

---

**Verlauf von Plasma-Oxytocin in einem sozialen  
Ausschlussparadigma bei gesunden Probanden  
– Vergleich zweier methodischer Ansätze zur  
Bestimmung von Oxytocin**

Hannah Carola Windmüller

---



München 2021



Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie  
Klinikum Ludwig–Maximilians–Universität München

---

**Verlauf von Plasma-Oxytocin in einem sozialen  
Ausschlussparadigma bei gesunden Probanden  
– Vergleich zweier methodischer Ansätze zur  
Bestimmung von Oxytocin**

---

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der  
Medizinischen Fakultät  
der Ludwig–Maximilians–Universität zu München

vorgelegt von

Hannah Carola Windmüller

aus Neuss

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Frank Padberg

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Günther K. Stalla  
PD Dr. Matthias Weigl

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Andrea Jobst-Heel  
Prof. Dr. Julia Dewald-Kaufmann

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2021

*Für Valentin*



# Inhaltsverzeichnis

<b>Kurzfassung</b>	<b>xv</b>
<b>1 Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
<b>2 Grundlagen</b>	<b>5</b>
2.1 Oxytocin . . . . .	5
2.1.1 Bildung und Freisetzung . . . . .	6
2.1.2 Rezeptor . . . . .	8
2.1.3 Zentrale Wirkung . . . . .	9
2.1.4 Periphere Wirkung . . . . .	12
2.1.5 Psychische Erkrankungen . . . . .	13
2.2 Vasopressin . . . . .	14
2.3 Bindungstheorie . . . . .	15
2.3.1 Grundzüge der Bindungstheorie . . . . .	15
2.3.2 Neurobiologische Grundlagen . . . . .	17
2.4 Sozialer Ausschluss - Ostrazismus . . . . .	18
2.4.1 Cyberball-Paradigma . . . . .	19
2.4.2 Need-Threat-Model . . . . .	20
2.4.3 Social Reconnection Hypothese . . . . .	21
<b>3 Analysemethoden zur Oxytocinbestimmung</b>	<b>23</b>
3.1 Grundlagen der Immunoassays . . . . .	23
3.2 Validierung und Kalibrierung . . . . .	27
3.3 Extraktion . . . . .	29
3.4 Radioimmunoassay . . . . .	30
3.5 Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay . . . . .	32
3.6 Andere Analysemethoden zur quantitativen Oxytocinbestimmung . . . . .	33
3.7 Aktueller Stand der Forschung . . . . .	35
<b>4 Versuchsaufbau</b>	<b>37</b>
4.1 Testpersonen . . . . .	37

4.2	Versuchsdurchführung . . . . .	38
4.2.1	Rekrutierung und Probandenauswahl . . . . .	38
4.2.2	Telefonscreening . . . . .	39
4.2.3	Tag der Testung . . . . .	40
4.2.4	Blutentnahmen . . . . .	45
4.3	Modifiziertes Cyberball-Paradigma . . . . .	46
4.4	Methoden zur Oxytocinbestimmung . . . . .	50
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
5.1	Vergleich der Absolutwerte . . . . .	54
5.1.1	T-Test . . . . .	54
5.1.2	Korrelation . . . . .	56
5.1.3	Nichtlineare Zusammenhänge . . . . .	57
5.2	Vergleich nach Normalisierung der Messwerte . . . . .	60
5.2.1	Konkordanz-Korrelationskoeffizient . . . . .	61
5.2.2	Bland-Altman-Plots . . . . .	61
5.3	Vergleich der Kurvenverläufe . . . . .	63
5.4	Qualitativer Vergleich . . . . .	65
5.5	Fallstudie zur Ergebnisgleichheit in klinischen Studien . . . . .	67
5.5.1	ELISA . . . . .	67
5.5.2	RIA . . . . .	69
5.5.3	Vergleich der Auswertungen der ELISA- und RIA-Messwerte . . . . .	70
5.6	Einfluss der Lagerungszeit . . . . .	71
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>73</b>
6.1	Studienaufbau . . . . .	73
6.2	Ergebnisse des Methodenvergleichs . . . . .	75
6.2.1	Vergleich der Absolutwerte . . . . .	75
6.2.2	Vergleich nach Normalisierung der Messwerte . . . . .	77
6.2.3	Vergleich der Kurvenverläufe . . . . .	78
6.2.4	Qualitativer Vergleich . . . . .	78
6.2.5	Ergebnisgleichheit . . . . .	78
6.2.6	Bewertung . . . . .	79
6.3	Grenzen der Studie . . . . .	79
6.4	Ausblick . . . . .	81
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung und Fazit</b>	<b>83</b>
	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>85</b>

<b>A Weitere Fragebögen</b>	<b>87</b>
A.1 Verschickte Fragebögen . . . . .	87
A.2 Fragebögen während der Testung . . . . .	89
<b>B Probandenkommunikation</b>	<b>91</b>
B.1 Aushang zur Rekrutierung . . . . .	92
B.2 Probandeninformation . . . . .	93
B.3 Einverständniserklärung . . . . .	96
B.4 Einverständniserklärung zum Datenschutz . . . . .	97
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>99</b>
<b>Danksagung</b>	<b>111</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>113</b>



# Abbildungsverzeichnis

2.1	Strukturformel von Oxytocin . . . . .	6
2.2	Bildungs- und Speicherorte von Oxytocin im Gehirn . . . . .	7
3.1	Funktionsprinzip der gängigsten Immunoassays . . . . .	24
3.2	Typische Verläufe der Messwerte bei Immunoassays . . . . .	26
3.3	Kalibrationskurve des verwendeten ELISA . . . . .	29
4.1	Schematische Übersicht über den Ablauf der Testung . . . . .	41
4.2	Versuchsaufbau aus der Perspektive der Probandin . . . . .	43
4.3	Versuchsaufbau aus der Perspektive der Versuchsleiterin . . . . .	44
4.4	Cyberball: Startbildschirm mit den Instruktionen zum Spiel . . . . .	47
4.5	Cyberball: Bewertung der Mitspielerinnen vor Spielstart . . . . .	48
4.6	Cyberball: Einwahl in das Spiel . . . . .	49
4.7	Cyberball: Typische Spielszene . . . . .	49
5.1	Streudiagramm für RIA/ELISA Messpaare . . . . .	56
5.2	Plot zur Visualisierung der Messwiederholungskorrelation . . . . .	58
5.3	Bland-Altman-Plots für normalisierte Messwerte . . . . .	62
5.4	Einzelmesswerte von Oxytocin mit Verlaufskurven . . . . .	64
5.5	Qualitativer Vergleich der Tendenzaussagen . . . . .	65
5.6	Boxplot zu den ELISA-Messwerten . . . . .	68
5.7	Boxplot zu den RIA-Messwerten . . . . .	69
5.8	Rangkorrelation zwischen Lagerungszeit und OT-Wert . . . . .	72



# Tabellenverzeichnis

5.1	Deskriptive Statistiken der RIA und ELISA Messwerte . . . . .	53
5.2	Tests auf Normalverteilung . . . . .	54
5.3	Deskriptive Statistiken für den <i>t</i> -Test zwischen RIA und ELISA . . . . .	55
5.4	<i>t</i> -Test zwischen RIA und ELISA Messpaaren . . . . .	55
5.5	Korrelation nach Pearson zwischen den RIA und ELISA Messwerten . . . . .	57
5.6	Nicht parametrische Korrelation zwischen RIA und ELISA . . . . .	59
5.7	Deskriptive Statistiken nach Normalisierung der Messwerte . . . . .	60
5.8	Tests auf Normalverteilung nach Normalisierung der Messwerte . . . . .	61
5.9	Kreuztabelle der Tendenzaussagen von Baseline zu Messpunkt 2 . . . . .	66
5.10	Kreuztabelle der Tendenzaussagen von Messpunkt 2 zu 3 . . . . .	66
5.11	Kreuztabelle der Tendenzaussagen von Messpunkt 3 zu 4 . . . . .	66
5.12	Kreuztabelle der Tendenzaussagen von Messpunkt 4 zu 5 . . . . .	67
5.13	Deskriptive Statistiken ELISA ohne Extremwerte . . . . .	68
5.14	Deskriptive Statistiken RIA ohne Extremwerte . . . . .	70
5.15	Dunn-Test der RIA Messwerte zu unterschiedlichen Messzeitpunkten . . . . .	70



# Kurzfassung

Oxytocin (OT) spielt als Hormon und Neurotransmitter bei zahlreichen sozialen Interaktionen wie der Beziehung zwischen Mutter und Säugling, elterlichem Fürsorgeverhalten, in Paarbeziehungen, dem sozialen Gedächtnis sowie bei der Angst- und Stressregulation eine Rolle. Damit einhergehend hat es eine nicht zu vernachlässigende Auswirkung auf die Regulation der psychischen Gesundheit. Bei einem gestörten OT-Regelkreis kann die Entstehung von psychischen Erkrankungen wie Depressionen, Angsterkrankungen und der Borderline-Persönlichkeitsstörung begünstigt sein. OT wird dabei als neurobiologischer Mediator früher negativer Beziehungserfahrungen zu späteren psychischen Problemen diskutiert. Um eine Dysfunktion im OT-Regelkreis nachzuweisen, kann OT beim Menschen im Blut, Speichel, Liquor oder Urin nachgewiesen werden, wobei sich insbesondere die Analyse aus Blutplasma etabliert hat. Zum jetzigen Stand der Forschung herrscht allerdings noch kein Konsens über die geeignetste Analysemethode für Oxytocin aus dem menschlichen Plasma. Diese Arbeit untersucht daher, ob OT-Plasmawerte, die mit dem Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) ermittelt wurden, äquivalent zu den Messwerten der etablierten Methode Radioimmunoassay (RIA) sind.

Dabei wurde der Vergleich von den OT-Baselinewerten durch den Vergleich von OT-Verlaufskurven im Rahmen einer sozialen Interaktion ergänzt. Da OT nach heutigem Kenntnisstand insbesondere in sozialen Situationen ausgeschüttet wird, welche bindungsrelevant sind, wurde der Vergleich beider Messmethoden im Kontext einer modifizierten Version des sogenannten *Cyberball-Paradigmas* durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein Computerspiel, in dem sozialer Ausschluss induziert wird. Die soziale Ausschlusssituation wurde aufgrund ihrer besonderen Relevanz für menschliches Bindungsverhalten sowie für klinisch-psychiatrische Kollektive gewählt. Die Proben stammen von 20 gesunden weiblichen Probandinnen im Alter zwischen 19 und 30 Jahren ( $M=24,10$ ;  $SD=2,69$ ).

Die Studienergebnisse zeigen, dass die durch RIA und ELISA ermittelten Messwerte aufgrund unterschiedlicher Größenordnungen der Werte nicht direkt miteinander vergleichbar sind. Bei Forschung an Oxytocin sind häufig nicht die absoluten Wer-

te relevant, sondern es werden stattdessen die relativen Veränderungen ausgehend von einem Basiswert verglichen. Die Übereinstimmung der beiden Messmethoden diesbezüglich wurde mittels des Konkordanz-Korrelationskoeffizienten sowie eines Bland-Altman-Plots untersucht. Hierbei zeigen sich unterschiedliche Aussagen über die relative Veränderung von bis zu 400% des Basiswertes. Die durch den RIA ermittelten Werte stützen die Social Reconnection Hypothese, wonach es bei gesunden Probandinnen aufgrund der während des *Cyberball-Paradigmas* gemachten Ostrazismuserfahrung zu einer Intensivierung von affiliativen Verhaltensweisen und damit einhergehend zu einer vermehrten OT-Ausschüttung kommt. Für die ELISA-Werte können hier keine statistisch signifikanten Veränderungen beobachtet werden.

# Kapitel 1

## Einleitung und Zielsetzung

Historisch betrachtet war Oxytocin lange Zeit nur in der Geburtshilfe als wehenförderndes Hormon, sowie zur Laktation der Brust und zum Stillen des Säuglings bekannt. Mittlerweile sind viele weitere Funktionen von Oxytocin bekannt und erforscht und es hat sich eine höchst aktive Gemeinschaft um die soziale neurowissenschaftliche Erforschung von Oxytocin und seinem Antagonisten Vasopressin gebildet (Meyer-Lindenberg et al. 2011). Das Hormon Oxytocin (OT) spielt im Zusammenhang mit psychischen Erkrankungen eine große Rolle bei der Regulation interpersonellen Erlebens und Verhaltens.

In der Forschung an menschlichen Probanden ist die Bestimmung des Oxytocingehaltes im Blutplasma die wichtigste Möglichkeit Veränderungen im endogenen Oxytocinsystem zu erfassen. Die zum jetzigen Zeitpunkt verfügbaren Analysemethoden zur Quantifizierung von OT aus dem Plasma sind der Radioimmunoassay (RIA) sowie der Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA). In den unterschiedlichen Forschungsgruppen existiert jedoch keine eindeutige Meinung darüber, welche der beiden Assays für die klinische Forschung zu bevorzugen ist. Im Allgemeinen gilt der RIA als die sensiblere und spezifischere Messmethode. Für den RIA wird aufgrund seiner radioaktiven Bestandteile spezielle Laborausrüstung benötigt und es wird radioaktiver Abfall produziert, der unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen entsorgt werden muss. Zusätzlich ist eine lange Lagerung der Isotopen nicht möglich und deshalb eine zeitnahe und häufige Durchführung des RIAs essentiell. Beim ELISA wird der Antikörper enzymmarkiert und kann dadurch von jedem in Labortechniken ausgebildeten Mitarbeiter durchgeführt werden.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob der ELISA der Firma Enzo Life Science vergleichbare wissenschaftlich belastbare Ergebnisse liefert wie der RIA, der bei RIAGnosis, München, durchgeführt wird. Dabei werden folgende wesentliche Fragestellungen betrachtet:

- Sind die Absolutwerte von RIA und ELISA vergleichbar?
- Gleichen sich die Kurvenverläufe von RIA und ELISA bei einem Versuchsaufbau mit Messwiederholung? Sind also die relativen Veränderungen gleich?
- Herrscht zwischen den Messmethoden Kongruenz bezüglich der daraus ableitbaren Ergebnisse für wissenschaftliche Studien?

Als Teilprojekt zu dem übergeordneten Projekt "Oxytocinausschüttung in sozialen Situationen – vergleichende Untersuchung bei Borderline-Patienten, chronisch Depressiven, episodisch Depressiven, Patienten mit somatoformen Störungen sowie gesunden Kontrollen" werden Oxytocinproben mittels der beiden verschiedenen Analysemethoden analysiert. Anhand der gewonnenen Proben wird in dieser Arbeit untersucht, ob zwei unabhängige Laboratorien, denen das gleiche Probenmaterial zur Verfügung steht, welches sie aber mit unterschiedlichen Assaymethoden analysieren, zu den gleichen wissenschaftlichen Schlussfolgerungen gelangen würden. Dabei wird der Vergleich der OT-Baselinewerte durch den Vergleich von OT-Verlaufskurven im Rahmen einer sozialen Interaktion, dem *Cyberball-Paradigma*, ergänzt.

Da OT nach heutigem Kenntnisstand insbesondere in sozialen Situationen ausgeschüttet wird (Buchheim et al. 2009, Neumann 2009), welche bindungsrelevant sind, wird der Vergleich beider Messmethoden im Kontext einer modifizierten Version des sogenannten *Cyberball-Paradigmas* durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein Computerspiel, in dem sozialer Ausschluss induziert wird (Williams & Jarvis 2006). Die soziale Ausschlussituation wird aufgrund ihrer besonderen Relevanz für menschliches Bindungsverhalten sowie für klinisch-psychiatrische Kollektive gewählt. Nach heutigem Kenntnisstand ist davon auszugehen, dass Patienten mit den genannten psychischen Erkrankungen traumatische Kindheitserfahrungen durchlebt haben und dadurch eine gesteigerte Angst vor sozialer Zurückweisung und Ausgrenzung aufweisen, sowie Schwierigkeiten in sozialen Interaktionen zeigen (Neumann & Landgraf 2012, Heim et al. 2009, Slattery & Neumann 2010a). Es gibt Hinweise darauf, dass der OT-Regelungsmechanismus aufgrund der Erfahrungen gestört ist und diese Menschen andere neurobiologische Regulationsmechanismen zeigen (Neumann 2009, Heim & Nemeroff 2001). In vorausgegangenen Studien der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass psychisch gesunde Menschen andere Coping-Mechanismen aufweisen als Patienten mit chronischer Depression oder Borderline-Persönlichkeitsstörung und es im Zuge eines sozialen Ausschlusses zu einer vermehrten OT-Ausschüttung kommt (Jobst et al. 2014, 2016). Daraus leitet sich die Social Reconnection Hypothese ab. Diese besagt, dass Menschen in sozialen Gruppen, bei denen sich der Ausschluss aus der Gruppe abzeichnet, versuchen

sich wieder zu integrieren, indem sie soziale Verhaltensweisen zeigen und versuchen den Kontakt zu den anderen Gruppenmitgliedern wieder herzustellen (Derfler-Rozin et al. 2010, Maner et al. 2007, DeWall & Richman 2011, Stenseng et al. 2014).

Zu Beginn der Arbeit erfolgt ein Überblick über die Genese und Wirkung von Oxytocin und Vasopressin, sowie zu Grundlagen der Bindungstheorie und der Social Reconnection Hypothese in Kapitel 2. In Kapitel 3 werden die unterschiedlichen Analysemethoden für OT mit ihren Funktionsprinzipien vorgestellt. Zusätzlich gibt dieses Kapitel einen Überblick zum momentanen Stand der Methodenforschung im Bereich der Oxytocinmessung. Daran schließt sich Kapitel 4 an, welches das Studiendesign und die Versuchsdurchführung beschreibt. Die Ergebnisse des Methodenvergleichs werden in Kapitel 5 vorgestellt und in Kapitel 6 diskutiert. Kapitel 7 schließt mit einem zusammenfassenden Überblick über diese Arbeit.



# Kapitel 2

## Grundlagen

Oxytocin (OT) ist ein Hormon und Neurotransmitter mit vielen unterschiedlichen Funktionen und Wirkungsweisen im menschlichen Körper. Um diese Zusammenhänge besser zu verstehen gibt Kapitel 2.1 einen Überblick über die grundlegenden Eigenschaften und Wirkungen von Oxytocin. Kapitel 2.2 bildet einen kurzen Exkurs zu Vasopressin, dem Antagonisten von OT. Daran schließt sich Kapitel 2.3 an, welches die Bindungstheorie als Erklärungsmodell zur Entstehung von psychischen Erkrankungen vorstellt, sowie Kapitel 2.4 als Einführung in das Thema Sozialer Ausschluss.

### 2.1 Oxytocin

Die Wurzeln der Neuropeptidforschung reichen bis ins 19. Jahrhundert zurück, als zum ersten Mal gezeigt werden konnte, dass in der Hypophyse Hormone gebildet werden (Oliver & Schäfer 1895). OT ist ein Neuropeptid aus der Gruppe der Proteohormone das in der Hypophyse gebildet wird (Dale 1906). 1953 wurde Oxytocin erstmals von Vincent du Vigneaud am Cornell Medical College isoliert und synthetisiert, wofür er 1955 den Nobel Preis für Chemie erhielt. Kapitel 2.1.1 präsentiert den aktuellen Forschungsstand zur Genese und Emission von Oxytocin, Kapitel 2.1.2 beschreibt den Oxytocinrezeptor. Das Wort Oxytocin hat seinen Ursprung in der griechischen Sprache und heißt übersetzt *schnelle Geburt*. Es zeigt damit deutlich, in welchem Zusammenhang es entdeckt wurde (Lee et al. 2009). Dies geschah 1906 durch Henry Dale, er beschrieb die Wirkung auf den Geburtsvorgang. Kapitel 2.1.3 und Kapitel 2.1.4 geben die heutigen Erkenntnisse zur zentralen und peripheren Wirkung von OT wieder.

Der Mensch ist eine der Spezies, die am meisten auf soziale Bindungen, soziale Kommunikation sowie soziale Intelligenz angewiesen ist, um überleben zu können (Carter 2014). OT spielte bei der Evolution dieser Verhaltensweisen eine entschei-

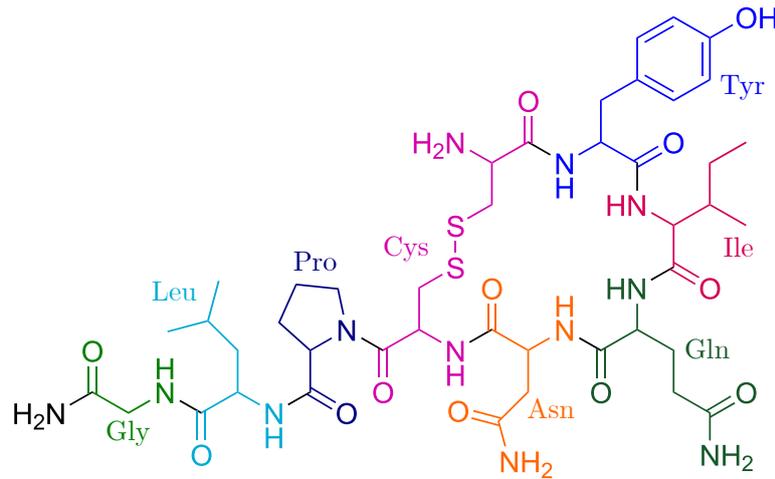


Abbildung 2.1: Strukturformel von Oxytocin. Die Aminosäuren sind in der Abbildung farblich gekennzeichnet und benannt.<sup>1</sup>

dende Rolle und ist auch heute noch für viele soziale Interaktionen wie Bindung, soziales Explorationsverhalten, Anerkennung und Bestätigung sowie in Zusammenspiel mit seinem Antagonisten Vasopressin (AVP) für Ängstlichkeit, Aggressionen und depressive Verstimmungen verantwortlich (Carter 2014, Meyer-Lindenberg et al. 2011). So wurde mittlerweile ein Zusammenhang zwischen Oxytocin und psychischen Erkrankungen wie Angststörungen, Depression, Borderline-Störung sowie Autismus festgestellt (Neumann & Landgraf 2012, DeVries et al. 2003). Dieser Zusammenhang wird in Kapitel 2.1.5 näher beschrieben.

### 2.1.1 Bildung und Freisetzung

Gene, die für oxytocinähnliche Peptide codieren, existieren schon seit mehr als 700 Millionen Jahren und konnten in vielen verschiedenen Lebewesen wie Insekten, Amphibien sowie Wirbeltieren nachgewiesen werden (Donaldson & Young 2008). So spielten schon frühe Formen dieser Peptide eine entscheidende Rolle bei der Modulation von sozialen Verhaltensweisen und zur Fortpflanzung (Donaldson & Young 2008, Goodson et al. 2012). Die OT-Spiegel in den einzelnen Spezies weisen deutliche Unterschiede auf (Kramer et al. 2004). OT besteht aus 9 Aminosäuren: Cystein, Tyrosin, Isoleucin, Glutamin, Asparagin, Cystein, Prolin, Leucin und Glycin. Die Strukturformel lautet H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub> (s. Abbildung 2.1). Die beiden Cystein-Reste bilden eine Disulfidbrücke und sind mit einem semi-flexiblen Carbonamid-Schwanz verbunden. Dadurch kann das Oxytocin-Molekül kurzzeitige oder langandauernde Bindungen mit anderen chemischen Strukturen eingehen (Carter 2014). Das OT-Gen ist auf Chromosom 20 lokalisiert und beinhaltet drei Exons und zwei Introns (Lee et al. 2009).

