen im Speichel

Riad-Fahmy, Read und Walker bzw. Vinning und McGinley haben vor über 15 Jahren die Voraussetzungen für die Messung von Steroidhormonen im Speichel beschrieben.^{31/32} Grundsätzlich gibt es zwei Wege, auf denen im Blutplasma befindliche Stoffe, wie z. B. Steroidhormone in den Speichel gelangen können:³³

1. *Intra-zelluläre Diffusion* – Die Steroide diffundieren wegen ihrer Fettlöslichkeit durch die Zellmembran in die Aziniszellen der Drüsen und gelangen auf der anderen Seite ebenso durch Diffusion in den Speichel. Diese Möglichkeit besteht nur für die lipidlöslichen, unkonjugierten Moleküle (z.B. DHEA).
2. *Ultrafiltration* – Die nicht proteingebundene Fraktion von Steroidhormonen kann mit dem Plasmafiltrat, das den Speichel bildet, zwischen den Aziniszellen, d.h. durch die tight junctions hindurchgelangen. Dies ist der Weg, auf dem im wesentlichen kleine (MW 100-200), polare Moleküle in den Speichel kommen. Aber auch konjugierte, und damit lipidunlöslich gemachte Steroide (z.B. DHEA-S) kommen so in den Speichel. Der Anteil dieser Stoffe im Speichel ist abhängig von ihrer Größe, der Durchlässigkeit der tight junctions (z.B. bei Entzündungen) und der Speichelflussrate.

Untersuchungen ergaben eine starke Annäherung der Speichelkonzentrationen von lipidlöslichen, unkonjugierten Steroiden mit der ungebundenen Fraktion im Serum. Konjugierte Steroide (DHEA-S) machten hingegen im Vergleich zu ihrer ungebundenen Serumkonzentration weniger als 1% aus und variierten stark mit dem Speichelfluss.³¹

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich für Messungen im Speichel vornehmlich lipidlösliche, unkonjugierte Steroide eignen, deren Konzentration unabhängig von der

Speichelflussrate ist und die weitgehend der im Körper hormonell aktiven, ungebundenen Fraktion entsprechen.

Nicht unbeachtet bleiben darf die Möglichkeit einer Kontamination von Speichel mit Plasmaexudat vom Zahnfleischrand und von Schleimhautverletzungen. Dabei muss mit einer „Verunreinigung“ von 0,5% des jeweiligen Serumspiegels im Speichel gerechnet werden.³¹

Grundlagen für diese Arbeit waren Ergebnisse von Swinkels et al., die eine Übereinstimmung des freien, nicht proteingebundenen Anteils von DHEA mit der Speichelkonzentration nachwiesen.⁷ Nach Stimulation mit Corticotropin zeigte sich im Speichel sogar eine bessere Korrelation mit dem Hormonanstieg des freien DHEA als im Gesamt-DHEA. Eine Abhängigkeit von der Speichelflussrate konnte nicht beobachtet werden.

Eine gute Zusammenfassung der Vorteile einer Hormonmessung im Speichel findet sich bei Vinning und McGinnley³¹:

1. Stressfreie Probengewinnung im Vergleich zur Venenpunktion (Erhöhung von Hormonspiegeln durch Stress).
2. Dynamische oder Langzeittest, die mehrere Proben verlangen, können einfacher durchgeführt werden. Dieser Vorteil wird besonders in der pädiatrischen Endokrinologie deutlich.
3. Die Speichelkonzentration spiegelt die freie Konzentration wieder und gibt somit das tatsächliche hormonelle Aktivitätsniveau wieder, da sich Konzentrationen von Bindungsproteinen ändern können. Der freie Hormonanteil kann sonst nur mit Hilfe des Äquilibrium-Dialysators wesentlich teurer und zeitaufwendiger bestimmt werden.
4. Speichelproben können evtl. zu Hause gesammelt und im Kühlschrank aufbewahrt werden (für Diagnostik oder wissenschaftliche Studien).

1.3 Bindungsassays und Radioimmunoassay (RIA)

1.3.1 Bindungsassay

Der Radioimmunoassay gehört in die Gruppe der „Bindungsassays“ (binding assays). Das heißt, dass es einen bindenden Partner (binder) und einen Liganden (ligand) gibt, der sich an Ersterem festmacht. Anhand des bindenden Partners lassen sich 3 Gruppen unterscheiden: Der „Rezeptorassay“, in dem ein Zellrezeptor bindet, der „kompetitive Proteinbindungsassay“, bei dem der bindende Anteil ein natürlich vorkommendes Protein ist und der „(Radio)-Immunoassay“, der den Liganden durch einen spezifischen Antikörper bindet.³⁴ Das Prinzip der Mengenbestimmung eines bestimmten Stoffes beruht nun auf der Absättigung des spezifisch bindenden Partners mit dem Liganden und der folgenden Bestimmung von gebundener (bound) und ungebundener (free) Fraktion.³⁴

Abbildung 5 (S.12) illustriert die Antigenbindung an eine definierte Menge Antikörper bei unterschiedlicher Antigengesamtmenge. Die Verteilung des Antigens zwischen gebundener und freier Phase hängt direkt mit der Gesamtmenge an Antigen zusammen und lässt so auf Letztere schließen. Die Konzepte von Tracer, Standards und die Trennung von gebundener und freier Fraktion sind alle sekundäre Aspekte.

Der Tracer bietet ein bequemes Mittel, die Verteilung zwischen freiem und gebundenem Anteil zu messen. Dabei haben sich verschiedene Techniken entwickelt. Entweder der bindende Anteil oder der Ligand sind mit einer Substanz markiert, die es erlaubt, die sehr geringen Konzentrationen des markierten Bindungspartners, eben den Tracer, genau zu messen: Beim FIA (Fluoroimmunoassay) hat der Tracer einen fluoreszierender Anteil, beim EIA (Enzymimmunoassay) wird die enzymatische Reaktion des an Antikörper oder Antigen gekoppelten Enzyms gemessen und beim RIA

(Radioimmunoassay) dient ein radioaktives Isotop zur Markierung und Detektierung des Tracers.³⁴

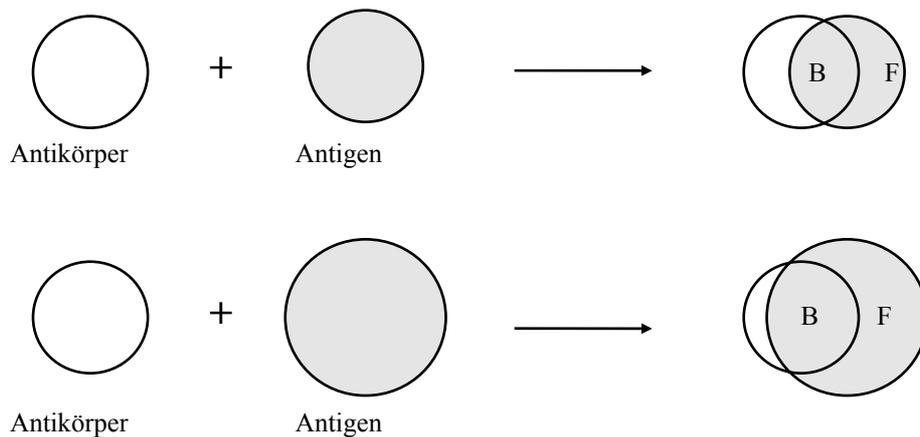
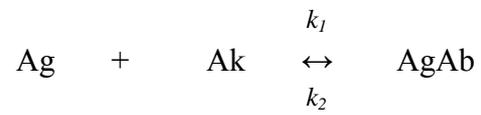


Abbildung 5. Prinzip eines Bindungsassays: Gegebene Mengen Antigen und Antikörper reagieren miteinander und bilden im Gleichgewicht Antigen-Antikörperkomplexe (überlappende Zone B) mit freien Anteilen von Antigen und Antikörper. In der unteren Zeile ist der Anteil des Antigens vergrößert, was zu einer Steigerung des gebundenen Anteils führt. Jedoch wird der freie Anteil (F) relativ gesteigert (niedrigeres Verhältnis gebundener zu freier Fraktion; nach T. Chard 1990).³⁴

Die Standards – eine Serie von bekannten Konzentrationen des Liganden auf einer Kurve aufgetragen, gegen die unbekannte Proben gemessen werden können - sind ebenfalls nur eine technische Verbesserung (siehe Abbildung 7, S.25). Theoretisch könnte bei bekannten Konzentrationen von Tracer, bindendem Anteil und der Reaktionskonstante K die Konzentration einer unbekannt Probe eines Antigens errechnet werden. In praxi sind solche Idealbedingungen jedoch selten zu finden.