<sup>1</sup>Grafik: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Oxytocin\\_color.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Oxytocin_color.svg)

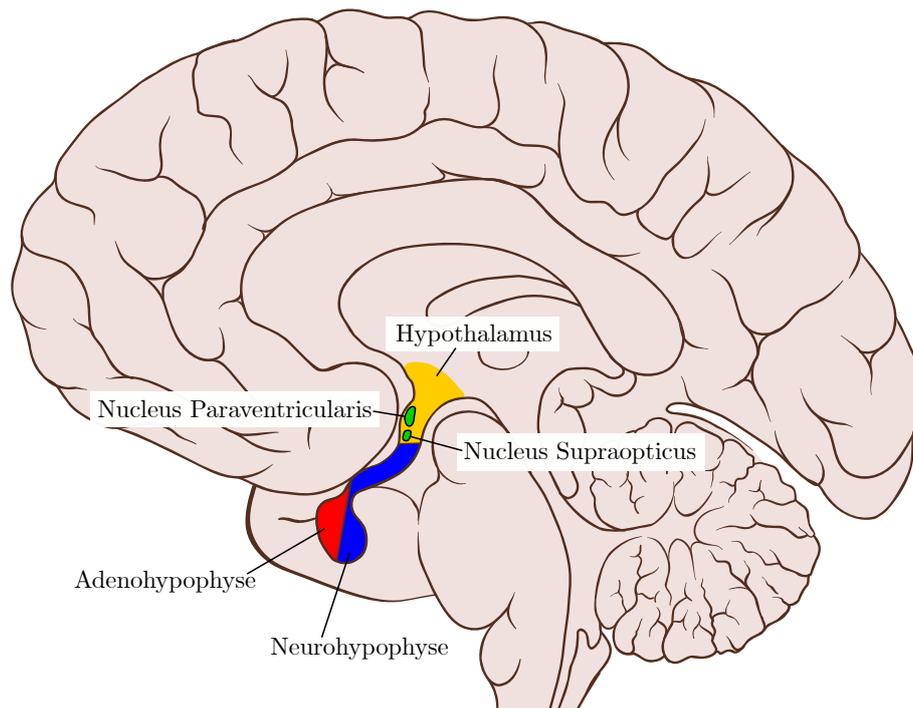


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Bildungs- und Speicherorte von Oxytocin im Gehirn.<sup>2</sup>

Abbildung 2.2 zeigt die Bildungs- und Speicherorte von OT im Gehirn. OT wird in den magnozellulären Neuronen der paraventriculären und supraoptischen Nuklei des Hypothalamus synthetisiert und tonisch sezerniert (Lee et al. 2009, Trepel 2008). Der Hypothalamus ist Teil des Diencephalons und wichtigstes Integrationszentrum vegetativer Strukturen wie der Atmung, des Kreislaufs, der Körpertemperatur, des Flüssigkeits- und Nahrungsverhaltens sowie des Reproduktionsverhaltens. Er bildet den Boden des dritten Ventrikels und wird basal von der Hypophyse, einer endokrinen Drüse, begrenzt. Der Hypothalamus verfügt über zahlreiche Efferenzen und Afferenzen zu Großhirnrindengebieten, Anteilen des limbischen Systems und des Thalamus sowie dem Hirnstamm, dem Rückenmark und intrahypothalamischen Gebieten (Trepel 2008). Über Axone wird OT in die Neurohypophyse im Hypophysenhinterlappen transportiert und dort in Vesikeln gespeichert. Durch Neurosekretion wird OT pulsatil an den Blutkreislauf sezerniert. Gleichzeitig wird es auch in andere Hirnregionen abgegeben (Trepel 2008, Neumann & Landgraf 2012, Lee et al. 2009) und kann dort schnell emotionale Funktionen und Reaktionen regulieren und justieren (Stoop 2012). Die pulsatile Freisetzung beruht auf der Plastizität der Hypothalamuszellen (Carter 2014). Durch hormonale oder soziale Stimuli durch-

<sup>2</sup>Grafik nach Patrick J. Lynch: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Brain\\_human\\_sagittal\\_section.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Brain_human_sagittal_section.svg)

laufen die oxytocinsynthetisierenden Zellen eine physikalische Transformation und Gliazellen, die normalerweise voneinander getrennt sind, werden elektrisch gekoppelt, was zur Freisetzung von OT führt (Carter 2014). Es wird sowohl peripher als auch zentral freigesetzt, was zu einer peripheren Hormonwirkung und einer zentralen Neurotransmitterwirkung führt (Vila 2014). Oxytocinproduzierende Zellen reagieren sensitiv auf OT, folglich wird die Funktion dieser Zellen durch einen autokrinen Feedback-Mechanismus reguliert (Carter 2014). Stimulation dieser Zellen führt zu einem Vorwärtsmechanismus, sodass noch mehr OT freigesetzt und produziert wird (Grippe et al. 2012).

### 2.1.2 Rezeptor

Die Funktion von OT ist an die Fähigkeit gekoppelt an spezifische Rezeptoren zu binden (Carter 2014). Die Expression der Rezeptoren wird von genetischen und epigenetischen Prozessen gesteuert (Ebstein et al. 2012). Bis jetzt wurde nur ein Rezeptor für OT beschrieben. Das Gen für diesen Rezeptor liegt auf dem Chromosom 3p24-26 (Gimpl & Fahrenholz 2001, Carter 2014). Die Signaltransduktion läuft folgendermaßen ab: Der Rezeptor gehört zum Rhodopsin-Typ mit einer sieben-transmembranären Domäne und ist G-Protein- sowie an Phosphorlipase-C (PLC) gekoppelt. PLC kontrolliert InsP3 und Diacylglycerol, welche beide zur Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus den intrazellulären Speichern führen und die Proteinkinase-C aktivieren (Ebstein et al. 2012). Interessanterweise gibt es einige Hinweise darauf, dass der Oxytocinrezeptor (OTR) mit den Rezeptoren von Vasopressin Dimere bilden kann (Cottet et al. 2010). Der Rezeptor findet sich im neuronalen Gewebe sowie in anderen Teilen des Körpers wie dem Uterus und der Mamma (Ebstein et al. 2012, Gimpl & Fahrenholz 2001, Carter 2014). Auch in Regionen, die soziale, emotionale und adaptive Verhaltensweisen steuern, ist der OTR vertreten. Dazu zählen die Amygdala, das autonome Nervensystem oder die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (Gimpl & Fahrenholz 2001, Carter 2014). Die Dichte und Lokalisation des Rezeptors spielt eine wichtige und kritische Rolle bei der Funktionsweise von OT (Insel 1997). In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass Veränderungen der Ausbreitung des OTR im Gehirn verantwortlich für die Einleitung der Geburt, das mütterliche Fürsorgeverhalten, Angstzuständen sowie dem sexuellen Verhalten sind (MacDonald & MacDonald 2010). Der OT-Rezeptor zeigt speziesspezifische Unterschiede in der Expression, was eine nicht zu vernachlässigende Relevanz in Bezug auf das Sozialverhalten sowie die emotionale Regulation der einzelnen Spezies hat (Carter 2014).

### 2.1.3 Zentrale Wirkung

Die zentrale Wirkung von Oxytocin ist sehr vielfältig und spielt bei vielen sozialen Verhaltensweisen eine wichtige Rolle. Die neuere Forschung zeigt deutliche Evidenz, dass OT die soziale Kognition, das soziale Gedächtnis sowie das Affiliationsbedürfnis in beiden Geschlechtern reguliert (Ross & Young 2009, Lee et al. 2009). Die Synthese und Sezernierung im Gehirn erfolgt aufgrund von angstausslösenden, stressbedingten sowie insbesondere auch sozialen negativen wie positiven Stimuli (Neumann & Landgraf 2012). Darüber hinaus führt es zum mütterlichen Fürsorgeverhalten, aber auch zu Aggressionen gegenüber Eindringlingen. Gerade auch in Paarbeziehungen spielt es eine Rolle, indem es das sexuelle Verhalten stimuliert (Vila 2014, Lee et al. 2009). Allgemein formuliert ist OT für die soziale Sensitivität und Zuwendung notwendig, sowie für die menschliche Sozialität und die Erziehung von Kindern. Es ist für die Vermittlung eines Sicherheitsgefühls verantwortlich (vgl. auch Kapitel 2.3). Des Weiteren hat OT einen regulierenden Einfluss auf das autonome Nervensystem, auf den Vagotonus, sowie antioxidantische und anti-inflammatorische Effekte, was die tiefgreifenden Konsequenzen des Sozialverhaltens für die psychische und physische Gesundheit erklärt (Carter 2014, Neumann 2008).

Um sich fürsorglich und wohlwollend um den Nachwuchs kümmern zu können, ist es wichtig, dass die Eltern eine Bindung zu dem Säugling aufbauen können. Dies wird durch den Anstieg an OT in der Postpartalphase unterstützt. So konnte in Experimenten mit Nagetieren nachgewiesen werden, dass die Injektion von OT in die lateralen Ventrikel bei kinderlosen Nagetieren zu mütterlich fürsorglichem Verhalten führt (Pedersen & Prange 1979, Gimpl & Fahrenholz 2001, Ross & Young 2009, Neumann 2008). Dabei sollte bedacht werden, dass OT nur für die Initiierung des Fürsorgeverhaltens verantwortlich ist, nicht aber für das Fürsorgeverhalten an sich (Gimpl & Fahrenholz 2001). In einer Studie beim Menschen konnte beobachtet werden, dass Stillen eine Stunde nach der Geburt die lebenslange Bindung zwischen Mutter und Säugling unterstützt und begünstigend auf die Entwicklung des Kindes wirkt (Gimpl & Fahrenholz 2001). Mittlerweile wurden diese Studien repliziert und es wurde gezeigt, dass fehlendes Fürsorgeverhalten und emotionale Vernachlässigung bis hin zu körperlichen Misshandlungen mit psychischen Erkrankungen assoziiert sind (Neumann 2009). Die Nachkommen werden maßgeblich durch ihre Betreuungspersonen emotional und physisch beeinflusst (Carter 2014). Aber nicht nur die Mutter-Kind-Beziehung wird durch OT unterstützt und verstärkt, auch bei männlichen Erwachsenen wie auch Wühlmäusen, die viel Zeit mit einem Säugling verbringen, führt die Interaktion zu einer vermehrten OT-Ausschüttung (Feldman 2012, Carter 2014).

Nicht nur in elterlichen Beziehungen zum Nachwuchs spielt OT eine Rolle, sondern auch in Liebesbeziehungen zwischen Erwachsenen. Als Initialzündung um sich in einen neuen Partner/in zu verlieben, braucht es Aufregung und Erregung (Arousal) (Fisher et al. 2006). Das Erleben von sexueller Erregung und Orgasmen lässt sich durch die Funktion von OT und APV erklären, was zu sympathischem Arousal ohne parasympathische Retraktion führt (Carter 2014). Um eine Liebesbeziehung einzugehen, braucht man Vertrauen (Kosfeld et al. 2005), Empathie (Hurlemann et al. 2010) sowie die Fähigkeit zu zwischenmenschlicher Kooperation (Carter 2014) und eine Aktivierung der Gehirnregionen, die mit Geselligkeit assoziiert sind (Jack et al. 2012). Außerdem bedarf es selektiven sozialen Verhaltens und sozialer Bindungen. So konnte in Studien mit Wühlmäusen gezeigt werden, dass OT für die Annäherung sowie selektive soziale Bindungen verantwortlich ist (Williams et al. 1994, Carter 2014, Ross & Young 2009). Neumann (2008) hat gezeigt, dass die Rezeptordichte für OT und AVP in bestimmten Gehirnregionen, wie dem Nucleus Accumbens und dem Präfrontalen Cortex, in monogam lebenden Wühlmäusen höher ist als in nicht monogam lebenden. Diese Gehirnregionen sind in das Belohnungssystem und der emotionalen Evaluation involviert, was entscheidend zur Paarbindung beiträgt.

Das soziale Gedächtnis ist essentiell für das frühe Überleben von Säugetieren, aber auch die Unterscheidung zwischen Freund und Feind bildet die biologische Grundlage für kontinuierliche soziale Bindungen (MacDonald & MacDonald 2010, Lee et al. 2009). In Studien an Nagetieren konnte gezeigt werden, dass soziales Erinnern und Erkennen sowie die Partnerpräferenz OT-abhängig sind (MacDonald & MacDonald 2010, Neumann 2008). Genau wie für andere zentrale OT-Funktionen spielt auch hier die Dichte der Rezeptoren im Nucleus Accumbens eine entscheidende Rolle. Bei Knockout-Mäusen mit einem dysfunktionalen OT-System zeigt sich, dass sie ihre Artgenossen schlechter erkennen können (MacDonald & MacDonald 2010, Neumann 2008). In sozialen Gruppen spielt das soziale Gedächtnis eine entscheidende Rolle, um selektive Bindungen unter den Mitgliedern eingehen zu können (Ross & Young 2009). Nach der intranasalen Applikation von OT bei menschlichen Probanden konnten beide Geschlechter Gesichter mit neutralen oder wütenden Gesichtsausdrücken schneller erkennen und einordnen (Savaskan et al. 2008). Eine nachfolgende Studie belegte, dass nach OT-Gabe das Erkennen von bekannten Gesichtern akkurater erfolgte (Ross & Young 2009). OT moduliert die Aufnahme sowie die Verarbeitung sozialer Informationen und verbessert das Zusammenleben in sozialen Gemeinschaften (Ross & Young 2009, Carter 2014). Dabei wird die Interpretation von mimischen Ausdrücken und der damit verbundene emotionale Zustand der anderen Mitglieder einer Gruppe treffsicherer (Domes et al. 2007).

Des Weiteren ist OT ein wichtiger Regulator von Angst. OT wirkt angstauslösenden sowie depressionsfördernden Effekten entgegen und moduliert neuronale Funktionen im Paraventriculären Nukleus und der Amygdala, die mit der physiologischen Stressreaktion verbunden sind (Neumann & Landgraf 2012). Dies wird besonders deutlich in Zeiten von hoher endogener OT-Ausschüttung wie beim Stillen (Slattery & Neumann 2008) oder sexueller Aktivität (Neumann & Landgraf 2012). In Experimenten mit Nagetieren konnte dies bestätigt werden (Slattery & Neumann 2010*b*, Neumann & Landgraf 2012). Darüber hinaus scheint OT wichtig für den Ausdruck von Angst und Furcht zu sein, wie in einer weiteren Studie verifiziert wurde (Neumann & Landgraf 2012). Mit Hilfe seiner prosozialen Funktionen wirkt OT anxiolytisch (Donaldson & Young 2008, Neumann 2009). In Studien mit Mäusen wurde gezeigt, dass soziale Hinwendung sowie soziales Verhalten in der Gruppe abhängig von OT sind, wobei soziale Angst dieses Verhalten verhindert (Neumann & Landgraf 2012).

In sozialen Gemeinschaften ist soziale Unterstützung essentiell für das Überleben des einzelnen Individuum. Es reduziert die Stress-Antwort und hat einen positiven Effekt auf das Immunsystem (Ross & Young 2009). Es gibt Hinweise darauf, dass OT für diese Effekte verantwortlich ist (Ross & Young 2009, Neumann 2009). Soziale Unterstützung wirkt wohltuend und begünstigt eine schnellere Heilung bei Erkrankungen sowie Verletzungen. In Versuchen mit Hamstern konnte gezeigt werden, dass bei sozialen Wohnverhältnissen mit ihren Partnern zusammen das Stress-Level der Tiere, ausgedrückt durch den Cortisol-Spiegel, sank und ihre Wunden besser verheilten (Detillion et al. 2004). Die Hypothese ist, dass physischer Kontakt im Zusammenleben der Tiere die OT-Ausschüttung verstärkt. In zwei Studien wurde gezeigt, dass sensorische körperliche Stimulation wie Berührung, warme Temperaturen, Vibration und elektronische Akupunktur den OT-Spiegel im Blutplasma und im Liquor erhöhen (Uvnäs-Moberg et al. 1993, Stock & Uvnäs-Moberg 1988, Ross & Young 2009). Mittlerweile gibt es Hinweise darauf, dass OT nicht nur einen indirekten begünstigenden Einfluss auf das Immunsystem hat, sondern auch direkt eingreift. OT sowie der OTR wurden im Thymus gefunden, an dem Ort wo T-Lymphozyten geprägt werden und ihre spezifische Funktion im Immunsystem erhalten (Gimpl & Fahrenholz 2001). Der OTR besitzt Bindungsstellen für inflammatorische Cytokine und für akute-Phase-Proteine. Dies kann auch eine Erklärung dafür sein, warum Infektionen und Entzündungen Wehen auslösen können (Ross & Young 2009). Im Gehirn binden Interleukine an den OTR und führen so zur vermehrten Sezernierung von OT (Landgraf et al. 1995, Ross & Young 2009). OT begünstigt somit die Heilungschancen.

### 2.1.4 Periphere Wirkung

Bekannt wurde OT in der Geburtshilfe als wehenauslösendes Hormon und während der Laktation zur saugreizinitiierten Milchproduktion (Dale 1906). Die Forschung im Zusammenhang mit OT konzentrierte sich viele Jahre hauptsächlich auf diesen Bereich. Der Uterus von Schwangeren ist eines der bekanntesten Zielorgane von OT, welches als eines der potentesten wehenfördernden Mittel gerne in der Geburtshilfe eingesetzt wird. Bei Frauen konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von OT in Amnion, Chorion und der Dezidua stattfindet (Gimpl & Fahrenholz 2001). In Studien mit Rhesus Affen wurde eine positive Korrelation zwischen der mütterlichen OT-Konzentration, dem Fortschritt der Schwangerschaft und der nahenden Geburt gezeigt (Gimpl & Fahrenholz 2001, Hirst et al. 1993). Um den Zeitpunkt der Geburt steigt die Sensitivität des Uterus gegenüber OT. Dies wird durch eine Hochregulierung des mRNA-Levels des OT-Rezeptors sowie einem deutlichen Anstieg in der Dichte des OTR im Myometrium erklärt (Fuchs et al. 1995, Gimpl & Fahrenholz 2001). Dadurch kann OT die Kontraktionen des Uterus deutlich erhöhen, was bei nicht schwangeren Frauen nicht merklich spürbar wäre. Nach der Entbindung nimmt die Konzentration der Rezeptoren schnell wieder ab. Als wahrscheinliche Ursache wird die Vermeidung unerwünschter Uteruskontraktionen angesehen, wenn während der Laktation die OT-Level im Blut der Mutter wieder ansteigen (Gimpl & Fahrenholz 2001).

Daran anschließend spielt OT eine große Rolle für die Milch-Ejektion aus der Brustdrüse. Die Sekretion der Milch wird durch den Saugreiz des Säuglings an den Brustwarzen der Mutter getriggert. Die Stimulation von taktilen Rezeptoren generiert sensorische Impulse, die von den Brustwarzen zum Rückenmark und weiter zu den sekretorischen, OT-bildenden Neuronen des Hypothalamus geleitet werden. Jeder Impuls führt zu massiver Sekretion von OT in den Blutkreislauf und zum Transport von OT zur laktierenden Brust. Dort verursacht OT Kontraktionen in den Myoepithelzellen in der Wand der Ducti, der Sinus und den Alveolen. Die zentralen OT-Neuronen sind entscheidend für die Initiation und Aufrechterhaltung der erfolgreichen Laktation. Häufig wird der Reflex zur Laktation schon vor taktiler Stimulation durch das limbische System aktiviert, z.B. durch das Schreien des Säuglings. (McNeilly et al. 1983, Gimpl & Fahrenholz 2001)

Lange Zeit ging man davon aus, dass OT hauptsächlich nur im weiblichen Körper zu finden sei, wo es Funktionen während des Geburtsvorgangs und der Laktation übernimmt. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass auch bei Männern OT wichtige Funktionen erfüllt. So nimmt man an, dass OT die glatte Muskulatur im männlichen Reproduktionstrakt stimuliert. Es gibt Belege dafür, dass OT auch lokal in

den Hoden sowie Nebenhoden zu einem geringen Teil produziert wird. Daneben existieren OTR in der Prostata. Folglich wird suggeriert, dass OT in die Kontraktion der Prostata und der daraus resultierenden Ausscheidung von prostatistischem Sekret während der Ejakulation involviert ist. (Ivell et al. 1997, Frayne & Nicholson 1998, Gimpl & Fahrenholz 2001)

### 2.1.5 Psychische Erkrankungen

Wie in Kapitel 2.1.3 und Kapitel 2.1.4 erläutert präsentiert sich OT in seinen Funktionen vielfältig und nimmt eine wichtige Rolle als Neurotransmitter ein. Dabei sorgt OT für viele soziale Verhaltensweisen, die in sozialen Gruppen benötigt werden, um ein Teil der Gemeinschaft zu werden und um sich nach den Spielregeln der Gruppe verhalten zu können. Wenn der OT-Regelkreislauf gestört ist, kann die Entstehung verschiedener psychischer sowie physischer Erkrankungen begünstigt sein. Nach neuesten Erkenntnissen können frühe soziale Erfahrungen in der Kindheit auf die Entwicklung des OT-Regelkreises Einfluss nehmen. So wird OT mittlerweile als ein wichtiger Mediator früher negativer Beziehungserfahrungen hin zu späteren psychischen Problemen und Erkrankungen gesehen (Neumann 2009, Heim & Nemeroff 2001). Epigenetische Veränderungen im OT-Gen und OTR-Gen scheinen dabei eine entscheidende Rolle zu spielen (MacDonald & MacDonald 2010). Insbesondere interpersonelle Probleme und soziale Schwierigkeiten bei Menschen mit psychischen Problemen scheinen mit einer Dysregulation im OT-System zu korrelieren.

Autismus ist eine neuropsychologische Störung, die durch abnormale soziale Beziehungen wie gestörter Interaktion und Kommunikation sowie wiederholendem und stereotypischem Verhalten gekennzeichnet ist (Lee et al. 2009). Die Patienten/-innen, die unter Autismus leiden, können nicht angemessen auf Gesichtsausdrücke ihres Gegenübers oder auf eine veränderte Tonlage der Stimme reagieren (Ross & Young 2009). Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass Autismus mit einer Störung des OT-Regelkreises einher geht (Ross & Young 2009). Es konnte in einigen Fällen gezeigt werden, dass eine intravenöse Injektion von OT zu einer Verminderung von stereotypem Verhalten und einer besseren Auffassung von verschiedenen Tonnuancen während des Sprechens einhergeht (Lee et al. 2009).

Wie in Kapitel 2.1.3 erwähnt, zeigen Studien, dass OT anxiolytisch wirkt (Neumann & Landgraf 2012). Heim et al. (2009) haben mit ihrer Studie herausgefunden, dass Frauen, die in ihrer Kindheit Gewalt und Missbrauch erlebt haben, weniger OT im Liquor aufweisen und ängstlicher sind. Ähnlich wie bei Autismus zeigen einige Studienergebnisse, dass sich durch die intranasale Gabe von OT die Symptome der Patientinnen/-en mit sozialen Ängsten mildern ließen (Neumann & Landgraf 2012). OT schwächt Angst und Furcht in sozialen Situationen ab (Petrovic et al.

2008). Aufgrund der hohen Komorbidität von Angsterkrankungen und Depressionen ist es denkbar, dass den Erkrankungen die gleichen Ursachen und Mediatoren zugrunde liegen (Voderholzer 2015, Neumann & Landgraf 2012). In Nagetieren konnte gezeigt werden, dass synthetisches OT den Stress-coping-Mechanismus in aktiveres Verhalten verwandelte und dadurch antidepressiv wirken kann (Slattery & Neumann 2010a, Neumann & Landgraf 2012). Des Weiteren entfaltet OT positive Effekte bei anderen depressionstypischen Symptomen wie sexueller Dysfunktion, Schlafstörungen und Anhedonie (Neumann & Landgraf 2012). So konnte in erwachsenen Ratten gezeigt werden, dass OT das neuronale Wachstum stimuliert und die stressinduzierte Suppression der Neurogenese im Hippocampus inhibiert (Neumann & Landgraf 2012, Leuner et al. 2012).

Ein großer Risikofaktor, um im späteren Leben an einer psychischen Erkrankung zu leiden, ist eine unzureichende Bindung oder Beziehung zur Mutter (s. Kapitel 2.3). Wurden männliche Ratten von ihren Müttern kurz nach der Geburt getrennt, zeigten diese lebenslang ein erhöhtes Aggressivitätspotential, was durch Veränderungen in der Aktivität des AVP und Serotoninsystems erklärt wird (Neumann 2009). Weibliche Nagetiere, die in ihrer Kindheit kein mütterliches Fürsorgeverhalten erfahren haben, zeigen auch später als Mütter vermindertes Fürsorgerverhalten ihren Kindern gegenüber. Dieser Effekt basiert vermutlich auf epigenetischen Mechanismen (Weaver et al. 2004). So konnte auch gezeigt werden, dass Kinder von depressiven Müttern ein vermindertes OT-Baseline-Level zeigen, was auf eine unzureichende Stimulation des OT-Systems zurück zuführen sein könnte (Pratt et al. 2015). Wichtig zu verstehen ist, dass frühe Lebenserfahrungen das Gehirn beeinflussen und formen (Neumann 2009). Da viele Patientinnen/-en mit Borderline-Störung frühe Missbrauchs- und Vernachlässigungserfahrungen in ihrem Leben gemacht haben (Voderholzer 2015), liegt der Schluss nahe, dass sich während ihrer Entwicklung eine Störung im OT-Regelkreis gebildet haben könnte.

## 2.2 Vasopressin

Vasopressin (AVP) ist genauso wie OT ein Neuropeptidhormon mit unterschiedlichen peripheren und zentralen Wirkmechanismen (Carter 2014). AVP und OT sind sich strukturell und genetisch sehr ähnlich, sie unterscheiden sich nur in zwei Aminosäuren und verhalten sich in ihrer Synthese ähnlich (Carter 2014, Donaldson & Young 2008). Durch ihre ähnliche Struktur ist es möglich, dass sie an den Rezeptor des jeweils anderen Neurotransmitters im Gehirn andocken. Dabei verhalten sich OT und AVP antagonistisch zueinander und spielen evolutionär beide eine kritische Rolle bei der optimalen Reproduktion und dem Überleben (Carter 2014, Neumann

& Landgraf 2012, Stoop 2012).

Man geht davon aus, dass AVP die Schwelle zur Aggression senkt, was mit Verteidigungsverhalten für sich selbst, die Familie oder anderen Mitgliedern der sozialen Gruppe assoziiert ist (Carter 2014). AVP ist mit Stress und Aufregung assoziiert. Dies kann auch zu einer emotionalen Dysregulation führen (Carter 2014). AVP hebt den Blutdruck und spielt dadurch eine Rolle bei der Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder Schlaflosigkeit. Des Weiteren wurde ein Zusammenhang bei der Entstehung der posttraumatischen Belastungsstörung (PTBS) gefunden. Man geht davon aus, dass OT protektiv gegen PTBS wirkt, indem es einer durch AVP verursachten Hyperstimulation entgegen wirkt (Carter 2014). Manche Funktionen von AVP im Nervensystem sind geschlechtsspezifisch in Bezug auf das Abwehr- und Schutzverhalten sowie bei psychischen Erkrankungen wie z.B. Autismus, welcher häufiger beim männlichen Geschlecht vorkommt (Carter 2007).

## 2.3 Bindungstheorie

Oxytocin ist bekannt als das Hormon, das auf biochemischer Ebene die Bindung zwischen Mutter und Kind fördert. Komplementär zu diesen physiologischen Grundlagen beschreibt die Bindungstheorie von John Bowlby und Mary Ainsworth (Bowlby 1975, 1973, Ainsworth 1974) auf psychologischer Ebene, wie Menschen interagieren, um eine Bindung herzustellen. Laut Bowlby und Ainsworth bedeutet Bindung (engl. Attachment) eine besondere emotionale Verbindung zwischen einem Kind und seiner Bezugsperson über Raum und Zeit hinweg (Ainsworth 1974). Dabei ist das Bedürfnis nach Bindung instinktiv und evolutionsbiologisch angelegt. Jedoch hängen die Qualität der Bindung und die sich daraus entwickelnden Konsequenzen für das Kind vom Bindungspartner und zufälligen Lebensbedingungen ab (Grossmann & Grossmann 2014).

Die Bindungstheorie ist ein Erklärungsansatz, um die Entstehung von psychischen Erkrankungen, die durch Mangel an angemessenem Schutz und ausreichender Fürsorge entstanden sind, besser einordnen zu können (Grossmann & Grossmann 2014). Sie untersucht die Unterschiede in den Bindungserfahrungen einzelner Individuen und die damit verbundenen Auswirkungen auf die körperliche, psychische und soziale Entwicklung (Brisch & Hellbrügge 2009).

### 2.3.1 Grundzüge der Bindungstheorie

Der folgende Abschnitt stützt sich auf das Buch “Bindung - das Gefüge psychischer Sicherheit” von Grossmann & Grossmann (2014). Nach Ainsworth (Ainsworth 1974) und Bowlby durchläuft der Bindungsaufbau vier Phasen:

In der ersten Phase zeigt der Säugling ein genetisch determiniertes Verhalten um die Aufmerksamkeit und Nähe der primären Bindungsperson, in den meisten Fällen der Mutter, auf sich zu ziehen. In dieser Phase verläuft das Verhalten noch unspezifisch und nicht exklusiv auf die Mutter bezogen. Zu den typischsten Bindungsverhaltensweisen zählen: Weinen, Rufen, Anklammern, Nachfolgen, sowie Protest beim Verlassen werden. Diese Verhaltensweisen bleiben ein Leben lang bestehen und ändern lediglich ihre Form.

In der zweiten Phase wird das Verhalten des Säuglings spezifischer und richtet sich eher auf die Mutter oder wenige ihm vertraute Personen. So fällt es der Mutter leichter den Säugling zu beruhigen oder auch positive Emotionen bei ihm zu wecken.

Die dritte Phase ist aufgrund der raschen und zunehmenden Entwicklungsschritte durch ein aktiveres Verhalten des Kleinkindes seiner Mutter gegenüber gekennzeichnet. So hat der Säugling mittlerweile eine konkrete Vorstellung von seiner Mutter als Zentrum seines psychischen Raumes. Er entwickelt ein autonomeres Verhalten, indem er sich von der Mutter entfernt, flüchtet aber bei Angst oder Unwohlsein sofort wieder zurück.

Die vierte Phase beginnt mit dem Sprachverständnis des Kindes. Erst jetzt versteht es die Motive der Mutter und kann seine Wünsche auch artikulieren. So beginnt das Kind langsam zu begreifen, warum seine Wünsche und die Verhaltensweisen der Mutter nicht immer zusammen passen. Ab dem Vorschulalter entsteht eine zielkorrigierte Partnerschaft, wenn das Kind lernt, dass auch andere Menschen Wünsche und Bedürfnisse haben, die es zu berücksichtigen gilt.

Basierend auf den Bindungserfahrungen, die ein Kind während seiner ersten Lebensjahre macht, entwickelt es laut Bowlby (1980) internale Arbeitsmodelle (internal working models). Im Idealfall sollte ein gesunder psychischer Zustand nach Bowlby (1980) so beschrieben werden: Ein Kind entwickelt ein internes Arbeitsmodell von seinen Bindungspersonen welches besagt, dass sie prinzipiell verfügbar und bereit sind zu helfen, wenn sich das Kind dies wünscht. Es hat eine Vorstellung von sich als prinzipiell liebenswerte und wertvolle Person, die es verdient, dass ihr geholfen wird.

Spätere Forschungen haben die Bindungstheorie auf das Erwachsenenalter übertragen. Bartholomew & Horowitz (1991) unterscheiden zur besseren Differenzierung im Erwachsenenalter vier verschiedene Bindungsstile:

**Sicher:** Dieser Bindungsstil ist gekennzeichnet durch eine hohe Wertschätzung für sich selbst und andere. Personen mit diesem Stil können enge, intensive und vertrauensvolle Beziehungen mit anderen Menschen eingehen, ohne ihre Autonomie dadurch zu verlieren. Dabei zeigen sie eine offene, konsistente und

reflektierte Erzählweise.

**Anklammernd:** Bei Erwachsenen mit diesem Bindungsstil dominiert ein negatives Selbstbild und oft ein idealisierendes Bild einer Bindungsperson. Sie zeigen eine inkohärente Erzählweise in Bezug auf Beziehungen, welche durch emotionsgeladene und ausufernde, nicht objektive Details ergänzt werden. Dabei schwanken sie zwischen Idealisierung und Wut über die Bindungsperson.

**Abweisend:** Erwachsene mit abweisendem Bindungsstil haben ein positives Selbstbild und fürchten sich häufig vor Zurückweisung durch andere. Unter Betonung ihrer Autonomie verzichten sie auf enge Beziehungen und minimieren die Bindung zu anderen Menschen. Sie machen häufig inkohärente Angaben zu familiären Beziehungen, welche durch Erinnerungslücken an konkrete Erlebnisse sowie einer Idealisierung der Eltern gekennzeichnet sind.

**Ängstlich vermeidend:** Bei diesem Bindungsstil liegen oft traumatische Erfahrungen zugrunde, die noch nicht verarbeitet wurden. Diese Erwachsenen weisen ein geringes Selbstwertgefühl sowie ein tiefes Misstrauen gegenüber anderen Menschen auf. Enge Beziehungen werden vermieden. Sie können über ihre Bindungserfahrungen nur desorganisiert, irrational und inkohärent sprechen.

### 2.3.2 Neurobiologische Grundlagen

Es hat sich gezeigt, dass die Qualität und Quantität von mütterlicher Zuneigung einen essentiellen Einfluss auf die Entwicklung des Kindes hat (Neumann 2009). Dabei zeigt sich in vielen verschiedenen Studien, dass sich negatives Fürsorgeverhalten nicht nur negativ auf die psychische Entwicklung des Kindes auswirkt, sondern auch viele physische und somatische Erkrankungen fördert (Neumann 2009, Heim & Nemeroff 2001). Es entstehen lang anhaltende Veränderungen des Vasopressin- und Serotoninsystems im Gehirn, welche noch bei Erwachsenen beobachtet werden können und sich in einem aggressiven und aufbrausenden Verhalten äußern können (Neumann 2009). Auf der anderen Seite zeigt ein positives, liebevolles Bindungsverhalten der Mutter auch lebenslange Effekte, sodass sich die Kinder als Eltern später selbst sehr fürsorglich verhalten. Man geht davon aus, dass die Sensitivität der neuronalen Systeme erhöht wird, was epigenetischen Mechanismen zugeschrieben wird (Weaver et al. 2004). Wichtig zu verstehen ist, dass frühe Erfahrungen im Leben das Oxytocinsystem im Gehirn formen. Oxytocin wird vermehrt ausgeschüttet bei engem körperlichem Kontakt der Mutter mit dem Kind sowie bei sozialer Zuwendung in Form eines Lächelns oder ähnlichem (Neumann 2009). Kinder, die eine

sichere Bindung zu ihrer Mutter haben, zeigen eine höhere Oxytocinbindung an die Rezeptoren in entscheidenden Gehirnregionen wie dem zentralen Nucleus in der Amygdala sowie dem Nucleus striae terminales (Francis et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Frauen, die eine unzureichende Bindung, sowie Misshandlungen in den ersten Lebensjahren erfahren haben, eine geringere Oxytocinkonzentration im Liquor aufweisen (Heim et al. 2009). Neben den Einflüssen von Bindungserfahrungen auf den Oxytocinhaushalt, zeigt sich auch eine umgekehrte Beeinflussung. So konnten z.B. Buchheim et al. (2009) zeigen, dass die intranasale Gabe von Oxytocin positiven Einfluss auf die Bindungserfahrung bei erwachsenen Testpersonen mit unsicherem Bindungsverhalten hat. Im Vergleich zur Placebogruppe, wählten die Probanden, welche Oxytocin intranasal erhalten hatten, beim Adult Attachment Projective Picture System (AAP) (George & West 2012), einem Test zur Evaluation von Bindungsverhalten, vermehrt Phrasen aus die eine sichere Bindungserfahrung repräsentieren.

Allerdings ist nicht nur das Oxytocinsystem für die Bindung auf biochemischer Eben zuständig. Beim Stillen und der intensiven Mutter-Kind Interaktion wird zusätzlich das Dopamin-Belohnungssystem aktiviert, was durch bildgebende Kernspintomographie gezeigt werden konnte (Febo et al. 2005). So spielen das Dopamin-Belohnungssystem, das Glutamatsystem sowie das Neuropeptid OT nicht nur in der Mutter-Kind Interaktion eine wichtige Rolle, sondern bei allen Formen der sozialen Interaktion und sozialen Bindungen (Neumann 2009). Soziale Beziehungen und Unterstützung können bei Stress die Aktivierung der hypothalamischen-hypophysären-adrenalen Achse abpuffern und so als Prävention gegenüber psychischen und somatischen Erkrankungen dienen (DeVries et al. 2003, Kikusui et al. 2006). Dabei zeigte sich ein geringeres Level an Glucocorticoiden in Stress auslösenden Situationen, wenn die betreffenden Probanden von einem sehr guten Freund in dieser Situation begleitet wurden (Heinrichs et al. 2003).

## 2.4 Sozialer Ausschluss - Ostrazismus

Während der gesamten Evolution bedeutete der Zusammenhalt und das Zusammenleben in einer sozialen Gruppe einen Überlebensvorteil. Daraus entwickelte sich die Sehnsucht nach positiven sozialen Beziehungen sowie Akzeptanz der angehörenden sozialen Gruppe als ein fundamentales und universelles Bedürfnisse des Menschen (Maner et al. 2007, DeWall & Richman 2011), genauso wie die Bindung eines Säuglings an seine Bezugsperson (s. Kapitel 2.3).

Der Begriff Ostrazismus stammt aus dem griechischen und bedeutet *Scherbenge-*

*richt*. Im alten Griechenland wurden Bürger, die sich nicht an die Gesetze hielten, mittels eines Scherbengericht zur Verbannung auf Zeit (meist 10 Jahre) verurteilt und somit aus der sozialen Gemeinschaft ausgeschlossen. Dieser Begriff verdeutlicht, dass es sich nicht nur um sozialen Ausschluss handelt, sondern darüber hinaus auch eine Ächtung des betreffenden Mitglieds darstellt, was als besonders schmerzlich empfunden wird (Williams & Nida 2011, DeWall & Richman 2011) und auch zu physischen somatischen Schmerzen führen kann (Eisenberger et al. 2003). Psychologische Grundbedürfnisse nach Zugehörigkeit, das Selbstwertgefühl, die Kontrolle über die eigene Situation sowie die eigene Bedeutung werden fundamental bedroht und daraus resultierend verändern sich die physiologischen, affektiven und kognitiven Verhaltensweisen (Williams & Nida 2011, Williams 2007). Baumeister & Leary (1995) zeigten als eine der ersten Arbeitsgruppen, welche verheerenden psychologischen und physischen Konsequenzen sozialer Ausschluss und Zurückweisung auf den/die Betroffene haben können. So führt soziale Ausgrenzung zu mehr Traurigkeit mit resultierender Depression (Williams & Nida 2011) sowie gesteigerten Aggressionen und Wut sowohl gegen die Gruppe als auch gegenüber unbeteiligten Mitmenschen (Twenge et al. 2001). Gerade Menschen mit psychischen Erkrankungen erfahren häufig sozialen Ausschluss (Angermeyer et al. 2013). Um sozialen Ausschluss zu untersuchen wurden verschiedene Experimente und Tests entwickelt. In dieser Arbeitsgruppe wurde das *Cyberball-Paradigma* von Williams et al. (2000) verwendet, ein virtuelles Ballwurf-Spiel mit drei Mitspielern, welches für diese Untersuchungen weiter modifiziert wurde (Kapitel 4.3).

### 2.4.1 Cyberball-Paradigma

*Cyberball* (Williams et al. 2000, Williams & Jarvis 2006) ist ein virtuelles Ballspiel, das aus drei Mitspielern besteht. Es wurde von Kipling Williams und Blair Jarvis entwickelt, um sozialen Ausschluss zu imitieren. Die Idee entstand, als einer der Autoren beim Spazieren von einer Frisbee-Scheibe getroffen wurde. Er warf die Scheibe zurück und war überrascht, dass die beiden ursprünglichen Frisbeespieler sie wieder zu ihm zurück warfen und ihn so ins Spiel integrierten. Nach einigen Würfen begangen die andern Spieler ihn auszuschließen und nur noch sich gegenseitig die Frisbeescheibe zu werfen. Der Autor verließ daraufhin den Spielkreis. Dabei bemerkte er wie wütend, traurig und beschämt er sich fühlte. Daraus entstand die Idee ein Ballspiel unter Laborbedingungen zu entwickeln, um Ausgrenzung und sozialen Ausschluss genauer zu untersuchen.

Das auf dieser Geschichte basierende Ballspiel wurde zunächst analog gespielt, also im physischen Kontakt zwischen dem Spielleiter und den Teilnehmern. Die Teilnehmer wurden zufällig in zwei Gruppen eingeteilt und auf Basis der Einteilung

während des Spiels eingeschlossen oder ausgeschlossen. Es stellte sich als kraftvolles Instrument heraus, um die Auswirkungen von sozialem Ausschluss darzustellen. Die Schwächen der physischen Versuchsdurchführung liegen vor allem in der Gewährleistung standardisierter Laborbedingungen, da der Spielleiter selbst aktiv am Spiel teilnimmt (Williams & Jarvis 2006). Daher ist es für den Spielleiter sehr schwierig, sich nicht durch das Verhalten der Teilnehmer beeinflussen lassen. Wenn zum Beispiel ausgeschlossene Teilnehmer besonders freundlich und zuvorkommend reagieren, um wieder ins Spiel integriert zu werden, darf das den Spielleiter nicht beeindrucken.

Aus diesen Problemen heraus entwickelten Williams, Cheung & Choi (2000) das Computerspiel Cyberball. Der Versuchsteilnehmer glaubt dabei, dass er gegen zwei andere Versuchsteilnehmer spiele. In Wirklichkeit sind die beiden anderen Mitspieler virtuell und das Spiel ist so programmiert, dass die simulierten Mitspieler den Teilnehmer zu festgesetzten Zeitpunkten in das Spiel integrieren oder ihn ausschließen. Die Vorteile des computerbasierten Paradigmas sind die Standardisierung des Ablaufs, geringere Anforderungen an das Verhalten des Versuchsleiters und insgesamt die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den Testpersonen.

### 2.4.2 Need-Threat-Model

Wie bereits erwähnt bedeutet Ostrazismus, Zurückweisung und sozialen Ausschluss, einen Angriff auf das physische und psychische Wohlbefinden eines Menschen. Aufgrund seiner Forschungsergebnisse entwickelte Williams (2007, 2009) (Williams & Nida 2011) ein Model zur Erklärung, wie Menschen auf Ostrazismus reagieren und welche Konsequenzen und Coping-Mechanismen sie daraus ziehen bzw. entwickeln.

Im Need-Threat-Model werden drei Stufen unterschieden:

**Immediate oder Reflexive:** Als erste Reaktion auf Ausgrenzung wird Schmerz empfunden sowie eine Bedrohung der vier fundamentalen Bedürfnisse: Zugehörigkeit, Selbstwertgefühl, Kontrolle und Sinnhaftigkeit. Dabei sind Zugehörigkeit und Selbstwertgefühl direkt mit sozialer Interaktion und sozialen Kontakten assoziiert, während Kontrolle und Sinnhaftigkeit nicht zwingend an soziale Kontakte geknüpft sind. Darüber hinaus wird in dieser Phase auch Wut und Traurigkeit verstärkt. Hier spielen die Kontextfaktoren, warum oder wer ausgrenzt, keine entscheidende Rolle, da es sich um eine erste emotionale Reaktion handelt.

**Coping oder Reflective:** Auf dieser Stufe fängt das ausgeschlossene Individuum an, über die Ausgrenzung und damit einhergehend der Bedeutung auf seine fundamentalen Bedürfnisse zu reflektieren. Während dieser Stufe spielen die

Kontextfaktoren und die individuellen Unterschiede eine große Rolle in Bezug auf die Wiederherstellung der Integrität der Grundbedürfnisse und dem Wunsch die Situation zu meistern.

**Long-Term oder Resignation:** Dauert der soziale Ausschluss und die Ausgrenzung über längere Zeit an, erschöpfen sich die Coping-Strategien und Mechanismen und es stellt sich Hilflosigkeit, Distanzierung mit Entfremdung, Depression sowie ein Gefühl der eigenen Unwürdigkeit ein.

### 2.4.3 Social Reconnection Hypothese

Ostrazismus verursacht sowohl physische als auch psychische Schmerzen (Eisenberger 2013), deshalb versuchen Menschen aktiv diesen Schmerz durch affiliative Verhaltensweisen zu heilen, die die soziale Verbindung und damit ihre Inklusion in die Gruppe wiederherstellen (Chester et al. 2016). Sogar kleine Kinder zeigen prosoziales Verhalten gegenüber Gruppenmitgliedern, die sie ausschließen (Watson-Jones et al. 2016). Aufgrund der Erkenntnisse über die negativen Folgen sozialer Ausgrenzung entwickelten Maner et al. (2007) die Hypothese zur 'Social Reconnection', also die Motivation prosoziales Verhalten bei sich andeutendem sozialem Ausschluss zu zeigen. Die Autoren gehen davon aus, dass die Ausschluss-Erfahrung die betreffende Person daran erinnert, wie wichtig soziale Kontakte und Beziehungen sind. Daraufhin bemühen sie sich besonders diese zu anderen durch prosoziale Verhaltensweisen wieder herzustellen. Aktuell gibt es noch wenig eindeutige Evidenz für diese Hypothese. Allerdings zeigen verschiedene Studien Indizien, welche diese Hypothese unterstützen. Williams et al. (2000) beobachteten, dass sozial ausgeschlossene Testpersonen sich der Meinung anderer anschlossen und mit dieser übereinstimmten. Die Autoren interpretieren dieses Verhalten als Versuch Gemeinsamkeit herauszustellen, was in sozialen Beziehungen positiv gewertet wird und zu prosozialem Verhalten gezählt werden kann. Auch Vorstudien dieser Arbeitsgruppe (Jobst et al. 2014, 2015, 2016) fanden Hinweise für prosoziale Verhaltensweisen, indem bei psychisch gesunden Probanden der OT-Spiegel direkt im Anschluss an eine soziale Ausschlussituation im Verlauf des Cyberball-Paradigmas anstieg. OT wird in sozialen Interaktionen ausgeschüttet (s. Kapitel 2.1.3 und Kapitel 2.1.4) und kann somit auch als Anzeichen für prosoziales Verhalten gewertet werden. Die Social Reconnection Hypothese bezieht sich auf Stufe 2 des Need-Threat-Models von Williams (2007, 2009), Williams & Nida (2011). Die ausgeschlossene Person fängt an über den Ausschluss zu reflektieren und Wege zu finden sich wieder in die Gruppe zu integrieren durch Affiliation.



# Kapitel 3

## Analysemethoden zur Oxytocinbestimmung

Zum jetzigen Stand der Forschung gibt es noch keinen Konsens über einen Goldstandard für die Oxytocin-Analyse aus dem menschlichen Blutplasma. Oxytocin zeichnet sich jedoch als Faktor von zunehmender Bedeutung ab, um die Entstehung psychischer Erkrankungen zu verstehen und besser therapieren zu können. In gleichem Maße steigt auch der Bedarf für Methoden und Protokolle, die eine exakte Bestimmung des Oxytocingehalts aus dem Blut gewährleisten können. Aus diesem Grund gibt es seit einiger Zeit vermehrte Forschungsaktivität zur Identifizierung der validesten und reliablesten Methode zur Bestimmung von OT.

Kapitel 3.1 gibt einen Überblick über allgemeine Grundlagen der Immunoassays, daran anschließend erklärt Kapitel 3.2 wie die Etablierung einer neuen Messmethode funktioniert, bevor die beiden wichtigsten Formen des Assays, der Radioimmunoassay (RIA) und der Enzyme-linked-Immuno-assay (ELISA), in Kapitel 3.4 und Kapitel 3.5 vorgestellt werden. Neben der Wahl des Assays stellt sich bei der Festlegung eines Laborprotokolls zur Bestimmung von OT auch die Frage, ob das Plasma vor der Analyse extrahiert werden muss oder nicht. Kapitel 3.3 stellt daher die Prinzipien und Alternativen bei der Wahl eines Extraktionsverfahrens vor. Neuerdings gibt es auch Ansätze mit Hilfe der Massenspektrometrie den Oxytocingehalt zu bestimmen. Diese werden in Kapitel 3.6 vorgestellt, bevor Kapitel 3.7 mit einem Überblick über andere vergleichende Studien zu OT-Messmethoden schließt.

### 3.1 Grundlagen der Immunoassays

Der erste Immunoassay, später als Radioimmunoassay (RIA) bekannt geworden, wurde von Yalow & Berson (1959) entwickelt, um Insulin zu quantifizieren. Sie

benutzten dazu radioaktiv markiertes Insulin, welches Komplexe mit insulinbindenden Antikörpern bildet. Diese Komplexe konnten zum damaligen Stand der Technik chromatographisch und elektrophoretisch visualisiert werden. Dafür erhielt Yalow 1977 den Nobelpreis für Medizin. Engvall und Perlman nahmen das Prinzip der RIA als Grundlage, um diesen Immunoassay zu verbessern, sowie die Benutzung praktikabler und universeller zu gestalten. 1971 publizierten sie ihre Forschungen und benutzten eine Mikrotiterplatte mit einem gebundenen Enzym. Dieser Immunoassay funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie die RIA mit dem Unterschied, dass das Antigen mit einem Enzym markiert wird, anstatt es radioaktiv zu kennzeichnen. Daher wird diese Methode Enzyme-linked-Immunoassay (ELISA) genannt (Engvall & Perlmann 1971).

Beide Immunoassays beruhen auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, die auch als Schlüssel-Schloß-Prinzip bezeichnet wird (Luttmann et al. 2014). Das Paratop des Antikörpers bindet spezifisch an das Epitop des Antigens über Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräfte (Luttmann et al. 2014). Gerade im labortechnischen Setting spielt die Geschwindigkeit, mit der diese Reaktion abläuft, eine wichtige Rolle. Höhere Temperaturen beschleunigen dabei die Reaktion, während niedrigere Temperaturen sie verlangsamen (Luttmann et al. 2014).

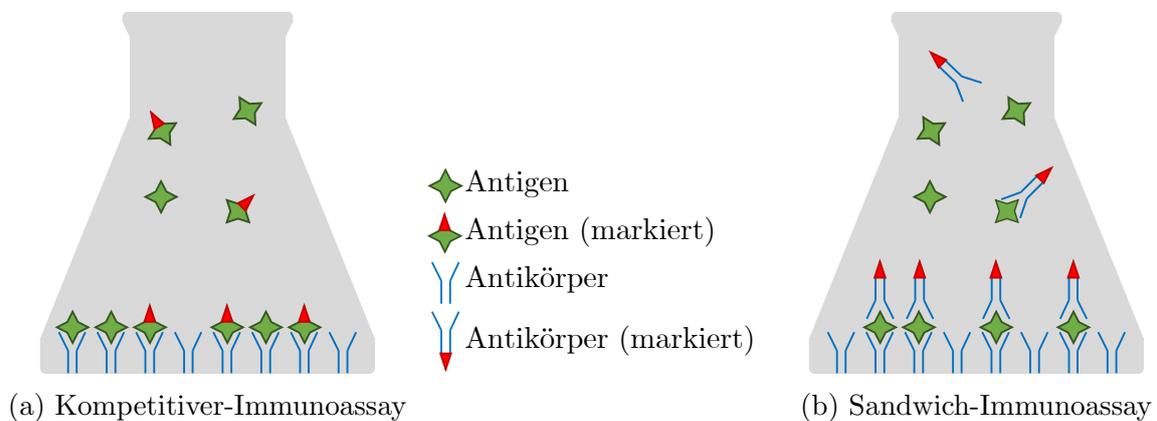


Abbildung 3.1: Illustration des Funktionsprinzips der gängigsten Durchführungsvarianten bei Immunoassays. Beim kompetitiven Assay konkurriert das zu bestimmende Antigen mit markiertem Antigen um eine limitierte Anzahl an Bindungsstellen. Beim Sandwich-Immunoassay wird das Antigen zwischen einem feststehenden, unmarkierten und einem freien, markierten Antikörper eingeschlossen. Bei beiden Assays erfolgt die Detektion über die Markierung. Grafik nach Luttmann et al. (2014).

Alle Immunoassays, um Antigene nachzuweisen, egal ob sie Radionuklide oder Enzyme als Marker benutzen, lassen sich in eine der drei folgenden Klassen einteilen (Grange et al. 2014, Luttmann et al. 2014, Leng & Sabatier 2016):

**Der direkte Assay:** Bei diesem Typ kann sowohl ein Antikörper als auch ein Antigen nachgewiesen werden. Je nachdem wie die Mikrotiterplatte beschichtet ist, kann entweder das zu analysierende Antigen oder der zu analysierende Antikörper aus der Probenlösung daran andocken. Es wird dann komplementär entweder der Antikörper oder das Antigen mit Markierung hinzu gegeben. Ein stärkeres Messsignal indiziert hier eine hohe Konzentration der zu messenden Substanz, ein schwaches Signal zeigt eine niedrigere Konzentration an. Im Vergleich mit den anderen Assayverfahren ist der direkte Assay jedoch weniger spezifisch und sensitiv (Grange et al. 2014).