Gleichung 1. Bindung von Antigen (Ag) und Antikörper (Ak) als reversible Reaktion mit den Konstanten für Hin- (k_1) und Rückreaktion (k_2)

1.3.2 Prinzip des Radioimmunoassays

Yalow und Berson beschrieben 1960 zuerst einen Assay mit einem Antikörper als bindenden Partner. Ihre Arbeit fusste auf der Erkenntnis, dass ^{131}J -markiertes Insulin als Tracer durch unmarkiertes Insulin von Insulin-bindendem Protein verdrängt wurde. Als nächsten Schritt setzten sie ein spezifisches Antiserum gegen Insulin ein (erster Radioimmunoassay für Insulin, 1971).³⁴

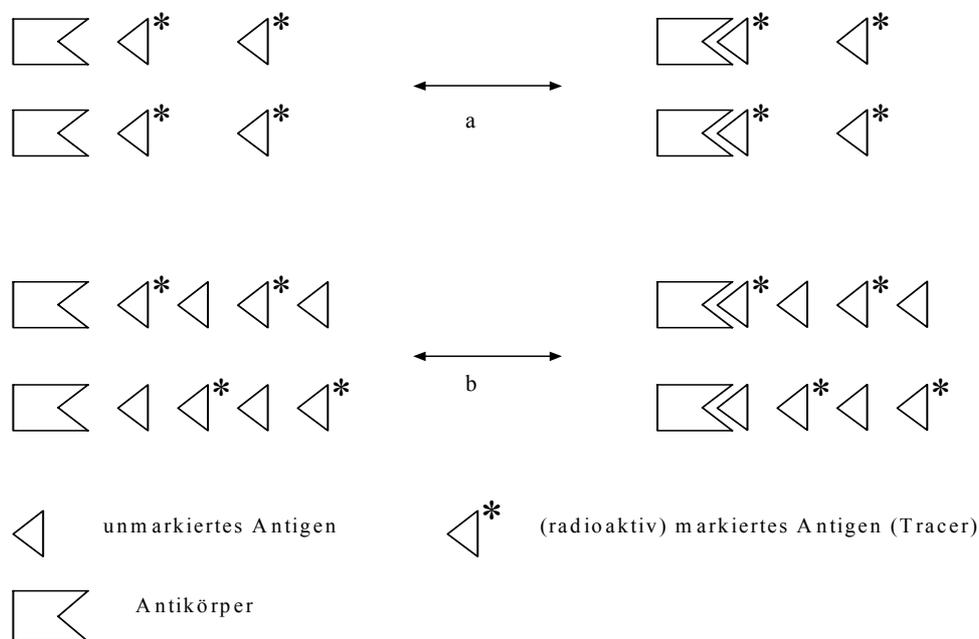


Abbildung 6. Schematische Darstellung des Prinzips eines Radioimmunoassays (RIA): a Antigen-Antikörperreaktion ohne unmarkiertes Antigen. b Antigen-Antikörperreaktion mit unmarkiertem Antigen, d.h. mit unbekannter Probe, die den Tracer vom Antikörper verdrängt (nach H. Strobach³⁵)

Nach genügend langer Inkubation von Antigen, Tracer und unmarkierter Probe kommt es zur Gleichgewichtseinstellung entsprechend den Konzentrationsverhältnissen und der Reaktionskonstanten (siehe Gleichung 1, S.13). Zur Bestimmung der Verteilung des

Tracers zwischen gebundener und freier Form werden beide Anteile voneinander getrennt. In der Routineanwendung haben sich mehrere Separationstechniken durchgesetzt:³⁴

1. Bei der Adsorption kommt es zu einer unspezifischen Bindung des freien Liganden, jedoch nicht der gebundenen Komplexe z. B. an Kohle. Bei dieser Technik wird der freie Anteil im Bodensatz gemessen.
2. Die fraktionierte Präzipitation macht sich die Ausfällung von gebundenen Komplexen und freier Fraktion bei unterschiedlichen Konzentrationen von organischen Lösungsmitteln wie z. B. Polyethylenglykol (PEG) zu Nutze. Antigen-Antikörperkomplexe und Antikörper fallen dabei früher aus und werden nach dem Zentrifugieren gemessen.
3. Weit verbreitet ist die Technik eines zweiten Antikörpers, der spezifisch gegen den Ersten, den Komplex bildenden Antikörper gerichtet ist. Auch hier entsteht ein Präzipitat des gebundenen Komplexes, das am Schluss gemessen wird.

Am Ende wird die Radioaktivität im Präzipitat gegen die bekannten Konzentrationen der Standardkurve gemessen und daraus die Konzentration der unbekanntenen Proben errechnet (siehe Abbildung 7, S.25).

1.4. Fragestellung

Folgende Fragestellungen liegen den Untersuchungen der Arbeit zugrunde:

1. Kann DHEA mittels Radioimmunoassay im Speichel ohne Extraktionsschritte gemessen werden?
 - Welche Modifikationen des verwendeten Testkits sind dafür notwendig?
 - Wie verhält sich der modifizierte Assay hinsichtlich Sensitivität, Messpräzision, Messgenauigkeit sowie anderen Parametern der Testvalidierung?
 - Wie soll der Speichel gewonnen werden, der für die Steroidhormonmessung verwendet wird?

2. Welche Messwerte ergeben sich bei einem Probandenkollektiv von Erwachsenen und von Kindern?
 - Wie verhalten sich die gemessenen Werte im Vergleich zu bisher gemessenen Daten in der Literatur?

3. Ist der Speichelassay zum Monitoring in der DHEA-Substitutionstherapie anwendbar?

2 Material und Methoden

2.1 Material

Für die Herstellung des Radioimmunoassays im Speichel wurde das Testkit DSL-8900 zur quantitativen Bestimmung von DHEA in Serum oder Plasma der Firma Diagnostic System Laboratories Deutschland (DSL), Sinsheim, verwendet. Dieser Radioimmunoassay arbeitet mit freiem Antikörper und einer Präzipitationslösung (2. Antikörper).

2.1.1 Puffer

Zur Verdünnung der Kitkomponenten Antikörper, Tracer, Standards und Kontrollen wurde ein PBS-Puffer nach Empfehlung der Firma DSL, Texas Webster USA, hergestellt. Dazu wurden

0,8g NaCl

0,02g KCl

0,144g Na₂HPO₄

0,024g KH₂PO₄

in 900 ml destilliertem Wasser unter Rühren aufgelöst. Dann wurde der Puffer auf pH 7,2 eingestellt, das Volumen auf 1 Liter aufgefüllt und bei Raumtemperatur gelagert.

2.1.2 Antikörper

Der im RIA-Kit enthaltene Antikörper, Kaninchen-anti-DHEA-Serum in Proteinpuffer und Natriumazid, wurde mit dem hergestellten Puffer im Verhältnis 1:3 verdünnt, um die Sensitivität des Radioimmunoassays zu erhöhen, aber andererseits eine genügend

hohe Präzision zu erreichen. Die Antikörperverdünnung wurde jedes Mal frisch angesetzt und in einer Menge von 100 µl zum Inkubationsvolumen pipettiert.

2.1.3 Tracer

Der Tracer von DSL enthält mit ^{125}J markiertes DHEA in Proteinpuffer und Natriumazid, das in einer Pufferverdünnung von 1:5 verwendet wurde. Von der frisch angesetzten Lösung wurden 400 µl zu Standards, Kontrollen und Proben gegeben.

2.1.4 Standards und Kontrollen

Die im DSL-RIA gelieferten Standards A-F enthalten DHEA in definierten Konzentrationen in Proteinpuffer und Natriumazid:

**Tabelle 1. Konzentrationen der Standards A bis F
des kommerziellen DHEA-Serum-RIAs**

Standards	ng/ml
A	0
B	0,200
C	1,000
D	2,500
E	10,000
F	30,000

Um die Konzentrationen von DHEA im Speichel mit der Standardkurve optimal abzudecken wurden die Standards A-E im Verhältnis 1:10 verdünnt, so dass die modifizierten Standards im Bereich von 20-1000 pg/ml lagen. Nach Granger et al.³⁷ wurden zwei zusätzliche Standards zur Präzisionserhöhung im unteren und hohen

Messbereich eingeführt (50 pg/ml und 500 pg/ml), wofür die Standards C (1,0 ng/ml) und E (10,0 ng/ml) 1:20 verdünnt wurden:

Tabelle 2. Konzentrationen der Standards A bis G des modifizierten DHEA-Speichel-RIAs

Standards	ng/ml
A	0
B	0,020
C	0,050
D	0,100
E	0,250
F	0,500
G	1,000

Ebenso wie die Standards wurden die im Kit enthaltenen Kontrollen von $0,5 \pm 0,025$ und $2,5 \pm 0,75$ ng/ml 1:10 verdünnt, um so dem Messbereich entsprechende Kontrollen herzustellen.

2.1.5 Inkubation

Um die Sensitivität für die niedrigen Konzentrationen zu erhöhen, wurde die Inkubationszeit auf 24 Stunden verlängert und die Inkubationstemperatur auf 4°C herabgesetzt (ein vor allem bei Steroidhormonen zu beobachtender Effekt).

2.1.6 Trennung von freiem und antikörpergebundenem DHEA

Zur Trennung von freiem und gebundenem Tracer bzw. Hormon wurde die unverdünnte PR-Reagenz mit dem 2. Antikörper einem Ziege-anti-Kaninchen-Gammaglobulin in Serum, Puffer, Polyethylenglykol (PEG) und Natriumazid verwendet.

2.1.7 Probengewinnung und Probenvorbereitung

Die Serumproben für den Vergleich von Speichel und Serumwerten wurden von Patientenseren genommen, die morgens zwischen 7 und 8 Uhr mit EDTA-Monovetten abgenommen wurden.

Die Speichelproben wurden zum Blutentnahmezeitpunkt in 50 ml Eppendorf®-Konusbechern gesammelt, in welche die Patienten bzw. die Probanden mindestens 4-5ml spuckten. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben im Kühlschrank aufbewahrt und dann bei -20°C eingefroren, um Speichelmuzine und Detritus zu präzipitieren. Nach dem Auftauen wurden die Proben zentrifugiert, in leere Salivettenröhrchen (Sarstedt®) umgefüllt und nach nochmaligem Zentrifugieren (5 min. bei 4000 U/min.) aliquotiert.

2.1.8 Probanden

Für die Korrelationsuntersuchung von Serum- und Speichelproben wurden 19 wissenschaftliche Mitarbeiter (10 Frauen und 9 Männer) des endokrinologischen Labors, Würzburg gebeten, Vollblut und Speichelproben zum gleichen Zeitpunkt abzugeben.