**Der kompetitive Immunoassay:** Das Prinzip des kompetitiven Assays beruht auf einem Konkurrenzverhalten zweier verschiedener Antigenpopulationen. Es handelt sich dabei um eine definierte und markierte (z.B. Radionuklid oder Enzym) Population und die zu bestimmende Antigenpopulation (hier z.B. OT). Beide Antigenpopulationen konkurrieren um die freien Bindungsstellen am Antikörper. Zur validen Durchführung eines kompetitiven Assays wird ein definiertes Lösungsvolumen benötigt. Neben dem unmarkierten, zu bestimmenden, Antigen wird zusätzlich eine konstant zu haltende Konzentration des markierten Antigens sowie ein monoklonaler Antikörper in definierter Konzentration benötigt. Der Antikörper muss dabei möglichst spezifisch das zu untersuchende Antigen binden. Wenn viel unmarkiertes Antigen vorhanden ist, wird das markierte Antigen aus den Bindungsstellen des Antikörpers verdrängt. Dies erkennt man an einem schwachen Signal des Markers. Umgekehrt spricht ein starkes Markersignal für eine geringe Menge des zu untersuchenden Antigens. Um zu gewährleisten, dass dieses Prinzip funktioniert, werden die Bindungsstellen als limitierender Faktor eingesetzt. Das Verhältnis von Antikörper zu markiertem Antigen wird so gewählt, dass 50% des markierten Antigens ausreichen, um alle Bindungsstellen zu sättigen. Das Prinzip dieses Assaytyps ist in Abbildung 3.1a dargestellt. In Abbildung 3.2a wird ein typischer Messverlauf für den kompetitiven Assay dargestellt.

**Der Sandwich-Immunoassay:** Wie der Name suggeriert, wird das zu bestimmende Antigen zwischen zwei Antikörpern eingeschlossen. Dazu wird ein Fängerantikörper benutzt, der kovalent oder adsorbtiv an eine Mikrotiterplatte gebunden ist. Es ist essentiell für diesen Typ des Immunoassays, dass der Antikörper spezifisch das zu analysierende Antigen bindet. Im Gegensatz zum kompetitiven Immunoassay ist der Antikörper nicht limitiert, sondern in ausreichender Anzahl vorhanden. Um das Antigen qualitativ und quantitativ bestimmen zu

können, wird ein Detektionsantikörper eingesetzt. Dieser Antikörper ist durch ein Enzym oder Fluoreszenzfarbstoff markiert. Bevorzugt sollte der Antikörper monoklonal sein und darauf geachtet werden, dass Fänger- und Detektionsantikörper an unterschiedliche Epitope des Antigens andocken. Im Gegensatz zur Interpretation des kompetitiven Assays zeigt der Sandwichassay bei hohen Konzentrationen des Antigens ein verstärktes Markersignal, während bei geringen Konzentrationen sich das Signal schwach darstellt. Abbildung 3.1b zeigt das Prinzip dieses Assays, Abbildung 3.2b verdeutlicht den Signalverlauf bei der Messung.

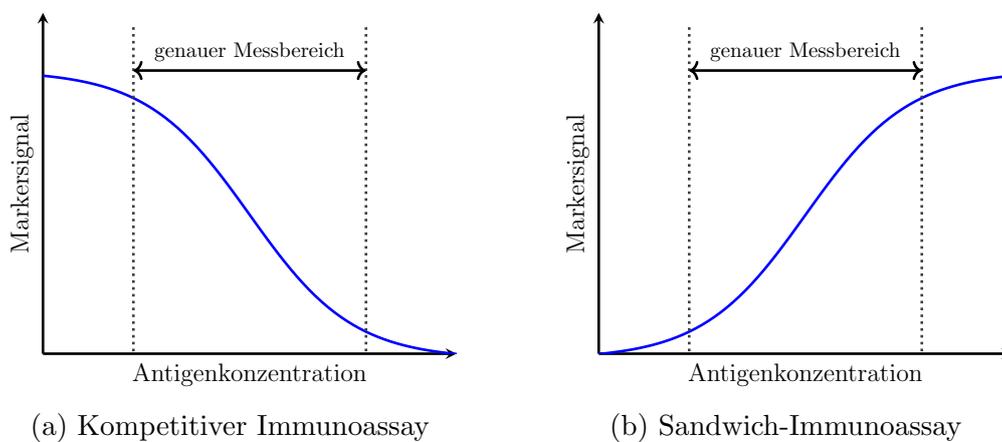


Abbildung 3.2: Typische Verläufe der Messwerte bei Immunoassays aus Luttmann et al. (2014).

Die Wahl des Assays wird durch viele Faktoren beeinflusst. Für die richtige Entscheidung spielen die Sensitivität, der Zeitaufwand, sowie die Größe, Verfügbarkeit und Markierungsmöglichkeiten des Antigens eine entscheidende Rolle (Luttmann et al. 2014). Für den kompetitiven Assay wird viel markiertes Antigen benötigt. Er bietet den Vorteil, dass er kleine Moleküle mit nur einer Bindungsstelle nachweisen kann. Der Sandwich-Assay ist für strukturell komplexere und größere Moleküle zu bevorzugen, da er eine höhere Sensitivität aufweist. Das Antigen braucht für dieses Verfahren mindestens zwei Epitope, die strukturell weit von einander entfernt liegen sollten. So soll sichergestellt werden, dass beide Antikörper andocken können und nicht um die selbe Bindungsstelle konkurrieren (Luttmann et al. 2014, Grange et al. 2014). Weist das Antigen jedoch mehr als zwei Epitope auf, kann allerdings ein kompetitiver Assay eine höhere Spezifität ausweisen. Bei einem komplexen Molekül wie OT, spricht daher vieles für einen kompetitiven Assay. Unabhängig vom Assaytyp sollte bei komplexen humanen Proben (z.B. Blutserum, Speichel, Urin) bedacht werden, dass es zu Kreuzreaktionen und somit zu verfälschten Ergebnissen kommen kann, wenn ein Enzymmarkierter Antikörper benutzt wird. Kreuzreaktionen können

zum Beispiel aufgrund von Proteasen und Enzyminhibitoren in der Probenlösung entstehen (Luttmann et al. 2014).

## 3.2 Validierung und Kalibrierung

Die Validierung der Messmethode sowie der Ergebnisse spielen eine große Rolle in der medizinischen und bioanalytischen Diagnostik. Dabei geht es um die Fragen, ob eine Messmethode spezifisch und sensitiv den zu bestimmenden Analyten misst und in welchem Referenzintervall die Messwerte angesiedelt sind. Die Etablierung der Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist essenziell beim Einsatz neuer Methoden oder der Übernahme von etablierten Messmethoden, sowie für die Vergleichbarkeit von Messwerten untereinander. Hierfür gelten nicht allgemein gültige Kriterien, sondern die Art der Validierung ist dabei mit dem Zweck und Anspruch des Verfahrens verknüpft (DIN 32645, DIN ISO 8402, DIN ISO 5725-1). In der Routinediagnostik überwacht die Bundesärztekammer die korrekte und valide Durchführung von labortechnischen Untersuchungen (Bundesärztekammer 2014). Dabei werden in regelmäßigen Abständen in einem Ringversuch Proben mit bekannter Messwertkonzentration an alle überwachten Labore versendet und deren Ergebnisse mit dem Referenzwert verglichen. Ringversuche sind meist auch der erste Schritt, um ein standardisiertes Messverfahren für einen Analyten zu etablieren (Wild & Sheehan 2013).

Sofern ein Laborgerät, oder ein Messverfahren nicht bereits vom Hersteller kalibriert wurde, obliegt es jedem Laboratorium selbst eine Kalibrierung vorzunehmen. Im Fall von ELISAs ist eine Kalibrierung vor jeder Assay-Reihe zwingend erforderlich. Unter Kalibrierung versteht man die Zuweisung eines Messwertes zu Proben unbekannter Konzentration unter Zuhilfenahme von Referenzproben definierter Konzentration, den sogenannten Kalibratoren oder Standards. Konzeptuell sind beide Begriffe eng verwandt, jedoch werden Standards während der Herstellung und Entwicklung eines Assay-Kits vom Hersteller genutzt, während die Kalibratoren in dem Labor verwendet werden, welches den Assay später nutzt. Kalibratoren werden vom Hersteller eines Assay-Kits auf Basis der herstellereigenen verwendeten Standards erstellt und den Laboren zur Verfügung gestellt. Die vom Hersteller verwendeten Standards basieren wiederum meist auf internationalen Standards (IS). Ein IS stellt eine internationale Referenz dar, die vom WHO Expert Committee on Biological Standardization (ECBS) authentifiziert wird. Im Fall von Oxytocin wird der IS mit dem Code 76/575 vom National Institute for Biological Standards and

Control (NIBSC) in Großbritannien hergestellt<sup>1</sup>. Die Menge an OT in einer Kapsel des Oxytocin-IS wird mit 12,5 internationalen Einheiten (IU) angegeben, was in etwa 21 µg entspricht. Auch wenn die Existenz eines internationalen Standards einen großen Schritt in Richtung Standardisierung entspricht, so zeigt sich bereits in der Wahl der Einheiten ein erster Unsicherheitsfaktor. Internationale Einheiten sind in gewisser Weise beliebig gewählte Einheiten, denen keine eindeutige Maßeinheit sondern nur eine ungefähre Entsprechung zugewiesen ist. Auch eindeutige Maßeinheiten haben nur begrenzte Aussagekraft, da Moleküle in unterschiedlicher Konjugation vorliegen können. Bisher sind allerdings nur die wenigsten IS über ihre molare Konzentration spezifiziert. (Wild & Sheehan 2013)

Der nachfolgende Abschnitt basiert auf Dunn & Wild (2013) und beschreibt die Erstellung einer Kalibrationskurve, da diese für die Versuchsdurchführung mittels des ELISA notwendig ist. Alle Aussagen lassen sich aber ebenso auf die vom Hersteller bestimmte Standardkurve übertragen. Eine Kalibrationskurve ist üblicherweise ein mathematisches Modell, das meist mittels Regression anhand der für die Kalibratoren bestimmten Messwerte möglichst genau die echte Signalkurve des Assays nachbilden soll (vgl. z.B. Abbildung 3.2b). Die Kalibratoren umfassen dabei mindestens sechs verschiedene Einzelwerte, die über den gesamten Messbereich des Assays verteilt sind. Die Kalibrationskurve interpoliert zwischen den für die Kalibratoren gemessenen Werten. Das für die Regression gewählte Kurvenmodell stellt einen Kompromiss zwischen der Genauigkeit der Abbildung der Signalkurve und der mathematischen Komplexität der Bestimmung der Regressionsparameter dar. Die meist verwendeten Kurvenmodelle sind die 4-Parameter logistische Regression (4PL) oder die 5-Parameter logistische Regression (5PL). 4PL Modelle sind gut für symmetrische Signalkurven geeignet, der fünfte Parameter der 5PL kann dagegen zum Ausgleich asymmetrischer Verläufe genutzt werden. Gleichung 3.1 zeigt die Formel für die 4PL, Gleichung 3.2 die Formel für die 5PL:

$$y = d + \frac{a - d}{1 + (x/c)^b} \quad (3.1) \qquad y = d + \frac{a - d}{[1 + (x/c)^b]^g} \quad (3.2)$$

Die Qualität der Parameterschätzung, im englischen *curve-fitting*, wird meist mit Hilfe mehrerer Parameter angegeben. Der oft verwendete  $r^2$ -Parameter gibt dabei an, wie genau die beobachteten Daten, im vorliegenden Fall die Kalibratoren, zur ermittelten Regressionskurve passen. Ein Wert von 1 repräsentiert dabei eine

<sup>1</sup><http://www.nibsc.org/documents/ifu/76-575.pdf>

vollständige Übereinstimmung.  $r^2$  ist jedoch alleine nur bedingt aussagekräftig für nichtlineare Kurvenmodelle, wie der 4PL oder 5PL (Dunn & Wild 2013). Als zusätzlicher Parameter wird daher meist noch die Summe der Fehler zum Quadrat (sum of square errors,  $SSE$ ) angegeben.

Abbildung 3.3 zeigt die Kalibrationskurve des ELISA aus den Versuchen dieser Arbeit. Die Kurve wurde als 4PL-Modell mittels der Parameterschätzung von MyAssays Ltd für den Enzo Life Science Oxytocin Assay<sup>2</sup> durchgeführt.  $r^2$  betrug dabei 0,9954, der  $SSE$ -Wert lag bei 30,99.

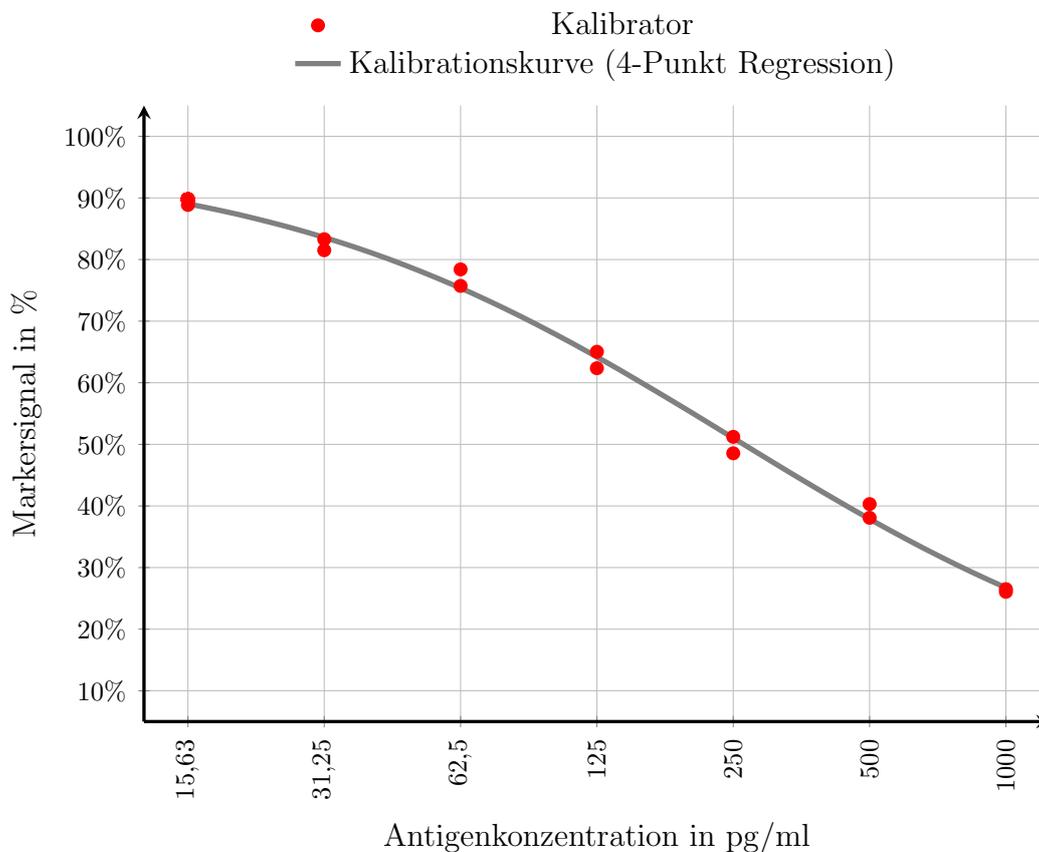


Abbildung 3.3: Kalibrationskurve des verwendeten ELISA. Die Kurvenparameter betragen  $a = 5,241$ ;  $b = -0,8514$ ;  $c = 249$ ;  $d = 96,98$

### 3.3 Extraktion

Die Extraktion des Analyts aus dem Plasma vor der Durchführung der Immunoassays ist ein Verfahren, um mögliche Störfaktoren zu entfernen und verfälschende

<sup>2</sup><https://www.myassays.com/enzo-life-sciences-oxytocin.assay>

Einflüsse gering zu halten. Es handelt sich dabei um eine Auftrennung und Substanzreinigungsmethode. Das Prinzip der Extraktion beruht auf der Verteilung von zwei Komponenten in unterschiedlich löslichen Phasen. Es gibt zwei verschiedene Möglichkeiten zu extrahieren (Hallbach 2006):

**Flüssig-Flüssig-Extraktion** Bei dieser Extraktionsmethode wird die Auftrennung der Extraktionsstoffe aufgrund ihrer unterschiedlichen Löslichkeit in zwei verschiedenen Flüssigkeiten ausgenutzt. Der Extraktionsstoff kann sowohl flüssig als auch als Feststoff vorliegen. Dabei werden die Flüssigkeiten in einem definierten Volumenverhältnis gut miteinander vermischt. Die zu extrahierende Substanz wechselt daraufhin in das Lösungsmittel, welches sich ihren eigenen Eigenschaften am ähnlichsten verhält. Voraussetzung bei dieser Methode ist, dass die Lösungsmittel eine Mischungslücke aufweisen. Durch Zentrifugation lässt sich die Trennung der beiden Lösungsmittel vorantreiben. Befindet sich das Extrakt in der Oberphase, lässt es sich abpipettieren. Liegt das Extrakt in der Unterphase, kann es vorsichtig angesaugt werden. (Hallbach 2006)

**Festphasenextraktion** Die Festphasenextraktion beruht auf dem Konzept der Konzentration, Anreicherung oder Isolation eines bestimmten Metaboliten. Die feste Phase, das Sorbens, befindet sich in kleinen Säulen. Der zu extrahierende Metabolit ist in einem Lösungsmittel gelöst und wird auf die Säule aufgetragen und eventuell mit geeignetem Lösungsmittel nachgewaschen. Dabei wird der Metabolit von der festen Phase adsorbiert. Nach der Reinigung des Metaboliten von Matrixbestandteilen wird der Metabolit in einem geeigneten Lösungsmittel durch die Säule eluiert. Am anderen Ende wird das Eluat aufgefangen. Zur Beschleunigung der Elution durch die Säule wird eine Vakuumsaugbox benutzt. Die Säulen werden in diese Box gestellt und es wird ein Unterdruck erzeugt. Diese Methode lässt sich in speziellen Fällen aufgrund von Immunadsorption durchführen. Dabei werden spezifische Antikörper an die Festphase der Säule gebunden. (Hallbach 2006)

### 3.4 Radioimmunoassay

Für die Durchführung eines RIA wird ein zum Metaboliten komplementärer Antikörper, sowie ein radiomarkiertes Antigen des Metaboliten benötigt. Vor der Analyse muss zudem der Metabolit aus dem Plasma extrahiert werden (s. Kapitel 3.3). Das radioaktiv markierte Antigen wird dabei als Tracer bezeichnet (Hallbach 2006).

Am besten zur Markierung geeignet sind Isotope, die  $\gamma$ -Strahlung aussenden (Luttmann et al. 2014). Das am häufigsten benutzte Isotop ist  $^{125}\text{I}$  (Iod), ein niedrig energetischer  $\gamma$ -Strahler mit einer Halbwertszeit von 60 Tagen. Er wird mit Hilfe einer Redox-Reaktion an Tyrosinreste des Antigens gekoppelt. Es sollte darauf geachtet werden, dass das Radionuklid nicht die Bindung des Antigens an den Antikörper vermindert oder erhöht oder zu einer Konformationsänderung des Antigens führt. Besonders bei empfindlichen Antigenen oder kleinen Haptomolekülen können die  $\beta$ -Strahler  $^3\text{H}$  (Wasserstoff) oder  $^{14}\text{C}$  (Kohlenstoff) verwendet werden. Dabei wird in dem Antigen lediglich ein H oder C-Atom gegen ein Radionuklid ausgetauscht (Luttmann et al. 2014). Nach Ablauf der Kopplungsreaktion zwischen den Antigen- und Antikörpermolekülen, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, erfolgt die Trennung der reagierten Komplexe von den ungebundenen Molekülen. Die drei häufigsten Methoden nach Luttmann et al. (2014), Hallbach (2006), Janeway & Travers (1995), Leng & Sabatier (2016) sind:

**Adsorption der freien Bestandteile** Bei der Adsorption werden die freien Bestandteile an eine bestimmte Oberfläche gebunden. Eine schnelle und kostengünstige Methode besteht aus der Zugabe von Dextran-umhüllter Aktivkohle. Die Probe wird inkubiert und anschließend zentrifugiert. Im Überstand befinden sich die gebundenen Komplexe, die abpipettiert werden können. Es gibt zahlreiche Substanzen, die sich für die Adsorption eignen. Für die Bindung von Peptidhormonen wie OT werden häufig Silikate benutzt, aber auch Ionenaustauschergels oder Talkumpuder finden dabei Anwendung.

**Präzipitation des Antigen-Antikörper-Komplexes** Die beliebteste Technik zur Präzipitation ist der doppelte Antikörper. Bei dieser Methode wird ein zweiter Antikörper benutzt, der an den Fc-Teil des ersten, antigenspezifischen Antikörpers andockt und so zwei Antigen-Antikörperkomplexe bindet. Es kommt dadurch zur Ausfällung, was durch die Zugabe von 5% - 8% Polyethylenglycol (PEG) begünstigt wird. Bei kleineren Molekülen werden zum Ausfällen Lösungsmittel wie Ammoniumsulfat, Ethanol, Methanol oder Aceton verwendet. In diesem Fall ist das Prinzip abgeändert. Die Ionen in diesen Substanzen ziehen die Wassermoleküle an, was die Hydrathülle um die Proteine schädigt. Die Proteine verlieren dadurch ihre Löslichkeit und fallen aus.

**Festphasentrennung** Dies ist die modernste Methode zur Trennung der Antigen-Antikörper-Komplexe von freien-ungebundenen Bestandteilen. Bei der Festphasentrennung werden die gebundenen Komplexe durch Adsorption an ein

festes Medium gebunden, anstatt wie bei der eingangs beschriebenen Trennungsmethode die freien Bestandteile zu binden. Als Oberfläche bieten sich dazu die Mikrotiterplatte oder die Reagenzröhrchen an, in denen die Mischung und Inkubation der vorherigen Schritte statt gefunden hat. Nach abgelaufener Reaktion kann bei der Festphasentrennung der Überstand leicht dekantiert oder aspiriert werden.

Der nächste Schritt nach der Trennung der reagierten Komplexe von den ungebunden Molekülen ist die Messung der Radioaktivität und somit der entstandenen Komplexe. Je nach verwendetem Funktionsprinzip, d.h. ob die Sandwich-Methode oder die kompetitive Methode angewendet wurde, unterscheidet sich die Interpretation der registrierten Signale. Zur Signalmessung wird ein Szintillationszähler benutzt. Das Gerät kann die frei werdende radioaktive Energie in Photonen umwandeln, welche durch einen Fotomultiplier verstärkt und detektiert werden. Die freiwerdende Energie, sowie die Photonen- und Lichtintensität verhalten sich proportional zueinander. Wurden  $\gamma$ -Strahler verwendet, wird meistens ein Natriumiodid-Kristall als Detektionsmedium angewendet. Bei der Verwendung eines  $\beta$ -Strahler als Radionuklid wird ein Flüssigkeitsszintillationszähler verwendet, da sich die  $\beta$ -Strahlung aufgrund der höheren Absorption an der Luft geringer ausbreitet. Im flüssigen Medium überträgt ein  $\beta$ -Teilchen seine Energie auf Lösungsmoleküle, die diese weiterleiten. (Luttmann et al. 2014, Hallbach 2006)

### 3.5 Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay

Der ELISA beruht auf den gleichen Funktionsprinzipien wie die in Kapitel 3.1 beschriebenen Immunoassays. Um den ELISA durchführen zu können wird eine Mikrotiterplatte gewählt, an die der Antikörper oder das Antigen durch Adsorption gebunden wird. Diesen Vorgang nennt man Coaten. Die Mikrotiterplatten werden häufig aus Polysterol hergestellt, da dieses Material die Adsorption der Proteine aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen am besten gewährleistet. Dies hat den Vorteil, dass diese Reaktion pH-Wert neutral abläuft. Dadurch kann ein Puffer gewählt werden, der am wenigsten in die Integrität der Antigene bzw. Antikörper eingreift. Wichtig zu beachten ist, dass die Dichte der gebundenen Antigene oder Antikörper nicht zu hoch ist, da sonst instabile Bi- bzw. Multilayer entstehen. Dieser Vorgang dauert einige Stunden und wird in der Regel über Nacht inkubiert. Es gibt noch andere Coating-Methoden wie z.B. die kovalente Kopplung. Diese sind jedoch sehr zeitaufwändig und aufwändig, so dass sie sehr selten benutzt werden. Während der Etablierung eines neuen ELISAs sollte viel Wert auf das Austitrieren der Antikörper

### **3.6 Andere Analysemethoden zur quantitativen Oxytocinbestimmung 33**

und Enzymkonjugate gelegt werden. Als problematisch während der Durchführung eines ELISA stellt sich die Hintergrundaktivität von unspezifisch adsorbierten enzymmarkierten Antikörper- oder Antigenmolekülen dar. Je nach ELISA-Testkit gibt es unterschiedliche Methoden zur Abblockung freier Bindungsstellen. Dieser Schritt stellt einen essenziellen Bestandteil zur Qualitätssicherung des ELISAs dar. (Luttmann et al. 2014, Janeway & Travers 1995, Bruhn et al. 2011)

Die Auswahl des geeigneten Enzyms spielt eine entscheidende Rolle für die Qualität der mittels ELISA durchgeführten Messungen. Das Enzym sollte bei 3 °C - 37 °C stabil sein, eine hohe Enzymaktivität aufweisen und sich einfach und reproduzierbar an die Antigene bzw. Antikörper koppeln lassen. Die gängigsten Enzyme sind Meerrettich-Peroxidase, Alkalische Phosphatase,  $\beta$ -Galaktosidase sowie Glukoseoxidase. Die Analyse der Enzymaktivität erfolgt durch colorimetrische, fluorimetrische oder luminometrische Methoden. Die Auswahl der geeigneten Methode beruht auf der technischen Ausstattung sowie den Gegebenheiten des Untersuchungsmaterials. So hat die colorimetrische Methode den Vorteil, dass die Endprodukte sehr stabil nach Ablauf der Reaktion sind und die Auswertung photometrisch über die Mikrotiterplatte abläuft. Fluorimetrische und luminometrische Methoden zeigen eine wesentlich höhere Sensitivität allerdings auf Kosten der Stabilität der Endprodukte. Zusätzlich benötigen sie weniger Probenmaterial.

## **3.6 Andere Analysemethoden zur quantitativen Oxytocinbestimmung**

Die überwiegende Mehrheit der Studien benutzt entweder RIA oder ELISA, da diese beiden Methoden schon für eine Vielzahl an Hormon- und Peptidbestimmungen validiert sind und wissenschaftlich belastbare Ergebnisse liefern. In jüngster Zeit haben einige Forschungsgruppen damit begonnen, auch andere Analysemethoden zur OT-Quantifizierung zu erproben.

Die Arbeitsgruppe um Ole Kristian Brandtzaeg von der Universität Oslo/Norwegen hat begonnen mit Hilfe der Nano-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (Nano-LC-MS) OT-Werte in Plasma und Serum zu bestimmen (Brandtzaeg et al. 2016). Das Paper beschreibt den Einsatz von RIA und ELISA in der Diagnostik kritisch und sieht in der Massenspektrometrie eine geeignete neue Alternative. Laut den Autoren findet sich OT im Blut überwiegend in an Plasmaproteine gebundener Form. Durch einen Reduktionsschritt mit anschließender Alkylierung wird diese Bindung aufgebrochen, was für die Autoren den Schritt der Extraktion ersetzt. Sie

sind davon überzeugt, dass dies dem eigentlichen OT-Gehalt im Blut entspricht und sehen daher Verfahren als kritisch an, bei denen nur der freie Anteil des OTs im Plasma gemessen wird. Daran anschließend beschreibt die Studie eine Massenspektrometrie im single ion monitoring mode (SIM). Bei diesem Verfahren werden die Bestandteile des Blutes anhand ihrer molekularen Masse getrennt. Da es noch keine validen Ergebnisse in Bezug auf dieses Verfahren bei der Messung von Blut und seinen Bestandteilen gibt, wollen die Autoren die Nano-LC-MS auf Basis der Proteomik durchführen und etablieren. Die im direkten Vergleich mit RIA und ELISA deutlich erhöhten Messwerte erklären die Autoren dadurch, dass bei ihrem Verfahren das gesamte, ggf. gebundene, OT aus dem Plasma gemessen wurde und nicht nur die freien OT-Bestandteile. Die Argumentation der Autoren scheint schlüssig zu sein, allerdings widerspricht die Höhe der in der Studie gemessenen Werte allen anderen Studien, die bereits zum OT-Gehalt im Plasma durchgeführt wurden (vgl. Kapitel 3.7). Dies ist eventuell durch den hier zum ersten Mal beschriebenen Reduktions-/Alkylierungsschritt erklärbar.

Mabrouk & Kennedy (2012) untersuchten ebenfalls, wie die LC-MS zur OT-Analyse eingesetzt werden kann. Das Probenmaterial für diese Studie wurde mit Hilfe der intracerebralen Mikrodialyse bei männlichen erwachsenen Ratten gewonnen. Den Vorteil der LC-MS gegenüber eines RIA zur OT-Bestimmung sehen die Autoren darin, dass sowohl OT als auch AVP gleichzeitig aus einer Probe gemessen werden können. Zudem sei die Methode sensitiver und könne OT bereits im Bereich von 0,01 fg bestimmen. Bei dieser Studie werden strukturell ähnliche Peptide chromatographisch getrennt und in einem mehrstufigen Massenspektrometer in ihre eindeutig ionisierten Teile fragmentiert. So können mehrere Peptide aus einer Probe analysiert und das Problem der Kreuzreaktion vermieden werden, da jedes Peptid ein einmaliges Streuungsmuster aufweist. Die Vorbereitung, wie z.B. die Extraktion der Proben, entfällt und der zeitliche Aufwand des Tests ist geringer, da lange Inkubationszeiten wegfallen. Die Autoren sehen ihr Verfahren als eine sensitive und reliable Methode zur OT- und AVP-Quantifizierung an. Leider wurde bei dieser Studie kein direkter Vergleich mit Messwerten des RIA oder ELISA durchgeführt, was die Aussagekraft einschränkt (McCullough et al. 2013).

Da ein Massenspektrometer nur in sehr spezialisierten Laboratorien vorhanden ist und die Anschaffung im Moment noch sehr teuer sowie aufwändig ist, wird der routinemäßige Einsatz zur OT-Messung nicht zeitnah möglich sein. Die Möglichkeit hierzu besteht eventuell in einigen Jahren, wenn durch den technologischen Fortschritt die Geräte günstiger und als Standardgeräte essentiell für die Routinediagnostik werden. Zudem müssten noch mehr Studien unter Einsatz der Mas-

senspektrometrie durchgeführt werden. Zhang et al. (2011) sehen im Moment noch Schwierigkeiten eine geeignete Pufferlösung auszuwählen, um die Standardkurve zu messen, was zu großen Problemen aufgrund von Beeinflussung durch andere Matrixbestandteile führt. Die Autoren der Studie sehen noch keine ausreichend hohe Sensitivität und Spezifität beim Einsatz der Massenspektrometrie.

### 3.7 Aktueller Stand der Forschung

Dieses Kapitel gibt einen Überblick über die momentane Lage zwischen ELISA und RIA vergleichenden Studien. Mit steigendem Interesse an OT begann auch das Interesse nach geeigneten Analysemethoden. Dabei gelten Immunoassays, insbesondere der ELISA und RIA, als die Verfahren der Wahl. Um vergleichbare Forschungsergebnisse zu erhalten und daraus allgemein gültige Schlüsse auf das Sozialverhalten, die Physiologie des menschlichen Gehirns und die Entstehung von psychischen Erkrankungen ziehen zu können, ist es wichtig eine verlässliche Analysemethode für die OT-Bestimmung aus dem Plasma zu finden und zu validieren (McCullough et al. 2013, Leng & Sabatier 2016). Aus ethischen und praktischen Gründen fokussiert sich die Forschung an menschlichen Probanden/-innen hier auf die Messung des OTs im Blutplasma und ggf. in Urin und Speichel. Deswegen konzentriert sich dieses Kapitel ebenfalls auf Studien basierend auf menschlichen Plasmaproben. Andere Studien, die ihr Probenmaterial aus Liquor oder Mikrodialyse gewonnen haben (Neumann et al. 2013, Carter et al. 2007), werden hier nicht aufgeführt. Aufgrund von vielen unterschiedlichen Methoden zur Quantifizierung von OT ist die Vergleichbarkeit zwischen einzelnen Studien häufig schwierig (Szeto et al. 2011). Bis heute ist die Studienlage uneindeutig, welches die aussagekräftigste Methode mit der größten Spezifität und Sensitivität ist.

Die meisten Studien kommen zu dem Schluss, dass unextrahierte und extrahierte Proben nicht miteinander vergleichbar sind. In nicht extrahierten Proben werden andere molekulare Bestandteile gemessen, die nicht zu OT gehören (McCullough et al. 2013, Szeto et al. 2011, Robinson et al. 2014, Leng & Sabatier 2016). Szeto et al. (2011) sehen die Extraktion als kritische Variable an, um akkurate Messwerte zu erhalten. Die OT-Werte in nicht extrahiertem Plasma zeigen 100mal höhere Werte als im extrahierten Plasma, jedoch besteht keine Korrelation zwischen den beiden Messwerten (McCullough et al. 2013, Szeto et al. 2011, Robinson et al. 2014, Christensen et al. 2014). Eine Erklärung dafür sehen die Autoren der verschiedenen Studien in einem Zerfall der OT-Moleküle in einzelne Epitope und Kompartimente, die fraglich biochemisch aktiv sind. Eine weitere mögliche Ursache sind andere

Moleküle mit unbekannter physiologischer Aktivität im menschlichen Körper, die aufgrund von ähnlichen Eigenschaften als OT erkannt werden (McCullough et al. 2013, Szeto et al. 2011, Robinson et al. 2014, Christensen et al. 2014).

Leng & Sabatier (2016) erhalten beim Vergleich von ELISA und RIA auf Basis extrahierter Proben Werte in einem ähnlichen Bereich. Allerdings ist der ELISA nicht ganz so sensitiv für niedrigere Werte. Sie sehen einen validen und realistischen Bereich für OT im Plasma zwischen 1 pg/ml und 50 pg/ml. Die Autoren dieser Studie kritisieren den ELISA von Enzo Life Science scharf, da es zu vielen Matrixeffekten kommt und die Firma vorschlägt die Proben zu verdünnen, um plausible und valide Werte zu erhalten. Die Verdünnung müsste jedes Labor jedoch selbst bestimmen, was zu unterschiedlichen Schwankungen der Messwerte und nicht vergleichbaren Ergebnissen zwischen den einzelnen Studien und Laboratorien führt. Im direkten Vergleich mit anderen Assays sind die Werte des Enzo Life Science ELISAs trotz Verdünnung in einem unrealistisch hohen Bereich von 1000 pg/ml (Leng & Sabatier 2016). Die Autoren der Studie sehen darin keine Plausibilität, da die OT-Produktionsrate sehr hoch sein müsste und die OT-Halbwertszeit im menschlichen Blut lediglich zwei Minuten beträgt.

Kramer et al. (2004) benutzten den ELISA mit verdünnten Proben und verdünnten die Proben parallel zur Standardkurve. Die Autoren erachten ihre Werte als biologisch valide, jedoch sind diese höher als Werte, die mittels RIA aus extrahierten Proben gemessen wurden. Die Autoren begründen ihre Annahme mit einer quantitativen Rückgewinnung von OT. Sie haben Plasma mit OT gespiket und Werte gemessen, die den zu erwartenden Werten entsprechen.

Abschließend kann gesagt werden, dass die meisten der beschriebenen Studien zu dem Schluss kommen, dass die Plasmaproben vor ihrer Analyse extrahiert werden müssen, um valide Ergebnisse zu erhalten. Allgemein gilt der Radio-Immunoassay als sensitiver und spezifischer, da es dabei zu weniger Kreuzreaktionen mit den markierten Enzymen kommt und niedrigere Werte im Bereich von 1 pg/ml bis 10 pg/ml gemessen werden können, auch wenn die Werte häufiger replizierbarer.

# Kapitel 4

## Versuchsaufbau

Die Versuchsdurchführung ist in drei Teile gegliedert. Als erstes wird ein Telefoninterview mit den Interessentinnen durchgeführt, um psychische Erkrankungen auszuschließen sowie offene Fragen der Interessentin zu klären. Daran schließen sich psychologische Fragebögen an, die den Probandinnen per Post zugeschickt wurden. Der letzte Teil besteht aus der Testung, die in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie an einem Vormittag nach Absprache mit der jeweiligen Probandin praktiziert wird. Die Rekrutierung und die Zusammensetzung der Gruppe der gesunden Testpersonen wird in Kapitel 4.1 dargestellt. Der Ablauf am Tag der Testung wird in Kapitel 4.2 beschrieben. Dabei kommt das in Kapitel 2.4.1 beschriebene Cyberball-Paradigma zum Einsatz, um eine soziale Ausschlussituation zu simulieren. Kapitel 4.3 beschreibt detailliert den Ablauf und die vorgenommenen Modifizierungen des Paradigmas. Kapitel 4.4 beschreibt die Durchführung der Assays zur Bestimmung von OT-Werten aus dem gewonnenen Plasma.

### 4.1 Testpersonen

Die Gruppe der gesunden weiblichen Probandinnen besteht aus 43 Personen im Alter zwischen 18 und 32 Jahren ( $M=24,32$ ;  $SD=3,22$ ). Diese Probandinnen sind auch als gesunde Kontrollgruppe in Reinhard et al. (2021) enthalten. Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit lagen nur Messwerte, mittels RIA analysiert, für 20 Probandinnen im Alter zwischen 19 und 30 Jahren ( $M=24,10$ ;  $SD=2,69$ ) vor. Alle getesteten Probandinnen haben die Schule mit dem Abitur abgeschlossen, die Gesamtdauer ihrer Bildung betrug zwischen 12,5 und 22 Jahren ( $M=17,17$ ;  $SD=2,59$ ).

## 4.2 Versuchsdurchführung

### 4.2.1 Rekrutierung und Probandenauswahl

Die Testpersonen wurden durch Aushänge (Kapitel B.1) in Münchener Universitäten (Ludwig-Maximilians-Universität, Technische Universität München, Frese-rius Hochschule) sowie über soziale Medien rekrutiert. Zu den Einschluss- und Ausschlusskriterien zählen Alter, Geschlecht, psychische sowie körperliche Gesundheit und keine regelmäßige Medikamenten- oder Drogeneinnahme. Ausgenommen hiervon sind hormonelle Kontrazeptiva. Da in einer anschließenden Studie Patientinnen mit Borderline-Diagnose untersucht werden sollen, wurden in dieser Studie nur weibliche Teilnehmerinnen untersucht, um deren Ergebnisse mit den Ergebnissen der Borderline-Patientinnen vergleichen zu können. Der Anteil der Patientinnen mit Borderline-Diagnose, die sich in der Psychiatrie einer Behandlung unterziehen, ist signifikant höher als der Anteil der männlichen Patienten (Skodol & Bender 2003). Das typische Behandlungsalter von Borderline-Patientinnen ist zwischen 18 bis 35 Jahren (Bohus & Kröger 2011). Entsprechend lag die Altersgrenze für die Studienteilnahme ebenfalls zwischen 18 und 35 Jahren.

Besonders die psychische Gesundheit der Teilnehmerinnen ist für diese Studie entscheidend (vgl. Kapitel 2.1.5). Vergangene psychotherapeutische Behandlungen der Probandinnen mussten daher vor mindestens zehn Jahren abgeschlossen worden sein. Somit ist insbesondere auch die Einnahme von Psychopharmaka und Benzodiazepinen ein Ausschlusskriterium für die Versuchsteilnahme.

Auf somatischer Ebene ist es wichtig, dass keine hormonellen Erkrankungen vorliegen. Neben allgemeinen Fragen zum physischen Befinden wurden die Interessentinnen explizit nach einer Hypothyreose gefragt. Denn gerade ein erhöhter TSH-Spiegel (Thyreoida-stimulierendes Hormone) wie er bei einer Hypothyreose vorkommt, wirkt als Inhibitor auf die Oxytocin-Biosynthese (Ciosek & Izdebska 2009). Im Falle einer therapierten Hypothyreose mit seit einem Jahr stabilen TSH-Werten im Normbereich durfte die Interessentin an der Studie teilnehmen. Um keine Wechselwirkungen zu provozieren, wurden Personen mit chronischen sowie akuten Infektionskrankheiten (vgl. Kapitel 2.1.3) ausgeschlossen. Zudem wird die Probandin während des *Cyberball-Paradigmas* in eine Stresssituation gebracht, welche sich negativ auf den Gesundheitszustand auswirken könnte.

Der Einfluss von Östrogen auf die Oxytocin-Freisetzung ist gut untersucht (McCarthy 1995, Landgraf & Neumann 2004). Die Einnahme von hormonellen Kontrazeptiva ist daher ein Einschlusskriterium für die Studie und erhöht sogar den in Frage kommenden Testungszeitraum während des Monatszyklus. Durch die hormo-

nellen Kontrazeptiva wird ein gleichbleibender Hormonspiegel im Körper hergestellt, sodass die Freisetzung von OT dadurch unbeeinflusst bleibt. Keine Einnahme von Kontrazeptiva stellt allerdings kein Ausschlusskriterium dar. Des Weiteren wird vorausgesetzt, dass die Probandin am Morgen vor der Testung weder Koffein zu sich nimmt noch raucht. Koffein und Nikotin stimulieren die Produktion und Freisetzung von Adrenalin, welches eine inhibitorische Wirkung auf die Ausschüttung von OT entfaltet (MacDonald et al. 2011). Eine inhibitorische Wirkung auf die Oxytocinfreisetzung lässt sich auch beim Konsum von Cannabinoiden beobachten. Deshalb darf die Probandin mindestens drei Monate vor der Testung kein Cannabis konsumieren (Tasker 2004).

### 4.2.2 Telefonscreening

Nach der Rekrutierung potentieller Probandinnen wurde zunächst ein Termin für ein telefonisches Interview vereinbart. Dieses Interview dient dazu den Probandinnen den genauen Ablauf des Versuchs zu erklären, die Ein- und Ausschlusskriterien zu besprechen sowie die Eignung der Probandin festzustellen. Dazu werden Screening Fragebögen benutzt, um eine Tendenz in Richtung momentaner psychischer Erkrankung festzustellen. Das Interview dauert ca. 90 Minuten. Um frei sprechen zu können und ehrliche Antworten von der Probandin zu erhalten, wird die Probandin gebeten in einer ungestörten Umgebung zu telefonieren. Alle Angaben der Probandinnen wurden stets gemäß der ärztlichen Schweigepflicht und geltenden Datenschutzrichtlinien behandelt.

Als erstes wurden die soziodemographischen Daten abgefragt (s. Kapitel 4.1). Danach schließt sich der Beck-Depressions-Inventar (BDI) an (Hautzinger et al. 2006). Es handelt sich dabei um einen Selbstbeurteilungsbogen zur Erfassung einer schweren depressiven Symptomatik. Das BDI erfasst die Stimmung der letzten zwei Wochen. Es werden dabei 21 Symptome abgefragt mit jeweils vier Aussagen zum Schweregrad des Symptoms. Laut S3-Leitlinie für unipolare Depressionen gilt ein Wert von 13 oder mehr als leichte Depression. Darunter gilt die Probandin entweder als gesund oder klinisch unauffällig bzw. remittiert. In dieser Studie werden Interessentinnen ab einem Wert von 13 Punkten ausgeschlossen.

Als nächster Fragebogen folgt der Screening Fragebogen der International Personality Disorder Examination (IPDE) nach Loranger (1999). Es handelt sich dabei um ein halbstrukturiertes klinisches Interview zur Erfassung von Persönlichkeitsstörungen im Sinne der DSM-IV und ICD-10. Es wird von der World Health Organization als offizielles Diagnoseinstrument empfohlen. Der erste Teil besteht aus einem Screening-Fragebogen mit 59 Fragen. Bei einem positiven Ansprechen auf das Raster

einer Störung sollte das weitergehende Interview für diese Störung folgen. Der Fragebogen unterscheidet dabei acht Typologien von Persönlichkeitsstörungen. Da in einem anschließenden Versuch die gesunden Probandinnen mit Patientinnen mit einer emotional-instabilen Persönlichkeitsstörung vom Borderline Typ verglichen werden sollen, ist es wichtig Personen mit Persönlichkeitsstörungen aus der gesunden Vergleichsgruppe auszuschließen wie in Kapitel 2.1.5 beschrieben wurde. Im Falle eines positiv ausgeschlagenen Items wurde ein Interview, für die durch das Item angezeigte Persönlichkeitsstörung geführt. Ziel des Telefoninterviews war es nicht eine klinische Diagnose einer Persönlichkeitsstörung zu stellen, was aufgrund eines Telefongesprächs nicht möglich ist. Es sollten lediglich Tendenzen in eine entsprechende Richtung festgestellt werden, wonach eine mögliche Störung nicht mehr auszuschließen ist und die psychische Gesundheit der Probandin nicht zweifelsfrei festgestellt werden kann. Demnach führten positiv ausgeschlagene Items zum Ausschluss der Interessentin aus der Studie.

Als dritten und letzten Fragebogen fragt die Studienleiterin das Strukturierte klinische Interview (SKID I) nach Wittchen et al. (1997) ab, um bei der Probandin Anzeichen möglicher psychischer Störungen der Achse-I nach DSM-IV festzustellen. Darunter versteht man Affektive Störungen, Psychotische Störungen, Störungen durch psychotrope Substanzen, Angststörungen, Somatoforme Störungen, Essstörungen und Anpassungsstörungen. Genauso wie beim IPDE wird zuerst ein Screening-Fragebogen mit zwölf Items abgefragt. Bei einer bejahenden Antwort wird ein Interview angeschlossen, wobei nur bejahte Teilgebiete interviewt werden. Der Ausschluss erfolgte, bei weiteren positiven Angaben zu dem betreffenden Item.

Am Ende des Telefoninterview wird ein Termin für die Testung vereinbart, sofern sich die Probandin als geeignet herausstellt und gerne an der weiteren Testung teilnehmen möchte. Die Probandin wird gebeten vor der Testung noch eine Reihe weiterer Fragebögen auszufüllen, die ihr postalisch zugesandt werden. Die zugesendeten Fragebögen sind in Kapitel A.1 aufgelistet. Hier wird nicht näher darauf eingegangen, da sie nicht der Probandenauswahl dienen und die Antworten der Probandinnen in dieser Arbeit nicht ausgewertet werden.

### 4.2.3 Tag der Testung

Da die Ausschüttung von OT durch Östrogen beeinflusst wird (Landgraf & Neumann 2004), gibt es nur wenige Tage während des Zykluses, an denen eine Testung sinnvoll ist. Der mögliche Testungszeitraum liegt zwischen dem fünften und zwölften Zyklustag, sofern keinerlei hormonelle Kontrazeption eingenommen wird. Bei Einnahme hormoneller Kontrazeption mit einer einwöchigen Pause können die Pro-

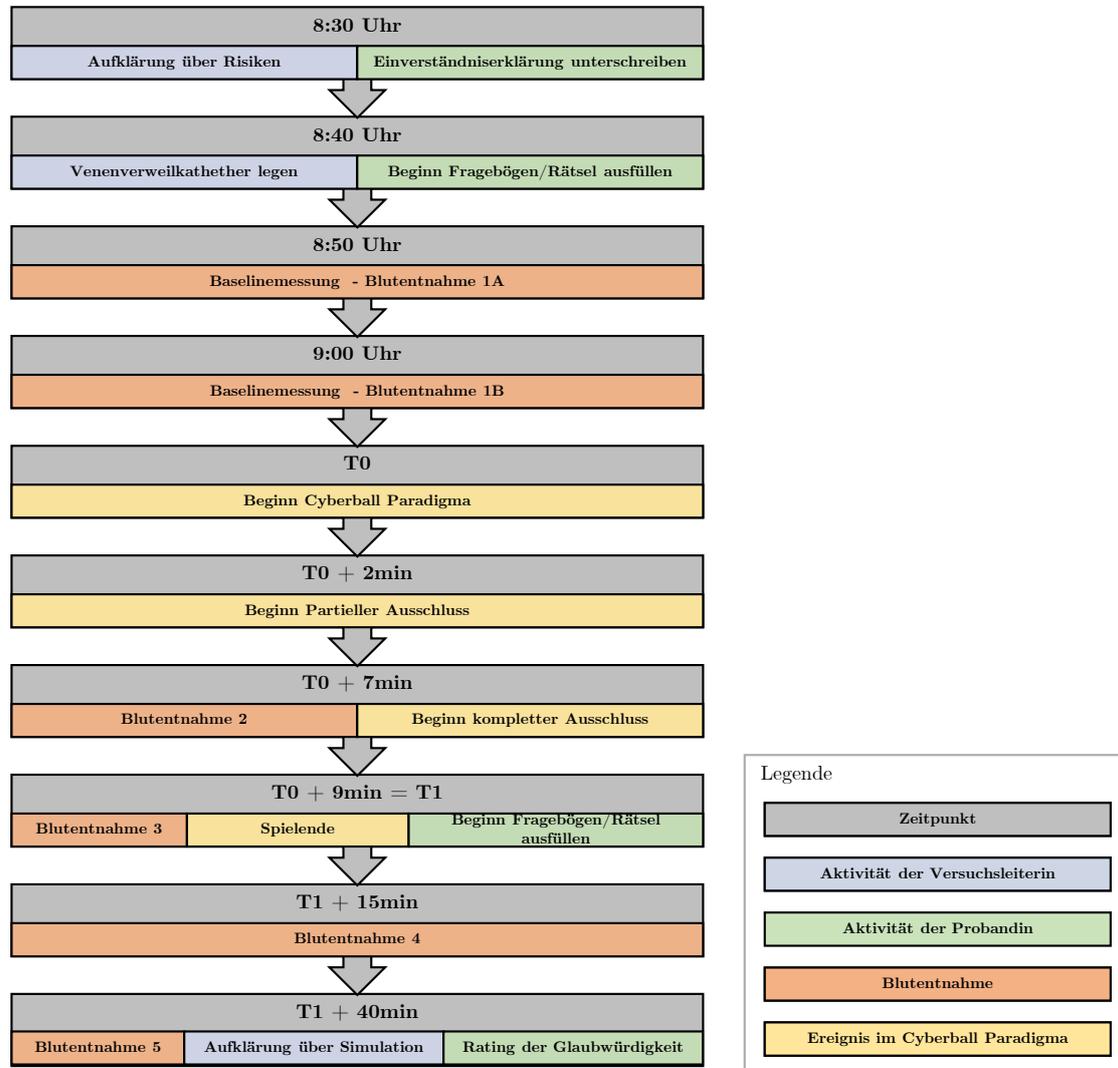


Abbildung 4.1: Schematische Übersicht über den Ablauf der Testung. Blaue Rechtecke zeigen dabei Aktivitäten der Versuchsleiterin an, während grüne Rechtecke Aktivitäten der Probandin signalisieren. Blutentnahmen finden zu Zeitpunkten mit roten Bereichen statt. Wichtige Zustände im Cyberball-Paradigma werden durch gelbe Markierungen hervorgehoben. Der Zeitpunkt  $T_0$  markiert den Beginn des Cyberball-Paradigmas, der Zeitpunkt  $T_1$  dessen Ende.

bandinnen zwischen dem dritten und achtzehnten Einnahmetag getestet werden. Bei hormoneller Kontrazeption ohne Pause ist jeder Tag möglich. Um eine optimale Blutabnahme zu gewährleisten und mögliche Kreuzreaktionen auszuschließen, wird die Probandin gebeten am Vorabend der Testung keinen Alkohol zu trinken und am Morgen vor der Testung kein Nikotin oder Koffein zu konsumieren. Es wird ihr geraten viel Flüssigkeit in Form von Wasser oder Tee zu sich zu nehmen, sowie ganz normal zu frühstücken.