Die Speichelmessungen an Erwachsenen im Alter zwischen 20 und 40 Jahren wurden aus dem familiären Umfeld und Bekanntenkreis nach Instruktion über ein Informationsblatt und mündlicher Einverständniserklärung gesammelt (n = 24; 9

Frauen, 15 Männer). Ebenso wurden 2 Frauen mit Nebenniereninsuffizienz, die in Betreuung der endokrinologischen Abteilung der Universität Würzburg sind, gebeten Speichelproben abzugeben.

Die Speichelproben von Kindern zwischen 3 und 12 Jahren stammen von Kleinkindern eines Kindergartens (n = 19; 7 Mädchen, 12 Jungen) und Schulkindern einer Grundschule (n = 41; 19 Mädchen, 22 Jungen). Die Proben wurden zu Hause nach schriftlicher Instruktion und Einverständniserklärung der Eltern, sowie unter deren Anleitung gewonnen. Alle Speichelproben für die Bestimmung von Morgen- und Abendwerten wurden innerhalb von 24 Stunden gesammelt.

Die Speichelproben von postmenopausalen Frauen (n = 5) unter Gabe von Gynodian® Depot (200mg DHEA +4mg Estradiol) wurden im Rahmen einer klinischen Substitutionsstudie der endokrinologischen Forschungsabteilung der Universität Würzburg mit der Firma Schering® gewonnen. Die Proben wurden am Tag -7 und 0 vor Gabe der i.m. Injektion des Präparates abgenommen und dann am Tag 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 14, 17, 21 und 28 nach Injektion.

Nach Erhalt erfolgte eine Anonymisierung aller Proben.

2.2 Methoden

2.2.1 Radioimmunoassay

Die Spitzbodenröhrchen für die Totalaktivität (TA), der nicht spezifischen Bindung (NSB), die 7 Standards (A-G), die beiden Kontrollen und die Proben werden in doppelter Ausführung beschriftet. Die auf Raumtemperatur gebrachten Standards und Kontrollen werden auf einen Schüttler mit 250 U/min. gestellt. Das Pipettieren erfolgt unter Spitzenwechsel und grundsätzlich werden alle Reagenzien noch einmal gut gemischt werden.

20 µl des Nullstandards werden mit einer 20µl-Pipette auf den Boden von NSB- und B0-Röhrchen (A) gegeben. Mit den 0,2 (in B), 1,0 (in D), 2,5 (in E), 10,0 (in G) ng/ml-Standards und den Kontrollen wird ebenso verfahren. Für die neuen 50- und 500-pg/ml-Standards (C und F) werden nach nochmaligem Mischen 10 µl von den 1,0- und 10,0-ng/ml-Standards in die jeweiligen Röhrchen pipettiert und 10 µl des Nullstandards dazugegeben. Mit Hilfe einer Multipipette werden im nächsten Schritt 280 µl Puffer zu NSB und 180 µl zu den übrigen Standards und Kontrollen gegeben und alle Röhrchen kurz gevortext.

Die aufgetauten und 5 min. bei 4000 U/min. zentrifugierten Speichelproben werden zu je 200 µl in die Röhrchen pipettiert. In alle Röhrchen kommen 400 µl des 1:5 verdünnten ¹²⁵J-DHEA. Hierauf erfolgt die Zugabe von 100 µl des 1:3 verdünnten Antiserums (außer TA und NSB). Der Ansatz wird mit Alufolie abgedeckt, gevortext und bei 4°C für 24 Stunden zur Sensitivitätserhöhung inkubiert.

Dann werden 1000 µl präzipitierende Reagenz (2. Antikörper) zugegeben (außer TA), gevortext, für 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich bei 3000 U/min. für 20 min. zentrifugiert. Nach dem Dekantieren auf Fließpapier, werden alle Röhrchen

2 min. im Gammacounter gemessen (Berchtold LB 2111) und die Ergebnisse im Logit-log-Verfahren berechnet.

2.2.2. Spezifität

Die angegebene Kreuzreaktivität des Antikörpers liegt bei 0,73% für Isoandrosteron, 0,46% für Androstendion, 0,24% für 5 α -Androstan-3,17-dion, und <0.05% für DHEA-Sulphat, Progesteron, Androsteron und Testosteron. Die bisher gemessenen Konzentrationen der Hormone im Speichel liegen entweder im Konzentrationsbereich von DHEA oder deutlich darunter (Lac et al.⁴², Riad-Fahmy et al.³²). Ausnahmen sind DHEA-S und Cortisol mit Speichelwerten von 2,6-5,0 ng/ml bzw. 3,5-7,8 ng/ml, die aber nur eine Kreuzreaktivität von 0,02% bzw. <0,001% haben.

2.2.3 Statistische Verfahren

Zur statistischen Auswertung wurde das Softwareprogramm StatView (USA) und ein Taschenrechner von Texas Instruments (TI 30) verwendet.

Statistische Verfahren:

1. Gepaarter t-Test zur Untersuchung der Korrelation von Serum- und Speichelproben und Tagesrhythmik.
2. Ungepaarter t-Test zur Untersuchung signifikanter Unterschiede zwischen verschiedenen Altersstufen.

3 Ergebnisse

3.1 Standardkurve

Abbildung 7 zeigt die Standardkurve des modifizierten Radioimmunoassays mit 6 Standards im Bereich zwischen 20 und 1000 pg/ml, die 1:10 verdünnt wurden. Die größte Steigung und somit die höchste Messpräzision liegt zwischen 50 und 250 ng/ml, dem Bereich der physiologischen DHEA-Speichelkonzentration.

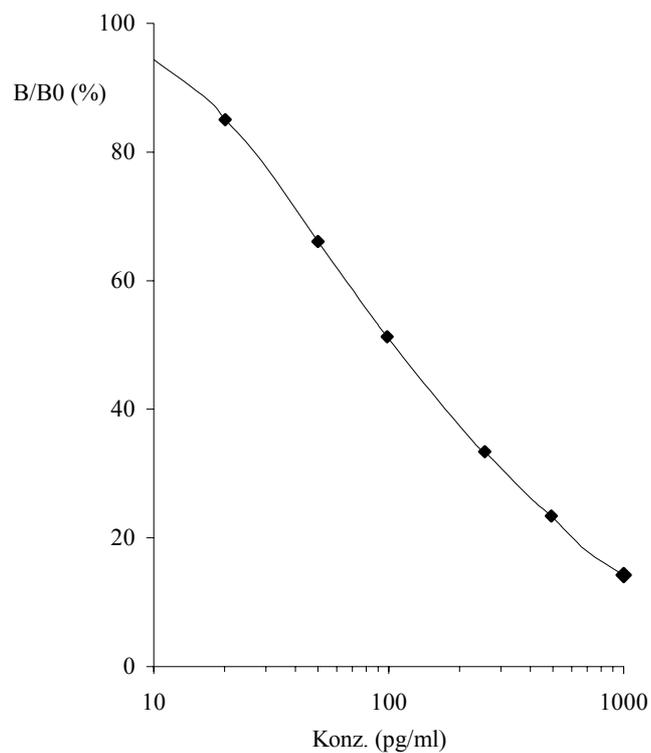


Abbildung 7. Standardkurve des modifizierten DHEA-Radioimmunoassays im Speichel (semilogarithmisch aufgetragen); B/B0 ist der gebundene Anteil im Verhältnis zum Nullstandard B0.

3.2 Reproduzierbarkeit der Standardkurve

Innerhalb von 11 Standardkurven zeigten sich Messwerte bei 20-, 50- und 80-Prozent B/B₀ von 588,9 pg/ml (SEM = 39,9), 98,0 pg/ml (SEM = 10,5) und 23,3 pg/ml (SEM = 2,5).

Die lineare Korrelation der Standardkurve mit den im Logit-log-Modus gemessenen Standards betrug dabei 0,998 (SEM = 0,001).

3.3 Sensitivität

Das theoretische Detektionslimit, als die minimale von einer Nullkonzentration noch unterscheidbare Konzentration, wurde wie folgt bestimmt: Vom Mittelwert von 10 Doppelbestimmungen des mitgelieferten, 1:10 verdünnten Nullstandards bzw. eines physiologischen Nullstandards (Probe einer Morbus Addison-Patientin) wurden zwei Standardabweichungen subtrahiert. Mit dieser Methode ergaben sich ein Detektionslimit von 7,5 bzw. 2,5 pg/ml.

3.4 Messpräzision (Interassayvarianz und Intraassayvarianz)

Um die Messpräzision zu testen, wurde eine Interassayvarianz und eine Intraassayvarianz durchgeführt. Für die Interassayvarianz wurden 3 gepoolte Speichelproben aus dem hohen, mittleren und niedrigen Konzentrationsbereich in 10 aufeinanderfolgenden Ansätzen gemessen und der Variationskoeffizient (VC) bestimmt. Die gemessenen VCs bei 718,3 pg/ml, 188,1 pg/ml und 129,2 pg/ml betragen 4,7%, 9,5% bzw. 12,6% (Mittelwert 11,8%).

Für die Intraassayvarianz wurde ein Präzisionsprofil nach Ekins mit den mittleren VCs der Konzentrationsbereiche 20-50, 51-100, 101-250 und 251-500 pg/ml erstellt. Es ergaben sich Werte zwischen 1,6 und 3,5%. Die stabilsten Ergebnisse finden sich im Bereich der physiologischen Speichelkonzentrationen zwischen 50 und 250 pg/ml mit

VCs von 1,6 bzw. 2,4% (Abbildung 8).

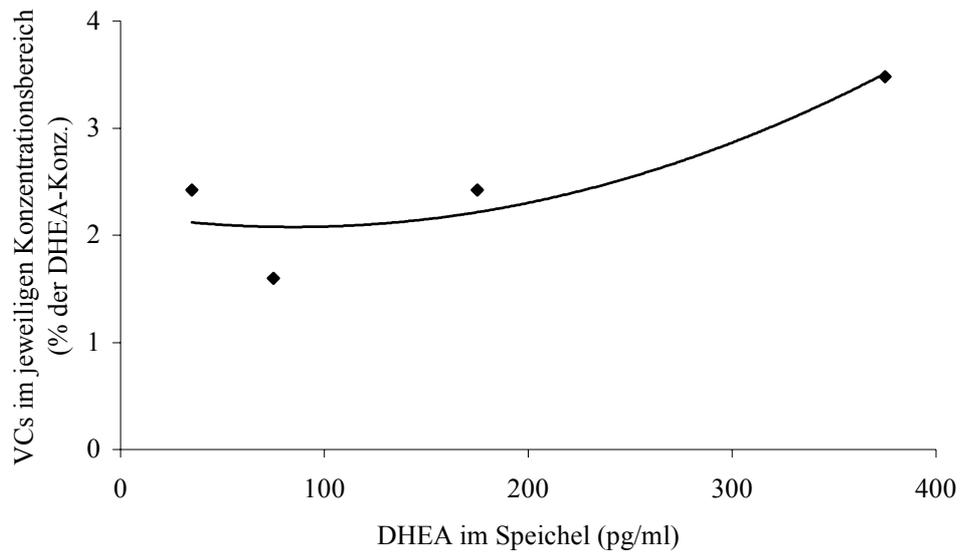


Abbildung 8. Intraassayvarianz als Präzisionsprofil der Variationskoeffizienten

3.5 Linearität

Tabelle 3 (s.u.) zeigt die serielle Verdünnung von Speichelproben im niedrigen und hohen Konzentrationsbereich (563,6 bzw. 149,1 pg/ml). Durchschnittlich ergaben sich hierbei Messwerte von 86,6 (I) bzw. 115,6% (II) von der theoretisch errechneten Konzentration.

Tabelle 3. Messung von DHEA (pg/ml) in seriell verdünnten Speichelproben

	Endogene Konzentration	Dilution	Theoretischer Wert	Messung	Prozent vom theoretischen Wert
I	563,6	1:2	281,8	290,4	103,1
		1:4	140,9	119,6	84,9
		1:8	70,6	50,7	71,8
II	149,1	1:2	74,6	75,4	101,2
		1:4	37,3	41,3	110,7
		1:8	18,6	25,1	134,9

3.6 Genauigkeit nach Zugabe von DHEA (accuracy)

Tabelle 4 (s.u.) zeigt Daten nach Zugabe einer definierten Konzentration von DHEA in 2 Speichelproben. Von den zugegebenen DHEA-Mengen wurden durchschnittlich 89,3 (I) bzw. 95,5% (II) gemessen.

Tabelle 4. Messung von DHEA (pg/ml) nach Zugabe einer definierten Menge (spiked samples)

	Endogene Konzentration	Zugabe von DHEA	Theoretischer Wert	Messung	Prozent vom theoretischen Wert
I	290,4	25	315,4	267,3	84,7
		50	340,4	310,4	91,2
		125	415,4	372,8	89,7
		250	540,4	475,4	87,0
II	75,4	25	100,4	80,8	80,5
		50	125,4	114,9	91,6
		125	200,4	198,7	99,2
		250	325,4	311,8	95,8

3.7 Korrelation von Serum- und Speichelproben

Zur Untersuchung der Korrelation von Speichel- und Serumwerten wurden von 10 weiblichen und 9 männlichen Probanden Blut- und Speichelproben zum gleichen Zeitpunkt gesammelt. Die gewonnenen Speichel- und Serumproben wurden mit dem modifizierten bzw. unveränderten Radioimmunoassay von DSL, Sinsheim gemessen. Abbildung 7 zeigt eine lineare Korrelation von $r(19) = 0,94$ mit $p < 0,0001$.

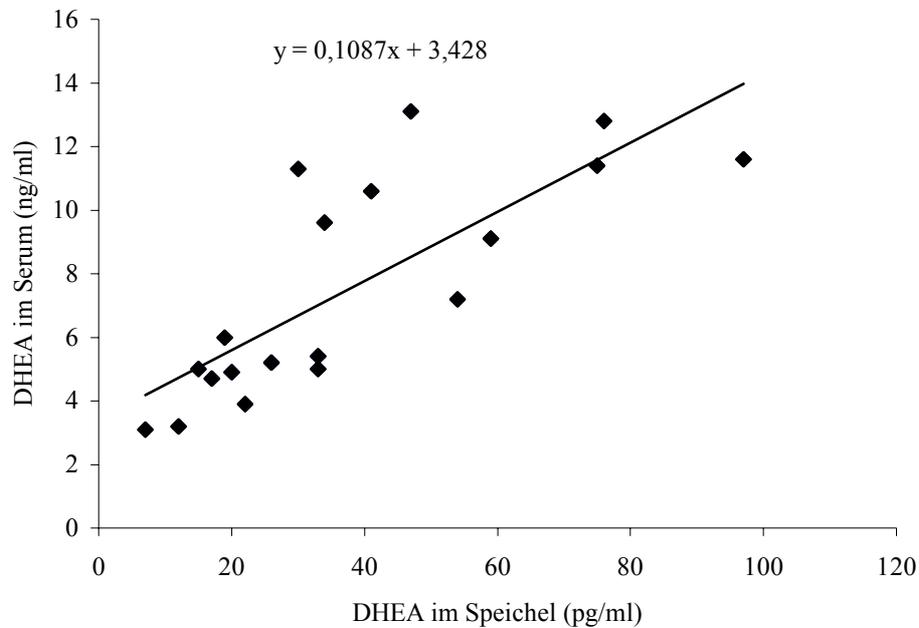


Abbildung 9. Korrelation von Serum- und Speichelwerten (matched pairs) mit $n = 19$

3.8 DHEA im Speichel von Erwachsenen

Speichelproben von erwachsenen Probanden im Alter zwischen 20 und 40 Jahren wurden gesammelt (n = 24). Es zeigte sich eine dem Cortisol ähnliche Tagesrhythmik mit hohen Morgenwerten und niedrigen Abendwerten. Bei den männlichen Probanden ergaben sich abendliche Mittelwerte von 120 pg/ml (SEM = 21), die auf 364 pg/ml (SEM = 57) morgens anstiegen ($p < 0,005$). (Vgl. Abbildung 10, unten).

Die Frauen hatten Morgen- und Abendwerte von 190 pg/ml (SEM = 23) bzw. 80 pg/ml (SEM = 14) mit $p < 0,01$ (Vgl. Abbildung 11, S. 32).

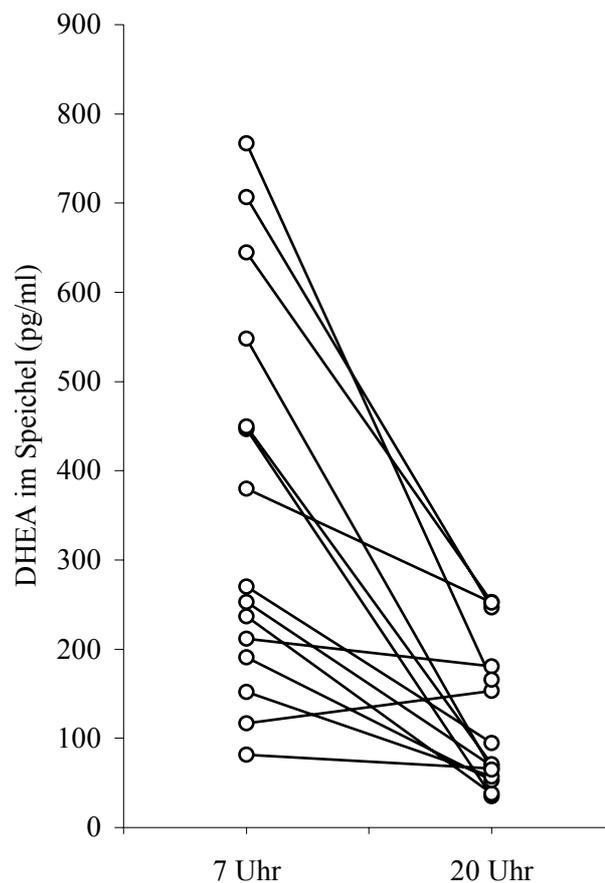


Abbildung 10. Tagesrhythmik des Speichel-DHEA bei Männern (n = 15)

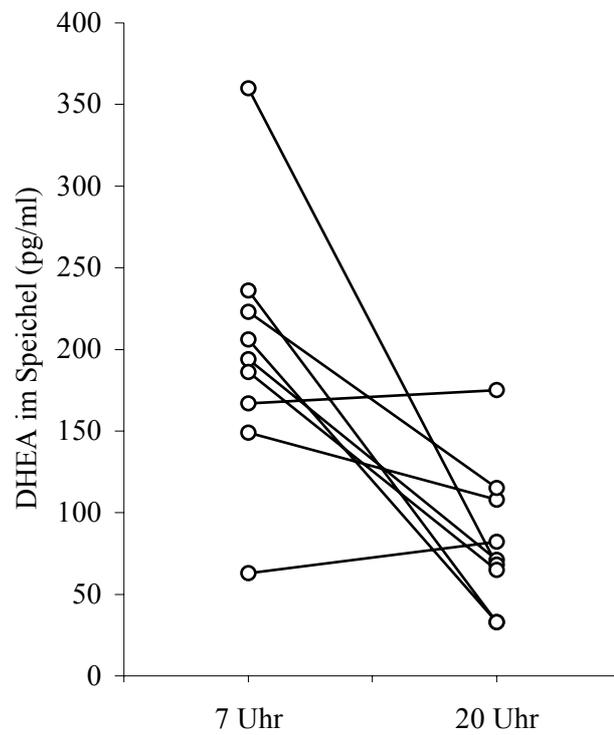


Abbildung 11. Tagesrhythmik des Speichel-DHEA bei Frauen (n = 9)

3.9 DHEA im Speichel von Klein- und Schulkindern

Bei den Speichelmessungen von Kindern war keine signifikante zirkadiane Rhythmik zwischen Morgen- und Abendwerten zu verzeichnen. Die Messwerte bewegten sich in den Altersgruppen 3 bis 8 Jahren zum Teil im Bereich des Detektionslimits der RIAs.