Abbildung 4.1 gibt einen schematischen Überblick über die wichtigsten Elemente im Testungsverlauf. Ziel des Testungstages ist die Blutentnahme bei der Probandin zu sechs definierten Zeitpunkten, während sie durch das Cyberball-Paradigma in eine soziale Ausschlussituation gebracht wird. Dem vorgelagert und nachgelagert füllt die Probandin noch einige Fragebögen aus (s. Kapitel A.2) und wird von der Studienleiterin über etwaige Risiken aufgeklärt. Nach Spielende erfolgt die Aufklärung darüber, dass der soziale Ausschluss lediglich simuliert war.

Das Labor besteht aus zwei nebeneinander liegenden Räumen, die durch eine Verbindungstür miteinander verbunden sind. Im Testungsraum steht ein Schreibtisch mit einem Desktop-Computer an der Wand, die die beiden Räumen von einander trennt. Die Probandin sitzt am Schreibtisch mit Blick zur Wand. Der Raum ist karg eingerichtet, um eine reizarme Umgebung zu schaffen und die Probandin nicht durch äußere Reize abzulenken. Sie wird gebeten ihr Telefon auszuschalten sowie ihre persönlichen Sachen auf einem Stuhl außerhalb ihrer Reichweite für die Dauer des Versuchs zu platzieren. Neben dem Bildschirm linksseitig in der Wand befindet sich ein kleines Loch mit ca. 5 cm Durchmesser, das in das andere Labor führt. Vor dem Loch auf der anderen Seite ist eine Arbeitsplatte montiert, vor der die Versuchsleiterin sitzt. Auf dem Schreibtisch liegt die Computertastatur und rechts daneben die Maus. Dieser Versuchsaufbau ist in Abbildung 4.2 fotografisch dokumentiert. Neben der Maus steht eine Klingel, die von der Probandin geläutet wird, sobald sie sich in das Spiel einwählt (Zeitpunkt  $T_0$  in Abbildung 4.1) und nachdem sie das Spiel beendet (Zeitpunkt  $T_1$  in Abbildung 4.1).

Die Testung findet immer vormittags zur gleichen Uhrzeit statt, da OT der zirkadianen Freisetzung mit Höhepunkt am Vormittag unterliegt (Landgraf et al. 1982). Durch einen identischen Startzeitpunkt für die Testungen soll die Vergleichbarkeit der Oxytocinwerte gewährleistet werden. Die Studienleiterin trifft gegen 8:00 Uhr im Labor ein, um den Versuch vorzubereiten, bevor die Probandin um 8:30 Uhr erscheint. Sobald die Probandin eingetroffen ist, erhält sie als erstes eine Einverständniserklärung zur Unterzeichnung, sowie ein Formular zur Erfassung ihrer Konto- und Kontaktdaten. Da während der Testung eine Blutabnahme durchgeführt wird,

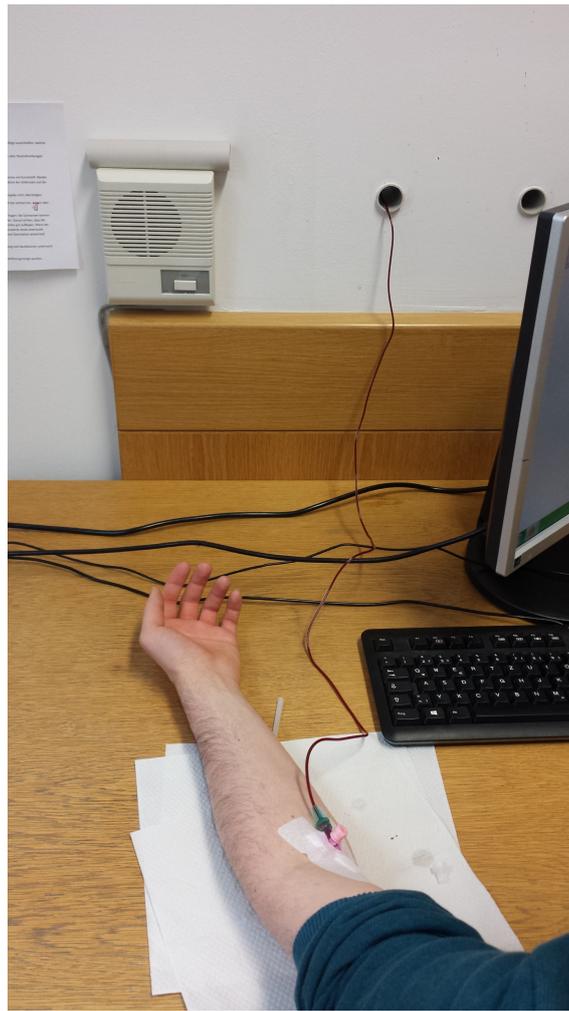


Abbildung 4.2: Versuchsaufbau aus der Perspektive der Probandin. Links hinter dem Bildschirm ist der Durchlass zum Nebenraum, in dem sich die Versuchsleiterin befindet.

was eine invasive Maßnahme darstellt, erhält die Probandin für ihre Teilnahme eine Aufwandsentschädigung von 60 €. Nachdem die Formulare ausgefüllt sind, werden noch offene Fragen der Probandin geklärt. Gegen 8:40 Uhr legt die Versuchsleiterin der Probandin einen rosa Venenverweilkatheter, bevorzugt in die linke Vena cubiti. Der Venenverweilkatheter wird an einen durchsichtigen Plastikschlauch angeschlossen und zuvor mit 10 ml NaCl gespült, um sicher zu gehen, dass die Vene richtig getroffen wurde. Der Schlauch ist ebenfalls mit 0,9% NaCl-Lösung gefüllt. Der Plastikschlauch wird durch das Loch in der Wand in das andere Labor geschoben und auf der anderen Seite über einen Drei-Wege-Hahn mit einer 50 ml Spritze, die in einen Perfusor eingespannt ist, angeschlossen. Das Schlauchsystem wird mit Hilfe eines Perfusors mit 20 ml/h durchgespült, um Koagulationen zu vermeiden. Dieser Teil des Versuchsaufbaus ist in Abbildung 4.3 dargestellt.



Abbildung 4.3: Versuchsaufbau aus der Perspektive der Versuchsleiterin. Abgebildet ist das Schlauchsystem mit dem Perfusor und dem Drei-Wege-Hahn.

Nach Legen des Venenverweilkatheters wird die betreffende Probandin alleine im Testungsraum zurück gelassen. Die Studienleiterin setzt sich vor die Arbeitsplatte mit der oben beschriebenen Apparatur. Vor Spielbeginn wird die Emotion Scale sowie das Assessment of Aversive Inner Tension abgefragt, um die momentane Gefühlslage der Probandin zu ermitteln dazu vgl. Kapitel A.2. Anschließend werden der Probandin Kreuzworträtsel angeboten, um die verbleibende Zeit zum Spielbeginn zu überbrücken. Während die Probandin die Fragebögen und Kreuzworträtsel ausfüllt, erfolgen zwei Blutabnahmen, um eine Baseline der Oxytocinwerte zu bestimmen. Da Oxytocinwerte großen interindividuellen Schwankungen unterliegen, wird ein Ausgangswert benötigt um die Veränderungen der Oxytocinwerte im Verlauf der Testung genauer einordnen zu können. Die Zeitpunkte 10 min und 20 min wurden gewählt, um einen ausreichenden zeitlichen Abstand zum Legen des Katheters zu gewährleisten. Für manche Menschen bedeuten Nadeln einen erhöhten psychischen Stress. Daher wurde auf einen ausreichend langen Zeitraum zwischen dem Legen der Nadel und dem Beginn des Ausschlussparadigmas geachtet, um die Validität der Untersuchungsergebnisse nicht aufgrund des kurzen Schmerzes und der damit verbundenen psychischen Stressantwort zu gefährden.

Nach der zweiten Blutabnahme beginnt die Probandin mit dem Computerspiel *Cyberball* (s. Kapitel 4.3), ein Ballspiel, das einen sozialen Ausschluss simuliert. Die Probandin wird gebeten zu klingeln, sobald sie die Einleitungstexte des *Cyberball-Paradigmas* gelesen hat und mit dem eigentlichen Spiel beginnt. Die dritte Blutabnahme erfolgt 7 min nach Spielbeginn zu einem Zeitpunkt, nachdem die Probandin über mehrere Minuten einem partiellen sozialen Ausschluss ausgesetzt war. Zeit-

gleich beginnt das Spiel mit der Simulation eines vollständigen sozialen Ausschlusses durch die beiden Mitspielerinnen. Nach Abschluss des Spiels klingelt die Probandin erneut als Signal für die nächste Blutabnahme. Die nächsten 40 min füllt die Probandin die restlichen Fragebögen aus und löst weitere Kreuzworträtsel, um die Zeit bis zur letzten Blutabnahme zu überbrücken. Bei den Fragebögen nach Spielende handelt es sich um die gleichen beiden Fragebögen wie vor dem Spiel, um einen Prä-Post-Vergleich erstellen zu können. Zusätzlich werden das Needs-Treat-Questionnaire und das Questionnaire on Behavioural Intentions von der Patientin ausgefüllt. Die Fragebögen werden in Kapitel A.2 näher erläutert. Nach Ende der Versuchsdurchführung erhält die Probandin eine Aufklärung und Fragen zur Glaubwürdigkeit des Experiments sowie ein Gesprächsangebot, um noch offene Fragen zu klären und eventuell entstandenen Redebedarf zu adressieren.

#### 4.2.4 Blutentnahmen

Während der Testung werden zu folgenden Zeitpunkten Blut abgenommen:

**Messung 1a:** 10 min nach Legen des Venenverweilkatheters

**Messung 1b:** 20 min nach Legen des Venenverweilkatheters

**Messung 2:** 7 min nach Spielbeginn, Probandin war 5 min einem partiellen sozialen Ausschluss ausgesetzt

**Messung 3:** Spielende, Probandin war 2 min einem vollständigen sozialen Ausschluss ausgesetzt

**Messung 4:** 15 min nach Spielende

**Messung 5:** 40 min nach Spielende

Die Entnahmezeitpunkte 1b, 3, 4, und 5 entsprechen denen der anderen Studien der Arbeitsgruppe (Jobst et al. 2014, 2016, Reinhard et al. 2021). Die Blutabnahmezeitpunkte 1a sowie 2 wurden bei diesem Versuch erstmalig eingeführt. Die neuen Entnahmezeitpunkte sollen klären, ob signifikante Unterschiede zwischen den Messungen nach dem partiellen Ausschluss (Messung 2) und dem kompletten Ausschluss (Messung 3) bestehen. Pro Blutabnahme werden 10 ml entnommen. Dazu wird der Perfusor pausiert und das Blut über den Drei-Wege-Hahn abgenommen. Die ersten 3 ml werden verworfen, da sie durch das NaCl im Schlauch verdünnt sind. Nach der Abnahme werden der Drei-Wege-Hahn sowie der Schlauch mit 10 ml NaCl gespült,

um die verbleibenden Blutreste zu entfernen. Die restlichen 7 ml des entnommenen Blutes wurden auf zwei EDTA-Monovetten aufgeteilt. Die Monovetten wurden vor der Versuchsdurchführung beschriftet und vorbereitet. Während des gesamten Versuchs werden sie im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Sobald das Blut über die Spritzen abgenommen wurde und die EDTA-Monovetten befüllt sind, werden sie wieder zurück in den Kühlschrank gestellt.

Den zur Messung mittels des ELISA bestimmten Monovetten wurde Aprotinin zur Stabilisierung des Oxytocins zugesetzt. Dabei ist es wichtig die Monovette gut zu schwenken und das Blut mit dem Aprotinin vollständig zu vermischen. Aprotinin, früher auch unter dem Namen Trasylol bekannt, ist ein kompetitiver Serin-Protease-Inhibitor, der stabile Komplexe mit den Enzymen formt und das aktive Zentrum blockiert. Die Bindung ist reversibel und verhindert den Abbau des Hormons OT. Es werden 125 µl pro 2,7 ml Monovette pipettiert. Das Vorgehen entspricht den Angaben der Firma Sigma-Aldrich und erfolgt in Anlehnung an die Oxytocin-Messungen von Emeny et al. (2015). Die andere Monovette enthält keinen Zusatz und wird für die RIA verwendet (Neumann et al. 2013). Nach der letzten Probenentnahme werden alle Monovetten 10 min bei 1300 g und 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss wird das Plasma abpipettiert und in Aliquots bei -80 °C bis zur weiteren Analyse durch den ELISA oder den RIA gelagert.

### 4.3 Modifiziertes Cyberball-Paradigma

Der Nachteil des in Kapitel 2.4.1 beschriebenen virtuellen Paradigmas von Williams et al. liegt in der eingeschränkten ökologischen Validität sowie in übergangslosen Wechsel zwischen Situationen des kompletten Einschlusses oder kompletten Ausschlusses. Dadurch lässt sich das Verhalten der Testpersonen, sobald diese komplett ausgeschlossen werden, nicht mehr messen und untersuchen. In Zusammenarbeit mit Torsten Wüstenberg von der Charite in Berlin wurde das Cyberball-Paradigma weiterentwickelt, um die in Kapitel 2.4.1 erwähnten Probleme zu minimieren.

In dem weiter entwickelten Paradigma gibt es drei neue Aspekte. Zum einen wurde die grafische Aufbereitung geändert, um dadurch die Glaubwürdigkeit zu erhöhen. Die Testperson hat den Eindruck als würde sich das Spiel in einem Browserfenster öffnen und das Spiel über das Internet gespielt werden. Dabei spielen die Testpersonen wie auch bei der ursprünglichen Version gegen den Computer. Als zweite grafische Neuerung wurden Fotos eingefügt, die für jeden Mitspieler stehen. Die Fotos für die zwei virtuellen Mitspieler sind von Mitarbeiterinnen der Forschungsgruppe, das dritte Foto stammt von der Testperson selbst. Da in diesem Versuch nur weibliche



Abbildung 4.4: Cyberball: Startbildschirm mit den Instruktionen zum Spiel

Testpersonen getestet wurden, stammen auch die Fotos nur von weiblichen Mitarbeiterinnen, um nicht durch das unterschiedliche Geschlecht einen weiteren Störfaktor einzuführen. Die größte Neuerung im Vergleich zum Paradigma von Williams et al. (2000) besteht im Konzept des partiellen Ausschlusses. Dabei wird die Testperson zuerst nur von einer virtuellen Mitspielerin immer weniger angespielt, bis sie zum Schluss ganz von ihr ausgeschlossen wird. Hier interessiert besonders das Spielverhalten, ausgedrückt durch die Ballwürfe der Testpersonen zu den Mitspielerinnen in dieser Zeit. In einem anderen Teilprojekt der Studie wird dieses Spielverhalten genauer untersucht und analysiert. Basierend auf der Social Reconnection Hypothese ist die Erwartungshaltung, dass die Probandinnen zunächst versuchen werden die exkludierende Mitspielerin wieder anzuspielen und neurobiologisch dieser prosoziale Annäherungsversuch von einer OT-Ausschüttung begleitet wird.

Die Durchführung des Paradigmas findet, wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben, an einem Desktop-Computer in einem reizarmen Testungsraum in der Psychiatrie statt. Vor Eintreffen der Testperson wird das Computerspiel vorbereitet, so dass der Startbildschirm (s. Abbildung 4.4) zu sehen ist, um die Glaubwürdigkeit des Internet-Settings zu gewährleisten. Dabei wird den Testpersonen der Eindruck vermittelt, dass sich die anderen beteiligten Mitspieler ebenfalls in der Einwahlphase befinden. Bevor das Ballspiel anfängt, lesen die Probandinnen zunächst die angezeigte Seite mit Instruktionen über den Spielablauf. Neben den einfachen Regeln des Spiels erhalten die Probandinnen zusätzlich eine Erklärung zur Spielsituation. Ihnen wird dabei

vermittelt, dass sie gegen zwei andere Mitspielerinnen an anderen Universitäten in Deutschland spielen werden. Auf der nächsten Seite erscheinen die beiden Bilder der anderen Mitspielerinnen. Die Probandin wird gebeten die Mitspielerinnen unter den Gesichtspunkten “sympathisch, vertrauenswürdig, attraktiv, dominant und aggressiv” auf einer Intervall-Skala von “gar nicht” bis “sehr” zu bewerten. Abbildung 4.5 zeigt diesen Bildschirm.

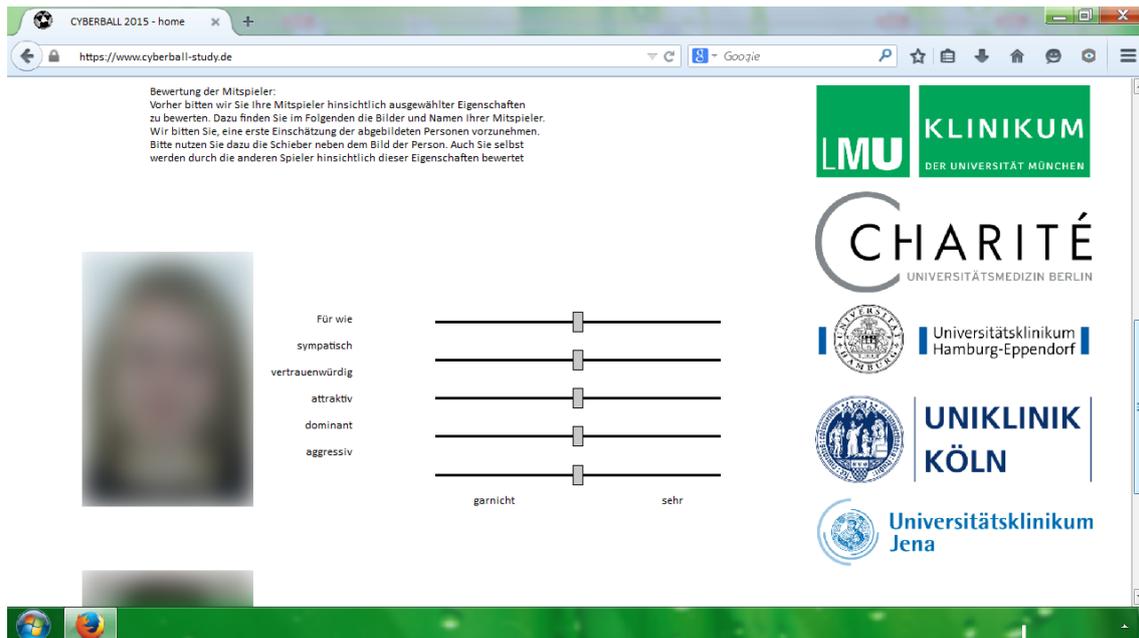


Abbildung 4.5: Cyberball: Bewertung der Mitspielerinnen vor Spielstart

Nach der Bewertung der Mitspielerinnen wählt sich die Probandin ins Spiel ein. Es erscheint eine Animation, um den Aufbau der Verbindung zu simulieren (s. Abbildung 4.6). Zu diesem Zeitpunkt klingelt die Probandin das erste Mal, um der Studienleiterin zu signalisieren, dass sie den Einführungsteil abgeschlossen hat. Das Spiel dauert insgesamt 9 min und besteht aus drei verschiedenen Teilen. In den ersten 2 min erhält jede der drei Mitspielerinnen zu je einem Drittel den Ball. In den anschließenden 5 min wird die Probandin schrittweise von einer der virtuellen Spielerinnen ausgeschlossen. Diese Situation bildet den partiellen Ausschluss. Nach diesen 7 min findet die Blutabnahme 2 statt (vgl. Abbildung 4.1). Während der letzten 2 min wird die Probandin kein einziges Mal mehr angespielt, dies bildet den kompletten Ausschluss. Eine typische Spielsituation ist in Abbildung 4.7 dargestellt. Nach Beendigung des Ballspiels schließt sich eine erneute Bewertung der Mitspielerinnen an (Abbildung 4.5), um durch den Spielverlauf verursachte Unterschiede in der Bewertung zu erfassen. Sobald die Probandin die Bearbeitung des Paradigmas abgeschlossen hat, klingelt sie erneut. Hiermit endet der Hauptteil des Versuchs.

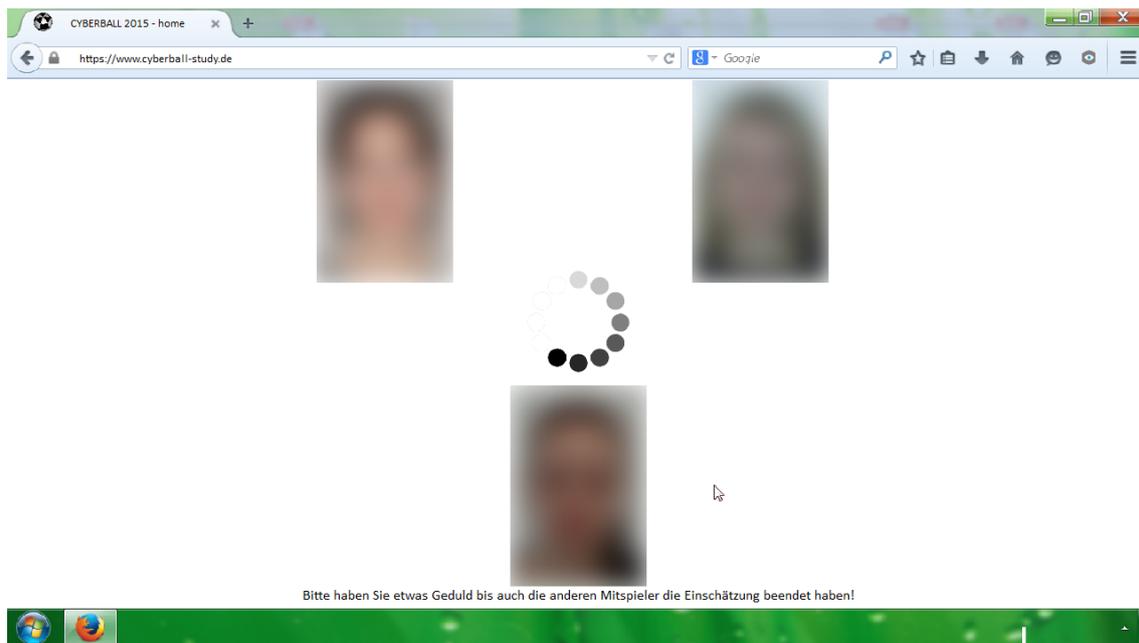


Abbildung 4.6: Cyberball: Einwahl in das Spiel, auf die untere Spielposition wird das Bild der Probandin kopiert

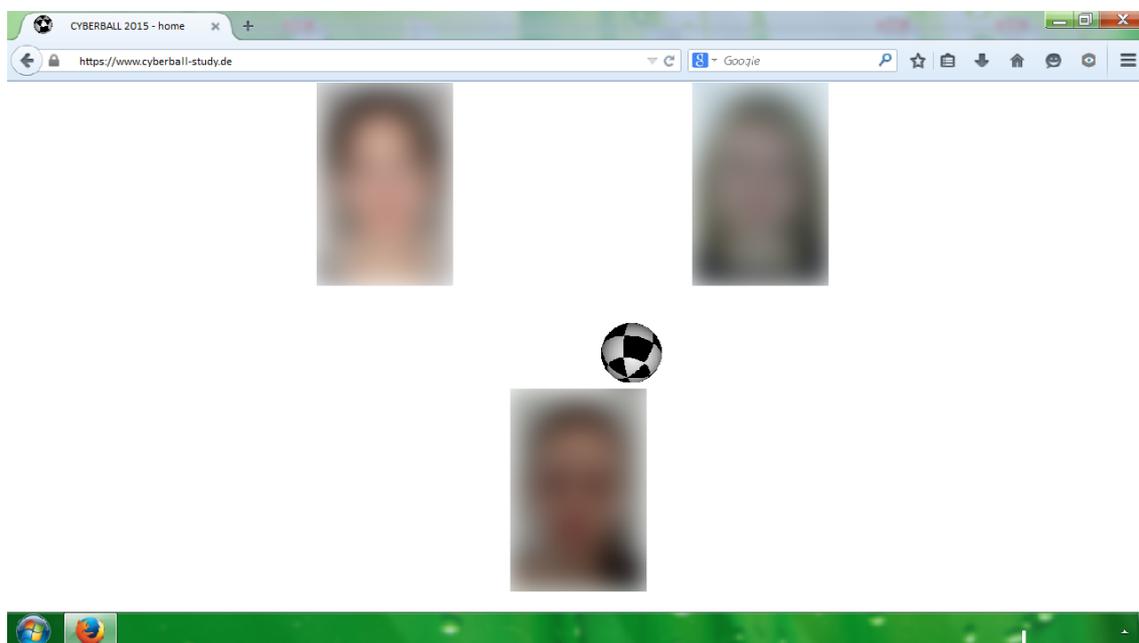


Abbildung 4.7: Cyberball: Typische Spielszene. Das Spiel wird mit der Maus gespielt, durch links oder rechts Klick der Maus kann entweder die linke oder rechte Mitspielerin angespielt werden. Die Anspielzahlen werden dabei erfasst und in anderen Teilstudien des Projektes zur Ergebnismessung verwendet.

## 4.4 Methoden zur Oxytocinbestimmung

Die Analyse der Blutproben erfolgte anhand eines ELISA-Kits (Enzo Life Science, Deutschland) als kompetitiver Immunoassay (vgl. Kapitel 3.1) im Labor der Psychiatrischen Klinik der LMU München. Der Assay wurde anhand der colorimetrischen Methode visuell dargestellt. Die Proben wurden vor der Analyse durch den ELISA nicht extrahiert. Dies stellt ein häufiges Anwendungsszenario des ELISA dar, sodass die Ergebnisse des Methodenvergleichs für eine Reihe anderer Studien repräsentativ sind. Alle Proben wurden als dreifach Ansatz angelegt, um eine interne Präzisionskontrolle zu erzielen. Die Mikrotiterplatte wird von der Firma Enzo Life Science schon fertig mit spezifisch gegen Kaninchen-IgG gerichteten Ziegen-Antikörpern ge-coated geliefert. Nachdem alle erforderlichen Reagenzien in die Mikrotiterplatte pipettiert wurden, wird die Mikrotiterplatte über Nacht zwischen 18 h bis 24 h bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Das genaue Pipettierschema findet sich in der Arbeitsanleitung "Oxytocin ELISA Kit" Catalog #: ADI-900-153A. Die Inkubation dient der Anlagerung und Bindung der OT-Antigene an den Antikörper. Anschließend an die Inkubation wurden die ungebundenen Bestandteile durch dreimaliges Waschen mit Hilfe des Waschpuffers entfernt. Es folgte die Zugabe des Substrates, um die Antigen-Antikörper-Komplexe visuell darstellen zu können. Die Enzymreaktion wurde nach 60 min Inkubationszeit durch die Zugabe der Stopplösung beendet. Anschließend kann der ELISA sofort ausgelesen werden.

In ihrer Produktbeschreibung stellt die Firma Enzo Life Science klar, dass dieses ELISA-Kit ausschließlich für Forschungszwecke verwendet werden darf und nicht zum Einsatz in der Routine-Diagnostik geeignet ist. Dadurch unterliegt dieses Produkt niedrigeren Qualitätsstandards. Die Firma weist weiter darauf hin, dass es durch hohe Spiegel an störenden Substanzen zu Kreuzreaktionen oder Variationen in den Ergebnissen kommen kann. Des Weiteren empfiehlt Enzo Life Science die Extraktion der Proben vor Durchführung des ELISA.

Der Radio-Immunoassay wurde von RIAGNosis München unter der Leitung von Prof. Dr. Rainer Landgraf durchgeführt. Vor der Analyse erfolgte eine Extraktion des OTs aus dem Plasma bei 4 °C, um störende Proteine und Fragmente zu entfernen (vgl. Kapitel 3.3). Es wurden 20 mg, bei 700 °C Hitze-aktiviertes, LiChroprep Si 60 (Merck, Darmstadt) in 1 ml destilliertem Wasser aufgelöst und zu jeder Probe hinzugefügt. Die Probe wurde für 30 min gemischt und anschließend zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Probe zweimal mit destilliertem Wasser und 0,01 mol/l Essigsäure gewaschen. Danach wurde die Probe für 30 min mit 60% Aceton gemischt und eluiert. Das lyophilisierte Extrakt kann bis zur Analyse bei Raumtemperatur

gelagert werden. (Neumann et al. 2013, Modi et al. 2014, Kagerbauer et al. 2013) Nach der Extraktion wurden die lyophilisierten Proben mit 0,05 ml Assay-Puffer gemischt. Der RIA von RIAGnosis ist standardisiert und wurde in zahlreichen Versuchen in menschlichen und tierischen Studien validiert, um eine verlässliche Aussage über die Bioverfügbarkeit von OT treffen zu können. Es wurde sowohl die zentrale Freisetzung durch Mikrodialyse des Liquor als auch die periphere Freisetzung im Plasma untersucht (Landgraf & Neumann 2004). Der verwendete Antikörper gegen OT wurde in Kaninchen gezüchtet. 0,05 ml des Antikörpers wurden den Aliquots zugegeben und nach 60 min Präinkubation wurden 0,01 ml des  $^{125}\text{I}$ -Tracers (Perkin Elmer, Boston, USA) zugesetzt. Im Anschluss wurden die Aliquots 3 Tage bei 4 °C inkubiert. Die Trennung der ungebundenen Bestandteile erfolgte mit Hilfe von Aktivkohle (Sigma Aldrich). Die Sensitivität der beschriebenen RIA liegt im Bereich von 0,1 pg/ml bis 0,5 pg/ml. Die Kreuzreaktivität mit verwandten Peptidhormonen liegt unter 0,7%, die Inter- und Intra- Assay Variabilität liegt unter 10%. (Neumann et al. 2013, Modi et al. 2014, Kagerbauer et al. 2013)



# Kapitel 5

## Ergebnisse

Dieses Kapitel widmet sich der Klärung der Frage, ob die Messwerte von RIA und ELISA sich gleichwertig verhalten. Dabei wurden die folgenden Fragestellungen untersucht: Kapitel 5.1 vergleicht die absoluten Werte direkt miteinander. Aufgrund hoher interpersonellen Schwankungen und unterschiedlichen Größenordnungen der ELISA und RIA-Messwerte, ist jedoch eine Normalisierung der Messwerte erforderlich, wie sie in Kapitel 5.2 durchgeführt wurde. Kapitel 5.3 vergleicht die Verläufe der Durchschnittskurven für ELISA und RIA. Kapitel 5.4 zeigt den Vergleich der qualitativen Entwicklung der Messwerte miteinander, d.h. ob die Messverläufe zum gleichen Zeitpunkt steigen oder fallen. Zuletzt beantwortet Kapitel 5.5 die Frage, ob wissenschaftliche Studien mit Auswertungen, die alleine auf RIA- bzw. ELISA-Messwerten beruhen, zum gleichen Ergebnis führen. Kapitel 5.6 geht auf den Einfluss der Lagerungszeit auf die Ergebnisse ein. Die Auswertungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit Hilfe von SPSS-Statistics in Version 22 durchgeführt. Bei allen statistischen Testungen gilt ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$ .

Messzeitpunkt	ELISA						RIA					
	1a	1b	2	3	4	5	1a	1b	2	3	4	5
Anzahl Werte	6	20	20	20	20	20	7	20	20	19	20	20
Mittelwert	1 301	928	962	913	1 053	1 084	2,79	3,01	4,16	4,15	3,39	3,50
Median	1 251	880	876	851	1 013	945	2,50	2,70	3,65	2,91	3,18	2,93
Standardabweichung	388	511	674	561	697	644	0,75	1,64	2,97	2,70	1,95	2,00
Minimum	971	218	116	177	231	100	1,62	0,90	1,53	1,67	1,23	0,43
Maximum	2 046	2 011	2 655	2 683	3 233	2 745	3,83	7,11	9,41	10,73	9,89	8,01

Tabelle 5.1: Deskriptive Statistiken der RIA und ELISA Messwerte

Die hier vorgestellten Auswertungen basieren auf einer Gruppe von 20 gesunden weiblichen Probandinnen im Alter zwischen 19 und 30 Jahren ( $M=24,10$ ;  $SD=2,67$ ). Alle getesteten Probandinnen haben die Schule mit dem Abitur abgeschlossen, die Gesamtdauer ihrer Bildung betrug zwischen 12,5 und 22 Jahren ( $M=17,17$ ;  $SD=2,59$ ).

Zu sechs Messzeitpunkten wurde Blut gemäß dem in Kapitel 4.2.4 beschriebenen Versuchsprotokoll abgenommen. Die deskriptiven Statistiken befinden sich in Tabelle 5.1. Der Messzeitpunkt 1a wurde erst im späteren Verlauf der Versuchsreihe etabliert, deswegen stehen nur sechs bzw. sieben Messwerte zur Verfügung. Aus diesem Grund wird Messzeitpunkt 1b als Baseline-Wert betrachtet. Wegen einer zu geringen Blutabnahme konnte in einem Einzelfall bei RIA Messzeitpunkt 3 kein Wert gemessen werden. Eine Normalverteilung der Werte gilt für verschiedene statistische Verfahren als Voraussetzung, daher wurden die Messwerte auf diese Eigenschaft untersucht. Tabelle 5.2 zeigt die Ergebnisse der Kolmogorow-Smirnow und Shapiro-Wilk Tests auf Normalverteilung. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Werte in Abnahme 2 - 4 nicht normal verteilt sind. Ausnahme hiervon bilden die Baseline-Messwerte (Abnahme 1b), die sowohl bei der Messung durch ELISA als auch bei der Messung durch RIA normal verteilt sind. Bei den RIA-Messwerten zeigt sich in Abnahme 5 wieder eine Normalverteilung, bei den ELISA-Messwerten nicht. Zwischen Shapiro-Wilk und Kolmogorow-Smirnow herrscht Übereinstimmung in den Ergebnissen, außer bei den mit ELISA analysierten Messwerten in Abnahme 4. Generell gilt jedoch der Shapiro-Wilk Test, als die zu bevorzugende Methode (Yap & Sim 2011), da er eine höhere Teststärke bei geringeren Stichproben aufweist. Deshalb ist auch bei Abnahme 4 davon auszugehen, dass keine Normalverteilung vorliegt.

	ELISA						RIA					
	Kolmogorow-Smirnow			Shapiro-Wilk			Kolmogorow-Smirnow			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Sig.	Statistik	df	Sig.	Statistik	df	Sig.	Statistik	df	Sig.
Abnahme 1a	0,359	6	0,015*	0,785	6	0,043*	0,219	7	0,200	0,940	7	0,638
Abnahme 1b	0,184	20	0,074	0,922	20	0,110	0,130	20	0,200	0,923	20	0,111
Abnahme 2	0,222	20	0,011*	0,900	20	0,041*	0,194	20	0,047*	0,865	20	0,010*
Abnahme 3	0,211	20	0,020*	0,868	20	0,011*	0,205	19	0,035*	0,769	19	<0,001*
Abnahme 4	0,172	20	0,123	0,859	20	0,007*	0,210	20	0,021*	0,769	20	0,001*
Abnahme 5	0,235	20	0,005*	0,904	20	0,048*	0,158	20	0,200	0,923	20	0,115

Tabelle 5.2: Tests auf Normalverteilung. In der Tabelle sind alle Werte markiert, die auf einem Signifikanzniveau von 95% nicht normalverteilt sind. Die Nullhypothese, dass die Werte normalverteilt sind, wird in den markierten Fälle abgelehnt.

## 5.1 Vergleich der Absolutwerte

### 5.1.1 *t*-Test

Beim Vergleich zweier Messmethoden liegt es nahe, zunächst die absoluten Werte miteinander zu vergleichen. Der *t*-Test für gepaarte Stichproben gilt dabei als häufig gewählter Test. Beim *t*-Test werden die Mittelwerte von Stichproben aus

zwei Gesamtpopulationen verglichen. Für den Methodenvergleich ist ein nicht signifikantes Ergebnis des Tests zwar ein positives Indiz, da die Null-Hypothese, dass keine Unterschiede zwischen den Populationen existieren, aufrechterhalten wird. Das gewünschte Ergebnis der Nicht-Signifikanz besitzt jedoch keine ausreichende Aussagekraft, um die Übereinstimmung zweier Messmethoden zu beurteilen (Koch & Spörl 2007), da lediglich die Mittelwerte anstatt der einzeln erlangten Messwerte verglichen werden. Ein signifikantes Ergebnis des  $t$ -Tests zeigt dagegen an, dass eine Methode systematisch höhere oder niedrigere Messwerte, als die andere liefert.

Der  $t$ -Test für gepaarte Stichproben in Tabelle 5.4 zeigt über alle Messzeitpunkte hinweg hoch signifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ) zwischen den Messmethoden. Dieses Ergebnis ist wenig überraschend, da die deskriptive Statistik zum  $t$ -Test in Tabelle 5.3 Unterschiede von zwei bis drei Größenordnungen (Faktor 500) in den miteinander verglichenen Mittelwerten aufweist.

	Methoden	Mittelwert	H	Standardabweichung	Standardfehler
Abnahme 1a	ELISA	1 301	6	388	159
	RIA	2,70	6	0,78	0,32
Abnahme 1b	ELISA	928	20	511	114
	RIA	3,01	20	1,64	0,37
Abnahme 2	ELISA	962	20	674	151
	RIA	4,16	20	2,30	0,51
Abnahme 3	ELISA	895	19	570	131
	RIA	4,15	19	2,70	0,62
Abnahme 4	ELISA	1 053	20	697	156
	RIA	3,39	20	1,95	0,44
Abnahme 5	ELISA	1 084	20	644	144
	RIA	3,50	20	2,00	0,45

Tabelle 5.3: Deskriptive Statistiken für den  $t$ -Test zwischen RIA und ELISA

	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	T	df	Sig. (2-seitig)	d
Abnahme 1a	1 298	388	158	8,200	5	<0,001*	3,667
Abnahme 1b	925	511	114	8,097	19	<0,001*	1,858
Abnahme 2	958	675	151	6,351	19	<0,001*	1,457
Abnahme 3	890	570	131	6,804	18	<0,001*	1,604
Abnahme 4	1 050	697	156	6,738	19	<0,001*	1,546
Abnahme 5	1 080	644	144	7,501	19	<0,001*	1,721

Tabelle 5.4:  $t$ -Test zwischen RIA und ELISA Messpaaren. Markiert sind statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Nullhypothese, dass keine Unterschiede zwischen den Gruppen existieren, wird auf Signifikanzniveau  $p < 0,001$  abgelehnt. Überall zeigt sich ein großer Effekt nach Cohen (d)

### 5.1.2 Korrelation

Ein weiteres verbreitetes Analyseverfahren für Methodenvergleiche ist die Bestimmung des Korrelationskoeffizienten zwischen den ermittelten Messwerten. Der Korrelationskoeffizient  $r$  gibt dabei die Stärke des linearen Zusammenhangs zwischen zwei Faktoren an. Zur Visualisierung wird daher oft ein Streudiagramm verwendet, in dem sich, bei einer hohen Korrelation nach Pearson, die Punktwolke auch optisch an einer Geraden orientiert. Für die vorliegenden Messwerte ist das Streudiagramm in Abbildung 5.1 gegeben.

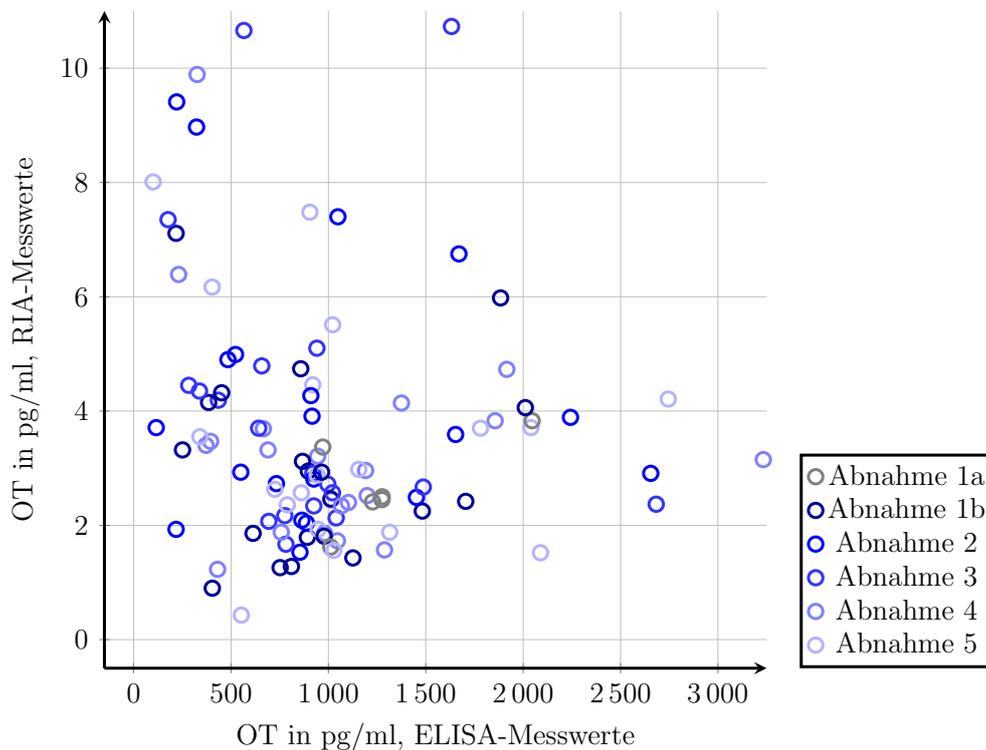


Abbildung 5.1: Streudiagramm für RIA/ELISA Messpaare. Die einzelnen Abnahmezeitpunkte sind darin farblich unterschieden.

Die Proben wurden innerhalb der Studie durch wiederholte Blutabnahme innerhalb des Versuchsaufbaus gewonnen. Daher handelt es sich um eine Studie mit Messwiederholung. In diesem Fall dürfen die durch mehrfache Messung gewonnenen Werte nicht zusammen analysiert werden, so als gäbe es keine Messwiederholung (Bland 2015, Bakdash & Marusich 2017, Watson & Petrie 2010). Dies liegt daran, dass die Varianz zwischen den Messwerten der Probanden oftmals viel höher ist, als die Varianz innerhalb der Proben des selben Individuums (Bland 2015). Tabelle 5.5 zeigt daher die Korrelation zwischen den Messwerten der jeweiligen Abnahmezeitpunkte. Ähnlich zum optischen Eindruck aus Abbildung 5.1, liegt keine signifikante Korrelation vor.

	Korrelationskoeffizient	Sig. (2-seitig)	N
Abnahme 1a	0,634	0,177	6
Abnahme 1b	0,013	0,956	20
Abnahme 2	-0,193	0,416	20
Abnahme 3	-0,135	0,580	19
Abnahme 4	-0,188	0,427	20
Abnahme 5	-0,213	0,368	20

Tabelle 5.5: Korrelationskoeffizient  $r$  nach Pearson zwischen den RIA und ELISA Messwerten. Bei keinem Abnahmezeitpunkt besteht eine signifikante Korrelation ( $p < 0,05$ ) zwischen den ermittelten Werten.

Bland & Altman (1995) beschreiben wie in Studien mit Messwiederholung, dennoch ein aussagefähiger Korrelationswert bestimmt werden kann, der die der Regression zugrundeliegende Annahme der Unabhängigkeit der Beobachtungen wahr. Der von Bland & Altman hierzu vorgeschlagene und von Bakdash & Marusich (2017) als Softwarepaket für die Programmiersprache R zur Verfügung gestellte Messwiederholungskorrelationskoeffizient  $r_{rm}$  basiert auf der Bestimmung einer Regressionsgeraden für die Messwerte jedes Probanden der Studie. Die Geraden werden jedoch so bestimmt, dass sie parallel zueinander verlaufen. Die Steigung der Geraden bildet somit den gemeinsamen Faktor zwischen den Individuen ab. Ein weiterer Vorteil des  $r_{rm}$  besteht in der hohen statistischen Aussagekraft, die bereits bei geringen Probandenzahlen gegeben ist (Bakdash & Marusich 2017). Abbildung 5.2 zeigt den von Bakdash & Marusich (2017) vorgeschlagenen Plot zur Visualisierung der Messwiederholungskorrelation. Bei hohen Werten für  $r_{rm}$  liegen die Datenpunkte der Probanden nahe bei den bestimmten Regressionsgeraden. Optisch würden sich im Falle einer hohen Korrelation auch kaum Individuen finden, bei denen eine Gerade mit abweichender Steigung ein besseres Modell des Zusammenhangs zwischen den Datenpunkten bildet. Bei den untersuchten Messwerten zeigt sich ein leicht negativer ( $r_{rm} = -0,142$ ), jedoch statistisch nicht signifikanter ( $p = 0,189$ ) Zusammenhang zwischen den ELISA und RIA Messwerten.

### 5.1.3 Nichtlineare Zusammenhänge

Beim Vergleich zweier Messmethoden ist das erhoffte Ergebnis, welches als Indiz für die Gleichwertigkeit der Methoden interpretiert werden kann, ein linearer Zusammenhang zwischen den mittels beiden Methoden gewonnenen Werten. Lineare Zusammenhänge wurden in Kapitel 5.1.1 und Kapitel 5.1.2 untersucht.

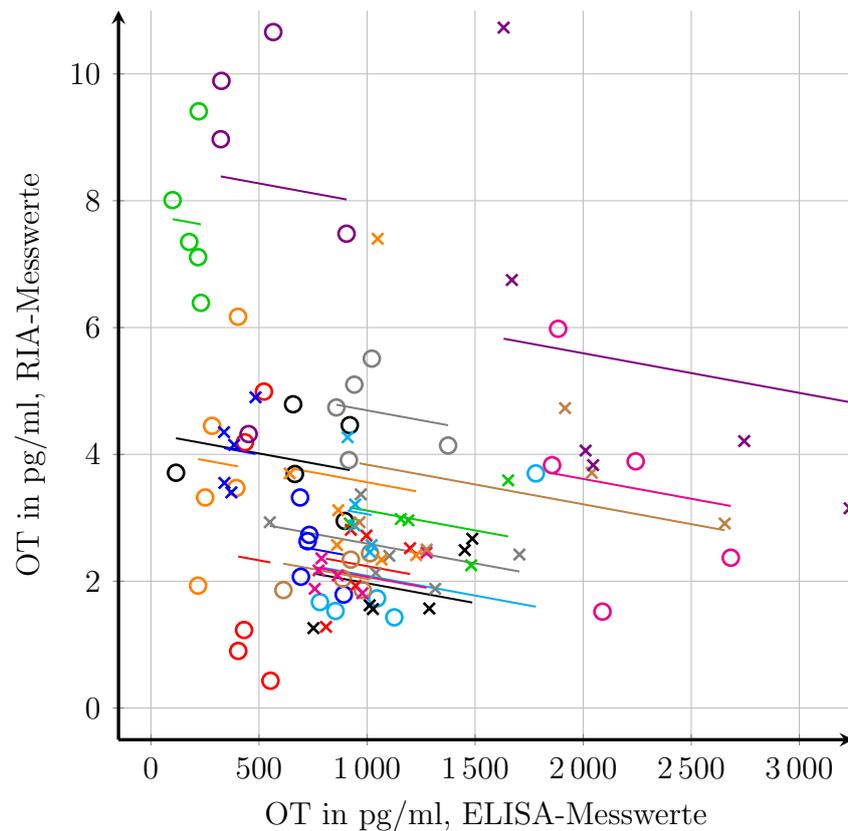


Abbildung 5.2: Plot zur Visualisierung der Messwiederholungskorrelation nach Bakdash & Marusich (2017). Messwerte der gleichen Probandin sind jeweils in Farbe und Form gleich, ansonsten besteht keine besondere Bedeutung in der Zuweisung von Farbe oder Form zu einem Datenpunkt. Die eingezeichneten Linien visualisieren die zueinander parallel verlaufenden Regressionsgeraden, die während der Anwendung der Messwiederholungskorrelation bestimmt wurden. Die Regressionsgeraden sind den nächstgelegenen Datenpunkten der gleichen Farbe zuzuordnen.

Neben linearen Zusammenhängen kann es aber auch nichtlineare Zusammenhänge zwischen den gewonnenen Messwerten geben. Durch Berechnung des Kendall- $\tau$ -Rangkorrelationskoeffizienten (s. Tabelle 5.6) wurde untersucht, ob sich eine Übereinstimmung in der relativen Ordnung der Messergebnisse zeigt und somit eine nicht-lineare Korrelation vorliegt. Kendalls Rangkorrelationskoeffizient ist gegenüber dem weiter verbreiteten Spearman- $\rho$  die robustere Methode (Croux & Dehon 2010).

Sowohl bei den ELISA-Messwerten als auch bei den RIA-Messwerten ist deutlich eine signifikante intrapersonelle Korrelation zu erkennen. Für Probanden, für die bereits zu Beginn der Messreihe hohe OT-Werte bestimmt wurden, wurden also statistisch gesehen auch im weiteren Verlauf der Messreihe höhere Werte gemessen. Dies zeigt sich daran, dass die Messwerte im Verlauf des Versuchs (Messzeitpunkte 2 bis 5) mit der Baseline-Messung (1b) korrelieren. Der Korrelationskoeffizient für die Messzeitpunkte 3, 4, und 5 liegt hierbei bei  $r = 0,516$  bis  $r = 0,611$  bei einer hohen

		ELISA 1b	ELISA 2	ELISA 3	ELISA 4	ELISA 5	RIA 1a	RIA 1b	RIA 2	RIA 3	RIA 4	RIA 5
ELISA 1a	Korrelationskoeffizient	,333	,467	,333	,333	,200	,467	,467	,067	,600	,333	,733
	Sig. (2-seitig)	,348	,188	,348	,348	,573	,188	,188	,851	,142	,348	,039
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	5	6	6
ELISA 1b	Korrelationskoeffizient		,400	,589	,516	,611	,905	-,042	-,053	-,298	-,074	-,168
	Sig. (2-seitig)		,014*	<,001*	,001*	<,001*	,004*	,795	,746	,074	,650	,299
	N		20	20	20	20	7	20	20	19	20	20
ELISA 2	Korrelationskoeffizient			,621	,716	,558	-,143	-,032	-,063	-,111	-,084	-,221
	Sig. (2-seitig)			<,001*	<,001*	,001*	,652	,846	,697	,506	,604	,173
	N			20	20	20	7	20	20	19	20	20
ELISA 3	Korrelationskoeffizient				,737	,705	,333	-,095	-,147	-,263	-,105	-,326
	Sig. (2-seitig)				<,001*	<,001*	,293	,559	,364	,115	,516	,044*
	N				20	20	7	20	20	19	20	20
ELISA 4	Korrelationskoeffizient					,716	,238	-,105	-,137	-,158	-,095	-,253
	Sig. (2-seitig)					<,001*	,453	,516	,399	,345	,559	,119
	N					20	7	20	20	19	20	20
ELISA 5	Korrelationskoeffizient						,429	-,032	-,147	-,205	-,084	-,137
	Sig. (2-seitig)						,176	,846	,364	,221	,604	,399
	N						7	20	20	19	20	20
RIA 1a	Korrelationskoeffizient							,333	,333	-,067	,429	,429
	Sig. (2-seitig)							,293	,293	,851	,176	,176
	N							7	7	6	7	7
RIA 1b	Korrelationskoeffizient								,421	,439	,632	,516
	Sig. (2-seitig)								,009*	,009*	<,001*	,001*
	N								20	19	20	20
RIA 2	Korrelationskoeffizient									,509	,305	,168
	Sig. (2-seitig)									,002*	,060	,299
	N									19	20	20
RIA 3	Korrelationskoeffizient										,415	,427
	Sig. (2-seitig)										,013*	,011*
	N										19	19
RIA 4	Korrelationskoeffizient											,547
	Sig. (2-seitig)											,001*
	N											20

Tabelle 5.6: Nicht parametrische Korrelation zwischen RIA und ELISA

Signifikanz ( $p < 0,001$ ). Auch Messzeitpunkt 2 zeigt eine signifikante Korrelation mit der Baselinemessung ( $r = 0,400$ ;  $p = 0,014$ ). Die anderen Messzeitpunkte des ELISA zeigen eine hohe und statistisch signifikante Korrelation mit den zeitlich darauf folgenden Messwerten ( $r = 0,558$  bis  $0,737$  bei  $p \leq 0,001$ ).