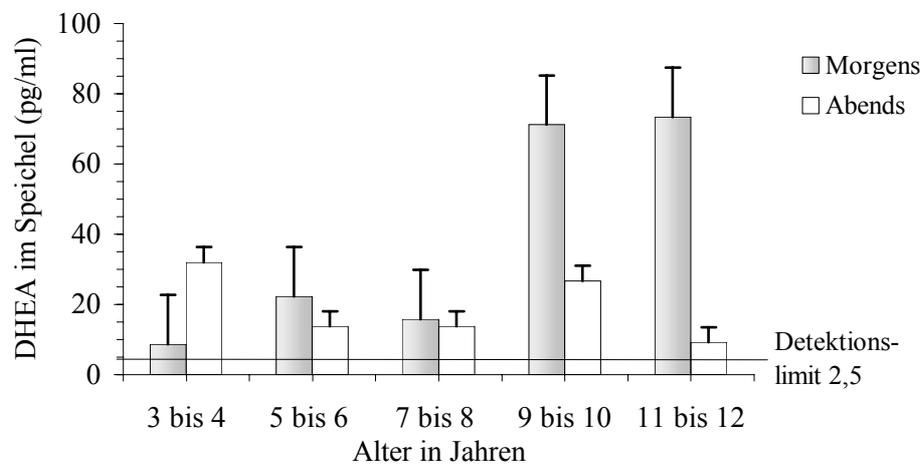


Abbildung 12. Tagesrhythmik des Speichel-DHEA bei Mädchen (n = 26)

Im Vergleich von Jungen und Mädchen lagen die durchschnittlichen Tageswerte der Mädchen der Altersgruppe 9 bis 12 Jahre höher als die der Jungen im gleichen Alter.

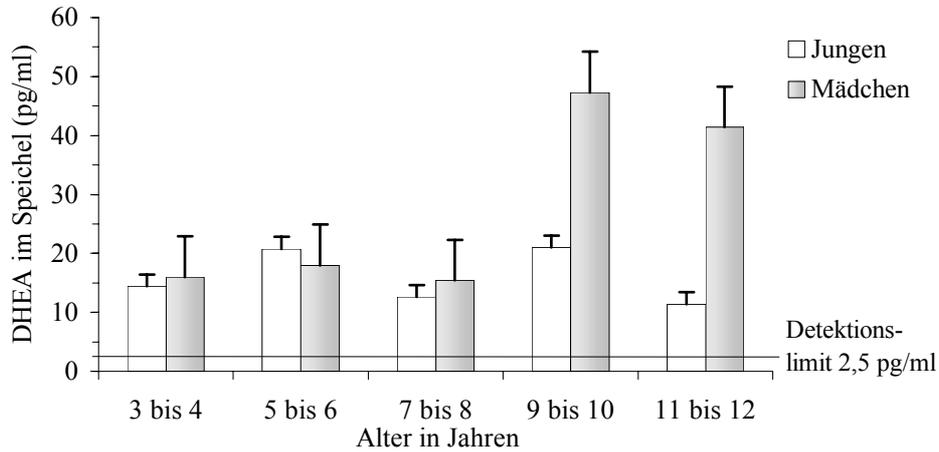


Abbildung 13. Tagesdurchschnitt des Speichel-DHEA bei Mädchen (n = 26) und Jungen (n= 34) im Vergleich

Im Verlauf der Speichelwerte bei Kindern ließ sich ein signifikanter Anstieg im Alter zwischen 7 bis 10 Jahren verzeichnen ($p < 0,03$).

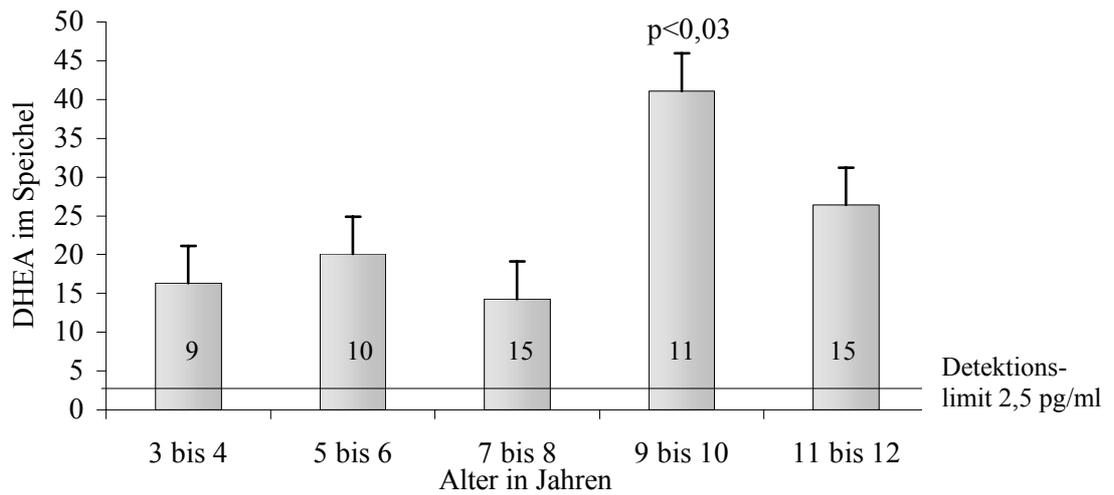


Abbildung 14. Speichel-DHEA im Verlauf bei Kindern (Jungen und Mädchen) mit n = 60

3.10 Speichelkonzentration nach Substitution von Gynodian® Depot

Abbildung 15 zeigt Daten einer pharmakologischen Substitutionsstudie, in der 200 mg DHEA +4 mg Estradiol (Gynodian® Depot) i.m. an postmenopausale Probandinnen verabreicht wurden. In den parallel abgenommenen Speichelproben (n = 5) fand sich ein signifikanter Anstieg des Speichel-DHEA ab Tag 2 nach Injektion ($p < 0,01$).

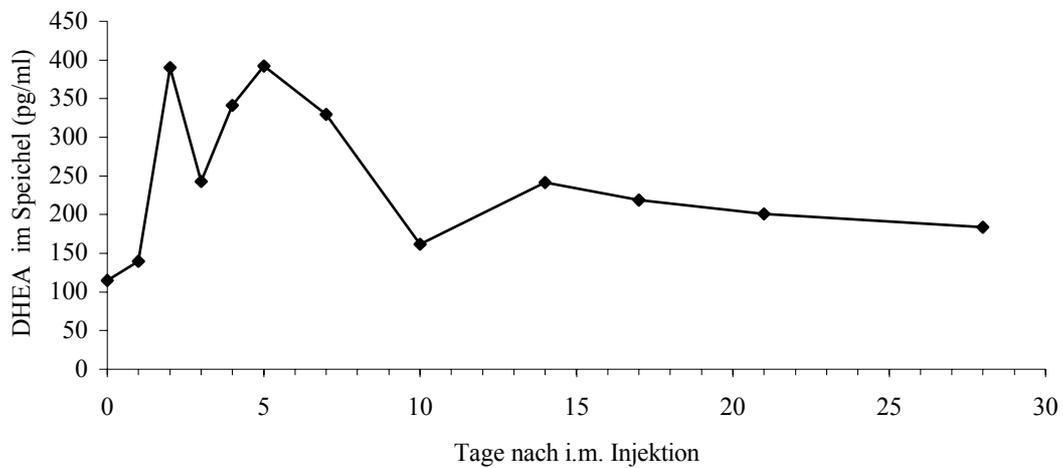


Abbildung 15. Speichelkonzentration nach Substitution von 200 mg DHEA +4 mg Estradiol (n = 5)

3.11 Richtlinien zur Speichelprobengewinnung und deren Verarbeitung

Für die Gewinnung von Speichelproben stehen verschiedene Hilfsmittel wie Kaugummi oder Zitronensäure zur Verfügung. Die Firma Sarstedt® (Darmstadt, Deutschland) bietet kleine saugfähige Röllchen (Salivetten) aus Baumwolle oder Polyester an, die innerhalb weniger Minuten 2-5 ml Mundspeichel aufsaugen, der dann abzentrifugiert wird. Im Vergleich von DHEA-Speichelmessungen von 5 Probanden, gewonnen mit Baumwollsalivetten, Polyestersalivetten oder direkt in Plastikröhrchen gespuckt, zeigten deutliche Unterschiede. Die Salivettenrollen wurden nach einer Verweildauer von ca. 5-7 Minuten im Mund der Probanden in den dafür vorgesehenen Röhrchen zentrifugiert und der Speichel danach über Nacht bei -20°C eingefroren. Der ohne Salivetten gewonnene Speichel wurde in 50ml-Konusröhrchen (Eppendorf®) aufgefangen und danach ebenfalls bei -20°C über Nacht eingefroren. Nach dem Auftauen wurden alle Speichelproben zentrifugiert, der klare Überstand in kleinere Röhrchen abpipettiert und mit dem DHEA-RIA gemessen.

Die Mittelwerte der Speichelproben aus den Baumwollsalivetten, 574 pg/ml (SEM = 98,6), und aus den Polyestersalivetten, 272 pg/ml (SEM = 100,5), wiesen deutlich höhere Werte auf, als die unbehandelten Speichelproben, 208 pg/ml (SEM = 67,6). Dies geht parallel mit den Beobachtungen von Granger et al.³⁷. Dabbs zeigte, dass die Baumwollsalivetten zwar zur Messung von Cortisol geeignet sind, bei Testosteronbestimmungen jedoch viel zu hohe Werte vortäuschen, da die Baumwolle selbst Testosteron abgibt.³⁶ Ähnliches scheint für die Messung von DHEA zu gelten.

Die Anwendung von oralen Stimulantien, wie Zitronensäurekristalle, bergen die Gefahr einer pH-Verschiebung der Speichelprobe in sich.³⁷

Um jegliche Verfälschung von Speichelproben zu vermeiden, ist es besser, die Proben direkt, d.h. ohne Hilfsmittel unter Anleitung in Konusbechern abzunehmen (etwa 4-5 ml) und bei -20°C mindestens über Nacht einzufrieren, um Speichelpolysaccharide und Muzine präzipitieren zu lassen. Der aufgetaute Speichel wird zentrifugiert (10 min. bei

4000 U/min.) und der klare Überstand über dem Muzindetritus in Teströhrchen bzw. zum Lagern abpipettiert.

Tabelle 5. Vergleich der DHEA-Messwerte im Speichel nach Gewinnung der Proben mit Salivetten (Baumwolle bzw. Polyester) und ohne Salivetten von gesunden Probanden (1-5) bzw. 2 Patienten mit NNR-Insuffizienz (pg/ml) (n.d. = nicht detektierbar)

Probanden	1	2	3	4	5	NNR- insuffiz.1	NNR- insuffiz.2
Baumwoll- salivette	0,425	0,476	0,636	0,653	0,679	0,694	0,421
Polyester- salivette	0,391	0,155	0,137	0,358	0,317	-	-
Speichel pur	0,290	0,245	0,069	0,258	0,178	n.d.	0,012

4 Diskussion

In dieser Arbeit wird ein Weg gezeigt, DHEA im Speichel mittels Radioimmunoassay ohne Extraktion des Steroidhormons zu messen. Die bisher vorliegenden Daten der Speichelmessung sind fast alle, außer Granger et al.³⁷, entweder mittels Gaschromatographie^{38/39} oder Radioimmunoassay mit vorgeschaltetem Extraktionsschritt (zum Teil mit Papierchromatographie) entstanden (siehe Tabelle 6 und Tabelle 7 S.42/43).^{40/41}

Die Entbehrlichkeit der Extraktion stellt eine wesentliche Vereinfachung des RIAs, sowie eine deutliche Kostenreduktion dar. Möglich ist dies durch einen ausreichend selektiven Antikörper des Testkits und Steigerung der Sensitivität durch Verdünnung von Tracer und Antikörper, sowie Anpassung der Standardkurve an den entsprechenden Messbereich im Speichel.

In der durchgeführten Validierung des Assays erwies sich der Test als solides Werkzeug zur Speichelhormonmessung und zeigte sich in etlichen Messreihen Ergebnissen eines ähnlichen Speichelassayversuches überlegen.³⁷ Mit 7,5 pg/ml im verdünntem Nullstand bzw. 2,5 pg/ml im Speichel einer Addison-Patientin liegt die Messempfindlichkeit des hier vorgestellten RIAs knapp über bzw. unter der von Granger (4,0 pg/ml im Nullstandard). Sowohl Interassayvarianz als auch Intraassayvarianz ergaben mit Werten zwischen 4,7 und 12,6% bzw. 1,6 bis 3,5% eine niedrigere Streubreite als im Assay von Granger (6,3 bis 13,6% bzw. 3,7 bis 4,3%).

Die Korrelation von Serum und Speichelproben zeigte eine hohe Übereinstimmung mit $r(19) = 0,94$ bei $p < 0,0001$, was für die Vergleichbarkeit der Speichel- mit der Serummessmethode spricht (Granger $r(37) = 0,87$, $p < 0,0001$).

Mit 364 bzw. 120 pg/ml bei Männern und 190 bzw. 80 pg/ml (jeweils morgens und abends), liegen die Messwerte für Frauen niedriger als die für Männer. Die Speichelkonzentrationsmessungen bei Erwachsenen in der Literatur schwanken je nach Alter und angewandter Methode (mit oder ohne Extraktion und Chromatographie)

zwischen 44 (postmenopausal) und 1069 pg/ml bei Frauen und 60 bis 297 pg/ml bei Männern (siehe Tabelle 6 und Tabelle 7, S.42/43). Die im vorgestellten Assay gemessenen Konzentrationen bewegen sich etwa im gleichen Bereich wie die Ergebnisse von Assays mit Extraktionsschritt.^{45/42} Dies lässt auf die Entbehrlichkeit der Extraktion bzw. die Gleichwertigkeit des Tests schließen. Granger et al. fand in seinen Speichelmessungen einen Geschlechtsunterschied nur für Morgenwerte (360,2 pg/ml für Frauen bzw. 296,5 pg/ml für Männer). Die Nachmittagswerte waren vergleichbar (136,0 bzw. 129,7 pg/ml). Im Vergleich mit den Serummessungen ist bei Šulcová et al. der Unterschied zwischen den Geschlechtern nur in bestimmten Altersgruppen signifikant (Pubertät, praemenopausal 36.-40. Lebensjahr und >60 Jahre).²⁷ Zumoff et al. jedoch fanden in der Altersgruppe unter 50 Jahren deutlich höhere Werte für Frauen.³⁰

Die bisher gemessenen DHEA-Speichelwerte für Kinder liegen je nach Alter zwischen 58 und 380 pg/ml (Tabelle 6 und 7). Granger et al. untersuchten lediglich Kinder und Jugendliche im Alter zwischen 8 und 17 Jahren. Die vorliegende Arbeit ist die erste und bisher einzige Reihenuntersuchung von DHEA-Speichelkonzentrationen bei Klein- und Schulkindern zwischen 3 und 12 Jahren. Zwischen 3 und 8 Jahren zeigte sich keine scharfe tageszeitliche Rhythmik. Granger und Goodyer fanden in den von ihnen untersuchten Kindern zwischen 8 und 17 bzw. 16 Jahren eine zirkadiane Rhythmik.

In der weder von Goodyer⁴⁵ noch Granger³⁷ untersuchten Altersgruppe zwischen dem 7. und 10. Lebensjahr zeigte sich ein bemerkenswerter Anstieg der DHEA-Speichelwerte. Dies entspricht dem in Serummessungen bisher mehrfach nachgewiesenem Anstieg von Androgenen als Ausdruck einer adrenalen Funktionsänderung, die Adrenarche (siehe Abbildung 3, S.6).^{26/27}

Eine klinische Anwendung stellen die Speichelmessungen aus der Substitutionsstudie mit 200 mg DHEA +4 mg Estradiol dar. Sie zeigen einen deutlichen Anstieg des Speichel-DHEA am 2. Tag nach Injektion und danach ein langsames Absinken der Werte (siehe Abbildung 15, S.35). Hier zeigen sich mögliche Anwendungen im

Monitoring von Hormonsubstitutionen, so wie in der Erforschung der Pharmakokinetik von in Entwicklung befindlichen Hormonpräparaten auf.

Die hier publizierten Richtlinien zur Gewinnung von Speichelproben sind eine praktische Handhabe für die Messung von allen Steroidhormonen, bei denen eine Verfälschung der Messwerte durch ungeeignete Abnahmetechnik mit Salivetten oder Stimulantien erwartet werden kann. Dies ist eine Problematik, die bisher in der Routineanwendung von Speichelassays (z.B. bei Speichel-Cortisolassays) noch zu wenig Beachtung findet. Die Verfälschung von Messwerten bei der Abnahmetechnik mit Baumwollsalivetten beträgt zum Teil das 2 bis 3fache im Vergleich mit dem ohne Hilfsmittel gewonnenen Speichel (Tabelle 5; S.37). Bei korrekter Handhabung der Speichelproben, wie hier beschrieben, lassen sich Fehlerquellen der Hormonmessung schon im Vorfeld ausschalten und somit wesentlich präzisere Daten erheben.

Der in dieser Arbeit vorliegende Radioimmunoassay für DHEA im Speichel eignet sich, Referenzwerte der Speichelkonzentrationen von DHEA bestimmen. Hier ist noch Bedarf an Forschungsarbeit. Darüber hinaus gibt der Radioimmunoassay ein weiteres Werkzeug zur Erforschung des Hormons DHEA zur Hand. Es eröffnen sich vielfältige Möglichkeiten des Einsatzes eines Speichel-RIAs bei Studien, in denen physiologische und pathologische Konzentrationsschwankungen von DHEA bzw. seiner Vorläufer und Metabolite zu erwarten sind. Speziell in der Fragestellung des Beginns der Adrenarchie bei Kindern kann der Assay eine große Hilfe zur Erforschung von Triggermechanismen sein.

Wie einige Arbeiten der letzten Jahre zeigten, bietet die Substitution von DHEA vielversprechende Möglichkeiten (z.B. bei postmenopausalen Beschwerden). An dieser Stelle ist die Speichelhormonmessung mit dem vorgestellten RIA als Screening-Methode pathologisch erniedrigter DHEA-Konzentrationen und als Spiegelkontrolle (Drugmonitoring) bei Substitution geeignet. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Radioimmunoassay für DHEA im Speichel ein wertvolles Werkzeug zur weiteren

Erforschung des Metabolismus von DHEA so wie ein weitere Schritt in der Vereinfachung der klinischen Laboranalytik von Nebennierenrindenerkrankungen ist.

Tabelle 6. Vergleich der Speichelkonzentrationen bei Frauen, Männern und Kindern in der Literatur (mor.= morgens, ab.= abends, Extrakt.= Extraktion, GC-(HR)MS = Gaschromatographie-(hoch auflösende) Massenspektrometrie, Chrom.= Chromatographie) (Fortsetzung S.43)

DHEA (pg/ml)			Methode	Autoren
Männer	Frauen	Kinder		
	44 ± 18 (postmenop.) 20 (ab.)-67(mor.) (postmenop.)		RIA (Extraktion?) s.o.	Vittek et al. 83 ⁴⁰ Vittek et al. 84 ⁴¹
116/ 190 60/ 234			GC-HRMS GC-MS	Gaskell et al.79 ³⁸ Gaskell et al.80 ³⁹
75 ± 5	147 ± 28		RIA+Extrakt. u. Chrom.	Lac et al. 92 ⁴²
	318-1069		RIA+Extrakt. u. Chrom.	Filaire et al. 98 ⁴³

Tabelle 7. Fortsetzung Vergleich der Speichelkonzentrationen bei Frauen, Männern und Kindern in der Literatur (mor. = morgens, mitt. = mittags, ab. = abends, Extrakt. = Extraktion)

DHEA (pg/ml)			Methode	Autoren
Männer	Frauen	Kinder		
	176 ± 92/ 197 ± 116		RIA+Extrakt.	Swinkels et al. 90 ⁷
		58-459 (Neugeborene)	RIA (Extraktion?)	Kurihara et al. 96 ⁴⁴
		380 ± 170 (mor.) 270 ± 110 (mitt.)	RIA+Extraktion	Goodyer et al. 96 ⁴⁵
296,5 ± 20 (mor.) 129,7 ± 9,7 (ab.)	360,2 ± 25,0 (mor.) 136,0 ± 9,2 (ab.)	200 ± 60 (8-15 Jahre) 76,5 ± 11,5 (8 Jahre)	RIA (ohne Extraktion)	Granger et al. 99 ³⁷

5 Zusammenfassung

Das Interesse an Dehydroepiandrosteron in seiner physiologischen Rolle im Körper, besonders im Alter, und als Substitutionstherapie bei Nebennierenrindeninsuffizienz mit Verbesserung von Sexualität, Wohlbefinden und Müdigkeit wächst in den letzten Jahren immer mehr.

Die Messung von Steroidhormonen im Speichel bietet Vorteile in der Bestimmung der aktiven, nicht an Proteine gebundenen Fraktion und in der einfacheren und stressfreieren Probengewinnung in Studien oder Klinik, insbesondere bei Kindern.

Durch Modifizierung eines kommerziellen Testkits für die Bestimmung von DHEA im Serum gelang es, einen Radioimmunoassay zur Speichelmessung zu Verfügung zu stellen, der allen Anforderungen an Stabilität, Präzision und einfacher Handhabung genügt (siehe Tabelle 8, S.46).

Die Reproduzierbarkeit der Standardkurven lag mit $r = 0,998$ sehr hoch. Bei der Sensitivität ergab sich ein Detektionslimit von 7,5 bzw. 2,5 pg/ml im mitgelieferten bzw. physiologischen Nullstandard. Die Interassayvarianz hatte Variationskoeffizienten (VC) von 4,7 bis 12,6%. Die Intraassayvarianz ergab im Präzisionsprofil VCs zwischen 1,6 und 3,5%. Die Genauigkeit der Messung wurde mittels linearer Verdünnung bzw. Zugabe von DHEA bestimmt und lag im Mittel bei 86,6 und 115,6% bzw. 88,2 und 91,8%. Die Korrelation von Serum- und Speichelwerten bei $r(19) = 0,94$ mit $p < 0,0001$. Speichelproben von jungen erwachsenen Probanden ($n = 26$, 20-36 Jahre) zeigten eine klare zirkadiane Rhythmik ($p < 0,0001$). Die Messwerte männlicher Probanden lagen bei 364 pg/ml (SEM = 57) morgens und 120 pg/ml (SEM = 21) abends. Frauen hatten mit 190 pg/ml (SEM = 23) bzw. 80 pg/ml (SEM = 14) niedrigere Werte.

In einer bisher erstmaligen Studie wurden Speichelmessungen an Klein- und Schulkinder zwischen 3 und 12 Jahren durchgeführt. Zwischen dem 7. und 10. Lebensjahr war ein signifikanter Anstieg der Speichelwerte zu verzeichnen, ein Hinweis auf die sich in dieser Altersgruppe ereignende Adrenarche.

Speichelproben einer Substitutionsstudie mit DHEA i.m. wiesen eine deutliche Konzentrationssteigerung am 2. Tag nach Verabreichung auf mit nachfolgendem langsamen Abfall der Speichelkonzentrationen. Ein Einsatz des Speichel-RIAs als einfache Spiegelkontrolle nach Verabreichung von DHEA scheint somit möglich.

Auf Grund häufiger Verfälschung von Messwerten bei Konzentrationsbestimmungen von Steroidhormonen im Speichel werden Empfehlungen zur Probengewinnung gegeben. Der Speichel sollte ohne Hilfsmittel wie Baumwoll- oder Polyestersalivetten und ohne orale Stimulantien gewonnen werden. In der präanalytischen Weiterverarbeitung empfiehlt es sich, Muzine und Detritus durch Zentrifugation und Einfrieren zu präzipitieren und somit abzutrennen.

5.1 Serum- und Speichelassay-Protokolle im Vergleich

Tabelle 8 Vergleich der Assayprotokolle von Serum- und Speichel-RIA.

Speichelassay	Serumassay
20 µl von Standards und Kontrollen in die Röhrchen pipettieren	100 µl von Standards, Kontrollen und Proben in die Röhrchen pipettieren.
+	
280 µl PBS-Puffer in NSB und 180 µl in Standards und Kontrollen zugeben und vortexen	
+	
200 µl von aufgetauten und zentrifugierten Proben in die Röhrchen pipettieren	
⇓	⇓
400 µl von 1:5 verdünntem ¹²⁵ J-DHEA in alle Röhrchen	500 µl ¹²⁵ J-DHEA in alle Röhrchen
⇓	⇓
100 µl von 1:3 verdünntem DHEA-Antiserum zugeben (ausser TA und NSB)	100 µl DHEA-Antiserum zugeben (ausser TA und NSB)
+	+
Vortexen und über Nacht bei 4°C inkubieren	Vortexen und bei 37°C eine Stunde inkubieren
⇓	⇓
1000 µl präzipitierende Reagenz in alle Röhrchen ausser TA	⇓
Vortexen und 30 min. bei RT inkubieren	Vortexen und 10-15 min. bei RT inkubieren
⇓	⇓
Bei 3000 U/min. für 20 min. bei RT zentrifugieren	Bei 3000 U/min. für 15-20 min. gekühlt zentrifugieren
⇓	⇓
Alle Röhrchen (ausser TA) auf Fliesspapier dekantieren und gut aufstoßen	⇓
Im Gammacounter 2 min. messen	Im Gammacounter 1min. messen

6 Literaturverzeichnis

- ¹ BELANGER A., CARRIDAS B., DUPONT A., CUSAN L., DIAMOND P., GOMEZ J.L. & LABRIE F. 1994. Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40 to 80 year old men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **79**: 1086-1090
- ² ORENTREICH N., BRIND J.L., RIZER R.L. & VOGELMANN J.H. 1994. Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **59**: 551-555
- ³ BALIEU E.E. 1996. Dehydroepiandrosterone (DHEA): a fountain of youth? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**: 3147-3151
- ⁴ SONKA J. 1976. Dehydroepiandrosteron. Metabolic effects. *Acta Univ. Carol., Praha.* **71**: 146-171.
- ⁵ DUNN J.F., NISULA B.C. & RODBARD D. 1981. Transport of steroid hormones: Binding of 21 endogeneous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **53**:58-68.
- ⁶ LONGCOPE C. 1986. Adrenal and gonadal androgen secretion in normal females. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **15**:213-228.
- ⁷ SWINKELS L.M.H.W., ROSS H.A., SMALS A.G.H. & BENRAAD Th.J. 1990. Concentrations of total and free dehydroepiandrosterone in plasma and dehydroepiandrosterone in saliva of normal and hirsute women under basal conditions and during administration of dexamethasone/synthetic corticotropin. *Clin. Chem.* **36/12**:2042-2046.
- ⁸ L'Allemand D. 1994. Regulation der adrenalen Androgene. *In* Allolio B., Schulte H.M. (Eds.): *Moderne diagnostische und therapeutische Strategien bei Nebennierenerkrankungen.* Schattauer Verlag, Stuttgart.
- ⁹ VERMEULEN A. 1980. Adrenal androgens and aging. *In*: Genazzani A.R., ed. *Adrenal androgens.* New York: Raven Press, S. 207-217.

- ¹⁰ DE PERETTI E. & FOREST M.G. 1978. Pattern of plasma dehydroepiandrosterone sulfate levels in humans from birth to adulthood: evidence for testicular production. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **47**:572-577.
- ¹¹ NIESCHLAG E., LORIAUX D.L. & RUDER H.J., et al. 1973. The secretion of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in man. *J. Endocrinol.* **57**:123-134.
- ¹² BIRD C.E., MASTERS V. & CLARK A.F. 1984. Dehydroepiandrosterone sulfate: kinetics of metabolism in normal young men and women. *Clin. Invest. Med.* **7**:119-122.
- ¹³ LABRIE F. 1991. At the cutting edge: Intracrinology. *Mol. Cell. Endocrinol.* **78**:C113-C118.
- ¹⁴ REGELSON W., LORIA R. & KALIMI M. 1995. Dehydroepiandrosterone (DHEA) – the “mother steroid” I. Immunologic action. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 744.
- ¹⁵ NAFZIGER A.N., HERRINGTON D.M. & BUSH T.L. 1991. Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate: their relation to cardiovascular disease. *Epidemiol. Rev.* **13**:267-293
- ¹⁶ WESTPHAL U. 1971. Steroid interactions with serum proteins other than specific glycoproteins. *In Steroid Protein Interactions.* Anonymous: 84-132. Springer-Verlag. New York.
- ¹⁷ EBELING P. & KOIVISTO V.A. 1994. Physiological importance of dehydroepiandrosterone. **343**:1479-1481.
- ¹⁸ BERNADIER C., PARENTE J. & MCINTOSH M. 1993. Is dehydroepiandrosterone an antiobesity agent? *FASEB J.* **7**:414-419.
- ¹⁹ LABRIE F., DIAMOND P., CUSAN L., GOMEZ J.L., BELANGER A. & CANDAS B. 1997. Effect of 12 month dehydroepiandrosterone replacement therapy on bone, vagina and endometrium in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**:3498-3505.

- ²⁰ GORDON G.B., BUSH D.E. & WEISMAN H.F. 1988 Reduction of atherosclerosis by administration of dehydroepiandrosterone. *J. Clin. Invest.* **82**:712-720.
- ²¹ SCHWARTZ A.G. 1979. Inhibition of spontaneous breast cancer formation in female C3H (A^{vy}/a) mice by long-term treatment with dehydroepiandrosterone. *Cancer Res.* **39**:1129-1131.
- ²² BERR C., LAFONT S., DEBUIRE B., DARTIGNES J.F. & BAULIEU E.E. 1996. Relationships of dehydroepiandrosterone sulfate in the elderly with functional, psychological, mental status, and short-term mortality: a French community-based study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:13410-13415.
- ²³ ARLT W., CALLIES F., VAN VLIJMEN J.C., KÖHLER I., REINCKE M., *et al.* & ALLOLIO B. 1999. Dehydroepiandrosterone replacement in women with adrenal insufficiency. *N. Engl. J. Med.* **341/14**:1031-1020.
- ²⁴ ROSENFELD R.S., ROSENBERG B.J., FUKUSHIMA D.K. *et al.* 1975. 24-hour secretory pattern of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **40**:850-855.
- ²⁵ LIU C., LAUGHLIN G.A., FISCHER V.G., & YEN S.S.C. 1990. Marked attenuation of ultradian and circadian rhythms of dehydroepiandrosterone in postmenopausal women: Evidence for a reduced 17,20-desmolase enzymatic activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **71**:900-906.
- ²⁶ DE PERETTI E. & FOREST M.G. 1976. Unconjugated dehydroepiandrosterone plasma levels in normal subjects from birth to adolescence in human: The use of a sensitive Radioimmunoassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **43**:982-991.
- ²⁷ ŠULCOVÁ J., HILL M., HAMPL R., & STÁRKA L. 1997. Age and sex related differences in serum levels of unconjugated dehydroepiandrosterone and its sulphate in normal subjects. *J. Endocr.* **154**:57-62.
- ²⁸ PARKER L.N. 1991. Adrenarche. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **20(1)**:71-83.

- ²⁹ PARKER L.N. 1991. Control of adrenal androgen secretion. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **20(2)**:401-421.
- ³⁰ ZUMOFF B. ROSENFELD R.S. STRAIN G.W. LEVIN J. & FUKUSHIMA D.K. 1980. Sex difference in the twenty-four-hour mean plasma concentrations of dehydroepiandrosterone (DHA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHAS) and the DHA to DHAS ratio in normal adults. *J. Clin. Endocrin. Metab.* **51**:330-333.
- ³¹ VINNING R.F. & MCGINLEY R.A. 1987. The measurement of hormones in saliva: possibilities and pitfalls. *J. steroid. Biochem.* **27/1-3**:81-94.
- ³² RIAD-FAHMY D., READ G.F., WALKER R.F. & GRIFFITHS K. 1982. Steroids in saliva for assessing endocrine function. *Endocr. Rev.* **3/4**:367-395.
- ³³ VINNING R.F. & MCGINLEY A. 1984. Transport of steroids from blood to saliva. *In* Immunoassays of steroids in saliva. READ G.F., RIAD-FAHMY D., WALKER R.F., GRIFFITHS K. (Ed.). Alpha Omega, Cardiff. S.56-63.
- ³⁴ CHARD T. 1990. *In* An introduction to radioimmunoassay and related techniques (4th ed.). Elsevier. Amsterdam.
- ³⁵ STROBACH H. 1994. *In* Kochbuch der immunologischen Analytik-Radioimmunoassay und verwandte Methoden. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, New York.
- ³⁶ DABBS JR. J. M. 1991. Salivary testosterone measurements: Collecting, storing, and mailing saliva samples. *Physiol. Behav.* **49**: 815-817.
- ³⁷ GRANGER D.A., SCHWARTZ E.B., BOOTH A., CURRAN M. & ZAKARIA D. 1999. Assessing dehydroepiandrosterone in saliva: a simple radioimmunoassay for use in studies of children, adolescents and adults. *Psychoneuroendocrinology.* **24**:567-79.
- ³⁸ GASKELL J. & PIKE A., 1979. Gas chromatography-high resolution mass spectrometry in the analysis of steroids in physiological fluids. *In* Quantitative mass spectrometry in life science II. De Leenheer A.P., Roncucci R.R., Van Peteghem C. Eds., Elsevier. Amsterdam. S. 181-189.

- ³⁹ GASKELL J., PIKE A. & GRIFFITHS K. 1980. Analysis of testosterone and dehydroepiandrosterone in saliva by gas chromatography-mass spectrometry. *Steroids*: **36**:219-28.
- ⁴⁰ VITTEK J., RAPPAPORT S.C., GORDON G.G. & SOUTHREN A.L., 1983. Circadian rhythms in the concentration of salivary steroid hormones in postmenopausal females. *IRCS Med. Sci.* **11**:768-769.
- ⁴¹ VITTEK J., KIRSCH S., RAPPAPORT S.C., BERGMAN M & SOUTHREN A.L. 1984. Salivary concentrations of steroid hormones in males and in cycling and postmenopausal females with and without periodontitis. *J. Periodont. Res.* **19**:545-555.
- ⁴² LAC G., LAC N. & ROBERT A. 1993. Steroid assays in saliva: a method to detect plasmatic contaminations. *Arch. Physiol. Bioch. Biophys.* **101**:257-262.
- ⁴³ FILAIRE E., PASCALE D. & LAC G. 1998. Effects of amount of training on the saliva concentrations of cortisol, dehydroepiandrosterone and on the dehydroepiandrosterone: cortisol concentration ratio in women over 16 weeks of training. *Eur. J. Appl. Physiol.* **78**:466-471.
- ⁴⁴ KURIHARA H., CHIBA H., SHIMIZU Y., YANAIHARA T., TAKEDA M., KAWAKAMI K. & TAKAI-KAWAKAMI K. 1996. Behavioral and adrenocortical responses to stress in neonates and the stabilizing effects of maternal heartbeat in them. *Early Hum. Dev.* **46**:117-27.
- ⁴⁵ GOODYER I.M., HERBERT J., ALTHAM P.M.E., PEARSON J., SECHER S.M. & SHIERS H.M. 1996. Adrenal secretion during major depression in 8- to 16-year-olds, I. Altered diurnal rhythms in salivary cortisol and dehydroepiandrosterone (DHEA) at presentation. *Psychological Med.* **26**:245-56.

*Jesus nahm den Blinden bei der Hand
und führte ihn aus der Stadt.
Er spuckte ihm in die Augen,
legte ihm die Hände auf und fragte:
"Kannst Du etwas erkennen?"*

Markus 8,16

G.M. Addisons Schlusswort der closing session des Workshops „Immunoassays of steroids in saliva“ (Alpha Omega Publishing, Cardiff 1982)

Herrn Professor Dr. B. Allolio danke ich für die Überlassung des Themas, sowie die freundliche und hilfsbereite Unterstützung bei Planung und Durchführung der Untersuchungen.

Ebenso danke ich Dr. M. Fassnacht für seine Hilfestellungen bei der praktischen Umsetzung der Untersuchungen.

Ohne die Einführung in die Techniken des Radioimmunoassays durch Fr. Meißner und Fr. Merz wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen. Herzlichen Dank.

Lebenslauf

Name: Tobias Fischer

Adresse: Rosengartstr. 18, 74076 Heilbronn

Geburtsdatum: 26.03.1974

Geburtsort: Neuendettelsau

Familienstand: Verheiratet mit Claudia Fischer geb. Herrmann, ein Sohn Johannes Fischer

Eltern: Dr. Walter Anton Emil Fischer
Waltraud Fischer, geb. Caspersmeyer

Schulbildung: 1980 – 1984 Grundschule Ornbau
1984 – 1993 Gymnasium Windsbach
1993 Abitur in Windsbach

Studium: 1994 – 2000 Vorklinik und Klinik der Humanmedizin, Universität Würzburg
2000 – 2001 Praktisches Jahr im Klinikum Villingen-Schwenningen, Universität Freiburg
seit 1998 Dissertation im endokrinologischen Labor, Universität Würzburg

Berufliche Tätigkeit: seit 2002 Arzt im Praktikum in der urologische Abteilung des Klinikums VS-Schwenningen
seit 2003 Assistenzarzt Innere Medizin Krankenhaus Möckmühl

Heilbronn, den 06.01.04