Bei den Messwerten der RIA stellt sich ebenfalls eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Baseline-Messung und den darauf folgenden Messzeitpunkten dar. Die Messungen 4 und 5 (Ruhemessungen nach Beendigung des Paradigmas) weisen eine signifikante Korrelation zur Baseline-Messung auf ( $r = 0,516$  bis  $0,632$  bei  $p \leq 0,001$ ). In den Messungen 2 und 3 ist die Korrelation zur Baseline weniger stark ausgeprägt ( $r = 0,421$  bis  $0,439$  bei  $p = 0,009$ ). Die weiteren Messwerte der RIA zeigen Korrelationen zwischen den Messzeitpunktpaaren 2/3 ( $r = 0,509$ ;  $p = 0,002$ ) sowie zwischen 3/4 und 3/5 ( $r = 0,415$ ;  $p = 0,013$ ;  $r = 0,427$ ;  $p = 0,011$ ). Des Weiteren zeigt sich eine Korrelation zwischen den Zeitpunkten 4 und 5 ( $r = 0,547$ ;  $p = 0,001$ ). Im Vergleich zu den ELISA-Messwerten sind die intrapersonellen Korrelationen sowohl in ihrer Effektstärke als auch in ihrer Signifikanz schwächer.

Zwischen ELISA- und RIA-Messwerten zeigen sich statistisch signifikante Korrelationen zwischen Messzeitpunkt 1a bei RIA und Messzeitpunkt 1b bei ELISA ( $r = 0,905$ ;  $p = 0,004$ ), jedoch mit geringer Aussagekraft aufgrund der Stichprobenzahl ( $n = 7$ ). Ansonsten zeigen sich negative, aber nicht signifikante, Korrelationen zwischen den ELISA- und RIA-Messwerten. Einzig zwischen ELISA 3 und RIA 5 ist eine signifikante negative Korrelation ( $r = -0,326$ ;  $p = 0,044$ ) zu beobachten.

## 5.2 Vergleich nach Normalisierung der Messwerte

Wie aus Kapitel 5.1 ersichtlich ist, können die Absolutwerte zwischen den ELISA- und RIA-Messwerten nicht direkt verglichen werden. Einer der Hauptgründe dafür liegt in den um mehrere Größenordnungen unterschiedlichen Messwerten. Im übergreifenden Forschungskontext dieser Arbeit, sowie in vielen anderen Forschungsarbeiten zu Oxytocin, sind vor allem die OT-Veränderungen im Zeitverlauf relevant. Daher bietet sich die Normalisierung der Messwerte in Abhängigkeit zum Wert der Baselinemessung der jeweiligen Probandin an. Nach der Normalisierung können auch weitere Werkzeuge des Methodenvergleichs angewendet werden. Kapitel 5.2.1 berechnet daher basierend auf den normalisierten Werten den Konkordanz-Korrelationskoeffizienten als statistisches Maß der Übereinstimmung und Kapitel 5.2.2 ermöglicht mittels Bland-Altman-Plots eine visuelle Beurteilung der Übereinstimmung zwischen ELISA und RIA.

	ELISA2	ELISA3	ELISA4	ELISA5	RIA2	RIA3	RIA4	RIA5
Anzahl Werte	20	20	20	20	20	19	20	20
Mittelwert	108,2%	102,5%	116,0%	119,9%	160,1%	156,4%	121,3%	124,0%
Median	104,1%	94,3%	102,2%	113,9%	129,1%	119,9%	112,7%	125,2%
Standardabweichung	54,9%	35,1%	40,4%	43,2%	105,3%	93,9%	43,5%	50,3%
Minimum	13%	61%	65%	46%	58%	40%	64%	25%
Maximum	275%	198%	199%	211%	554%	466%	229%	259%

Tabelle 5.7: Deskriptive Statistiken nach Normalisierung der Messwerte. Der Wert der Baselinemessung 1b einer Probandin bezeichnet dabei 100%. Andere Werte der Probandin wurden dabei relativ zur Baselinemessung normalisiert.

Die normalisierten Messwerte  $\overline{OT}$  zum Zeitpunkt  $t > baseline$  werden für Probandin  $i$  in Abhängigkeit von den direkt gemessenen Werten  $OT$  folglich durch die Formel  $\overline{OT}_i^t = OT_i^t / OT_i^{baseline}$  berechnet. Tabelle 5.7 zeigt die deskriptive Statistik nach der Normalisierung an. Mittelwert und Median liegen nah beieinander, unterscheiden sich jedoch gerade bei Messzeitpunkt 2 und 3 in der Stärke der Ausprägung (Median: ELISA 2 = 104,1%; ELISA 3 = 94,3%; RIA 2 = 129,1%; RIA 3 = 119,9%).

Diese Beobachtung wird durch einen Wilcoxon-Rang-Vorzeichen-Test bestätigt. Sowohl bei Messung 2 wie auch Messung 3 zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den normalisierten Werten bei ELISA und RIA ( $Z = -2,165; p = 0,030$  bzw.  $Z = -2,857; p < 0,001$ ). In diesen Fällen wird die Nullhypothese, dass die Differenzen zwischen den jeweiligen Messwerten gleichmäßig um 0 verteilt seien, abgelehnt. Es zeigen sich folglich systematische Unterschiede zwischen den beobachteten Werten. Der Wilcoxon-Test detektiert keine signifikanten Unterschied bei den Messzeitpunkten 4 und 5 zwischen ELISA und RIA ( $Z = -0,037; p = 0,985$  bzw.  $Z = -0,336; p = 0,756$ ), so dass hier die Nullhypothese beibehalten wird.

Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde hierbei als nichtparametrische Alternative zum  $t$ -Test gewählt, da die Voraussetzung des  $t$ -Tests, dass die Werte normalverteilt sind, laut Tabelle 5.8 nicht gegeben ist.

	ELISA						RIA					
	Kolmogorow-Smirnow			Shapiro-Wilk			Kolmogorow-Smirnow			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Sig.	Statistik	df	Sig.	Statistik	df	Sig.	Statistik	df	Sig.
Abnahme 2 / Baseline	0,200	20	0,036*	0,878	20	0,016*	0,199	20	0,036*	0,690	20	<0,001*
Abnahme 3 / Baseline	0,178	20	0,097	0,906	20	0,054	0,278	19	<0,001*	0,763	19	<0,001*
Abnahme 4 / Baseline	0,191	20	0,054	0,900	20	0,042*	0,162	20	0,180	0,913	20	0,073
Abnahme 5 / Baseline	0,111	20	0,200	0,957	20	0,481	0,144	20	0,200	0,930	20	0,415

Tabelle 5.8: Tests auf Normalverteilung nach Normalisierung der Messwerte. In der Tabelle sind alle Werte markiert, die auf einem Signifikanzniveau von 95% nicht normalverteilt sind. Die Nullhypothese, dass die Werte normalverteilt seien, wird in den markierten Fälle abgelehnt.

### 5.2.1 Konkordanz-Korrelationskoeffizient

In der Literatur wird der Konkordanz-Korrelationskoeffizient  $\rho_c$  von Lin et al. (2000) verwendet, um die Übereinstimmung zweier Messmethoden mittels einer einfachen Maßzahl anzugeben. Über die genaue Interpretation dieses Koeffizienten herrscht in der Literatur noch keine vollständige Übereinstimmung, so gelten teilweise bereits Werte von unter 0,9 als schlechte Übereinstimmung (McBride 2005), während andere Autoren das Limit für eine schwache Übereinstimmung bei Werten unter 0,4 ansetzen (Koch & Spörl 2007). Unabhängig von der Festsetzung des Interpretationslimits zeigt sich für die normalisierten Werte eine schlechte Übereinstimmung. Die Übereinstimmung zwischen beiden Messmethoden im Versuchsverlauf beträgt  $\rho_c = 0,0529$  bei Messzeitpunkt 2,  $\rho_c = 0,0789$  und  $\rho_c = -0,109$  bei den Zeitpunkten 3 und 4 und  $\rho_c = 0,3452$  beim letzten Messzeitpunkt 5. Eine Berechnung des Konkordanz-Korrelationskoeffizienten für die absoluten Messwerte ist aufgrund der unterschiedlichen Größenordnungen der Ergebnisse nicht sinnvoll.

### 5.2.2 Bland-Altman-Plots

Zur Ergänzung dieses statistischen Maßes sind Bland-Altman-Plots als grafische Methode zum Vergleich zweier Messmethoden geeignet (Bland & Altman 1986, Watson & Petrie 2010). Dabei werden die Differenzen zwischen den beiden Messmethoden gegen den Mittelwert beider Messungen geplottet. Aus den in Abbildung 5.3 dargestellten Bland-Altman-Plots lässt sich ablesen, dass bei allen Messungen eine hohe Schwankungsbreite zwischen den durch ELISA und RIA ermittelten Werten existiert. Zu den Messzeitpunkten 2 und 3 während des sozialen Ausschlusses ist

die Schwankungsbreite größer als während den Ruhezeitpunkten 4 und 5. Aus Abbildung 5.3a und Abbildung 5.3b lässt sich zudem ablesen, dass der ELISA zu den Zeitpunkten 2 und 3 systematisch niedrigere Werte misst als der RIA, da die Differenz der gewonnenen Werte dort negativ ist.

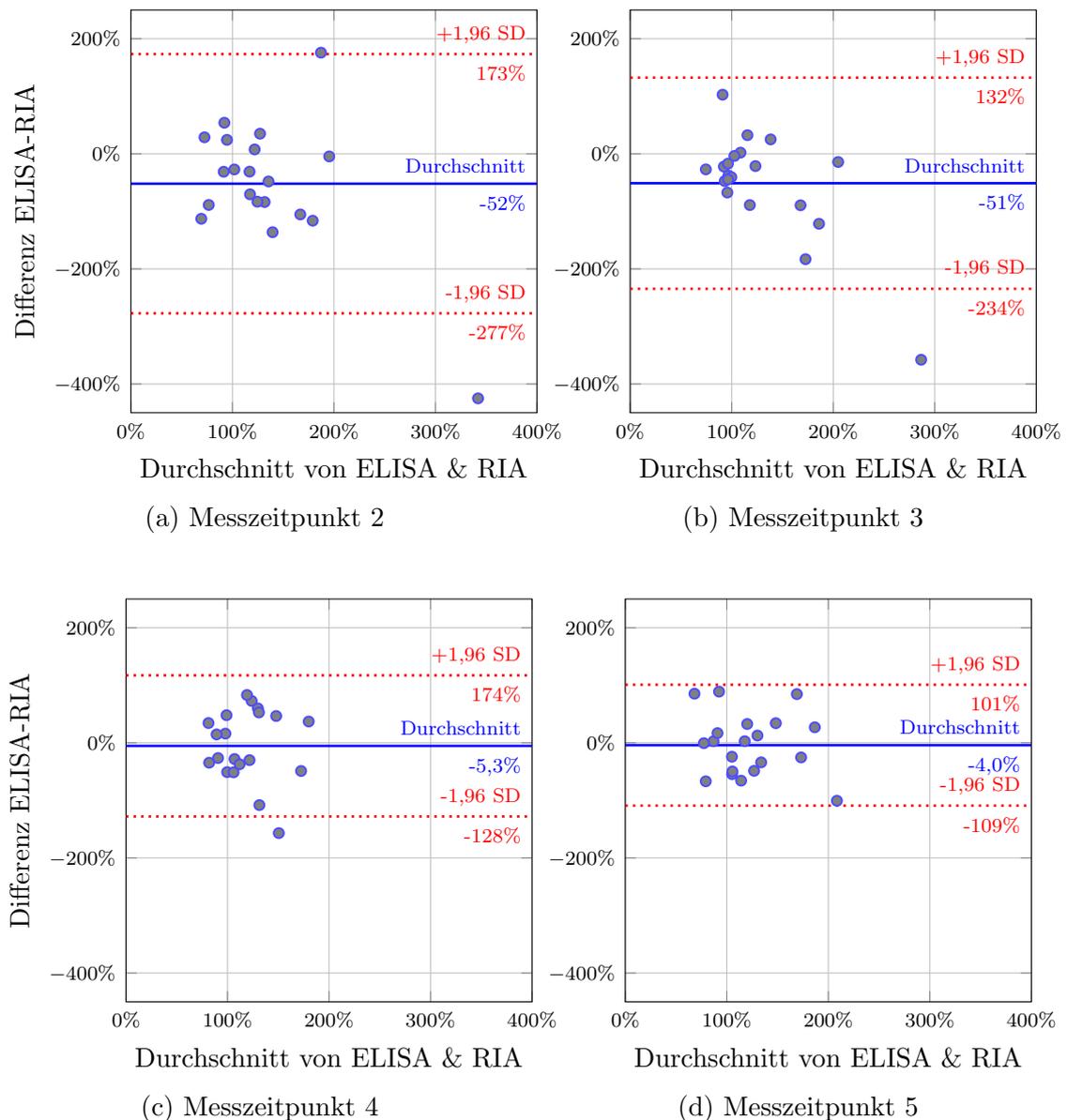


Abbildung 5.3: Bland-Altman-Plots für alle normalisierten Messwerte

## 5.3 Vergleich der Kurvenverläufe

Abbildung 5.4 zeigt die gemittelten Verläufe der Messkurven, sowohl für die mittels ELISA bestimmten Werte (Abbildung 5.4a) als auch für den RIA (Abbildung 5.4b). Im Hintergrund der gemittelten Kurven sind jeweils die individuellen Kurvenverläufe der einzelnen Probandinnen sichtbar. Die Abbildung zeigt neben dem oft verwendeten arithmetischen Mittel auch den geometrischen Mittelwert an. Im Vergleich zum arithmetischen Mittel ist das geometrische Mittel robuster gegenüber einzelnen Ausreißern. Intuitiv handelt es sich beim geometrischen Mittel um den Punkt, der den geringsten Abstand zu allen anderen Messpunkten aufweist. Wie optisch aus Abbildung 5.4 ersichtlich ist, bewegen sich die Verlaufskurven der meisten Probandinnen in einem relativ engem Bereich um das geometrische Mittel herum, nur wenige Kurven haben einen weitaus höheren Durchschnittsverlauf. Daher eignet sich das geometrische Mittel besser zur weitergehenden Analyse. Der Kurvenverlauf ist hierbei größtenteils übereinstimmend zwischen den beiden Mittelwerten.

Abbildung 5.4c stellt die Veränderungen der Durchschnittskurven von ELISA und RIA einander gegenüber. In Anlehnung zur Normalisierung relativ zur Baselinemessung aus Kapitel 5.2 wurden in Teilabbildung *c* die Y-Achsenintervalle so gewählt, dass die geometrischen Mittelwerte der Baselinemessung möglichst nahe beieinander liegen. Auffällig ist dabei der gegenläufige Trend der beiden Verlaufskurven. Bei der Verlaufskurve des RIA wird ein starker Anstieg zwischen Baselinemessung und Zeitpunkt 2 (+39,9%) und ein geringer Rückgang zu Zeitpunkt 3 (-2,7%) von einem deutlichen Abfall zwischen Zeitpunkt 3 und 4 (-15,8%) mit einer kleineren Verringerung zwischen Zeitpunkt 4 und 5 (-1,9%) beobachtet. Beim ELISA zeigt sich fast das gegenteilige Bild. Die Verlaufskurve beginnt mit einem schwachen Abfall von der Baseline zu Zeitpunkt 2 (-6,4%), der sich zwischen Zeitpunkt 2 und 3 fast vollständig zurückbildet (+4,1%). Im Gegensatz zum starken Abfall zwischen Zeitpunkt 3 und 4 beim Verlauf des RIA wird in der Verlaufskurve des ELISA ein starker Anstieg (+12,5%) zwischen den selben Messzeitpunkten beobachtet. Zwischen Zeitpunkt 4 und 5 steht beim ELISA ein leichter Anstieg (+2,7%) einem leichten Abfall der RIA-Kurve entgegen.

Die hier beobachteten Verlaufskurven sind übereinstimmend mit den bisherigen Beobachtungen, dass eine negative, wenn auch nicht statistisch relevante, Korrelation zwischen den beiden Messmethoden besteht (s. Kapitel 5.1.2). Die statistisch signifikanten Unterschiede der beiden Messmethoden an Zeitpunkt 2 und 3, die in Kapitel 5.2 beschrieben wurden, lassen sich auch in dieser Grafik beobachten.

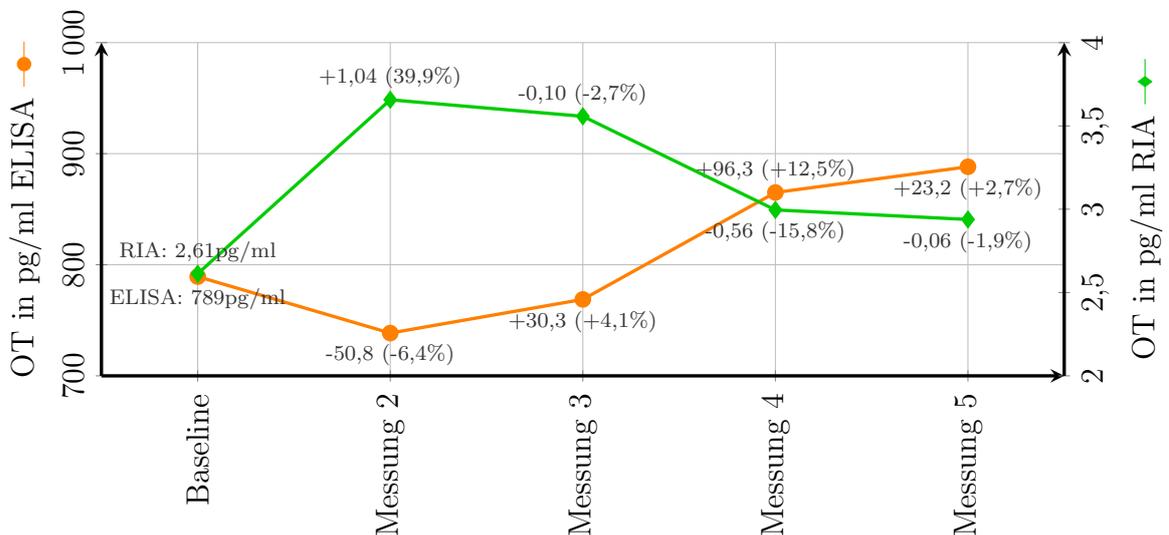
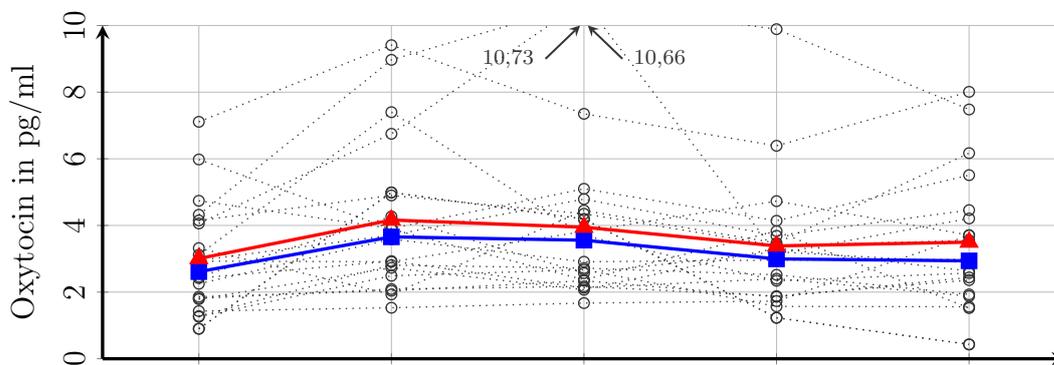
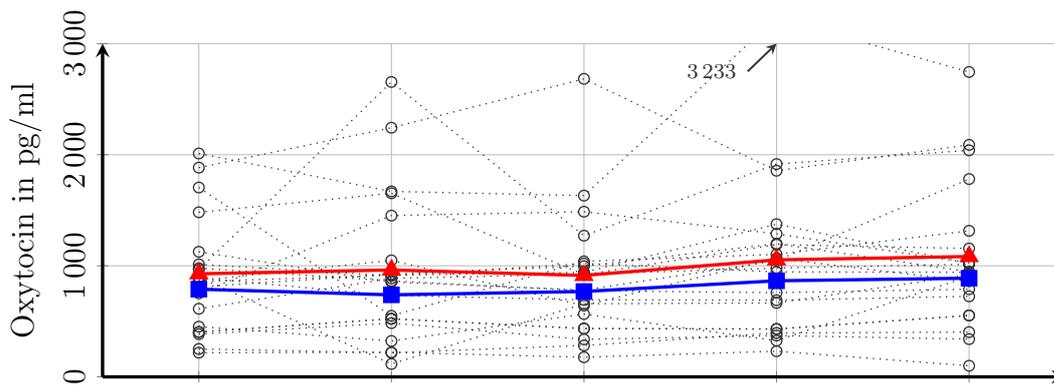


Abbildung 5.4: Einzelmesswerte von Oxytocin mit Verlaufskurven. Die einzelnen Messwerte sind in der Grafik als Kreise dargestellt, außerhalb des Diagramms liegende Ausreißer sind durch Pfeile mit ihren Absolutwerten angegeben. Die gemittelte Verlaufskurve ist einmal auf Basis der arithmetischen Mittelwerte ( $\blacktriangle$ ) und einmal auf Basis des geometrischen Mittels ( $\blacksquare$ ) angegeben. Teilabbildung c vergleicht die Veränderungen des geometrischen Mittels für ELISA ( $\bullet$ ) und RIA ( $\blacklozenge$ ).

## 5.4 Qualitativer Vergleich

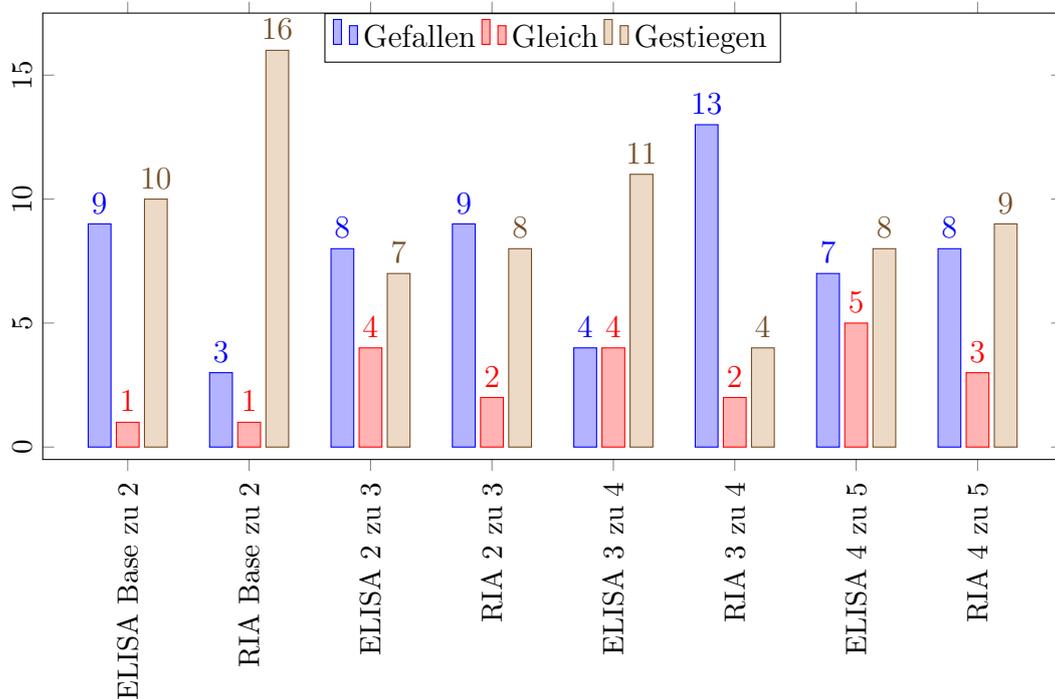


Abbildung 5.5: Qualitativer Vergleich der Vorzeichenänderungen im Kurvenverlauf

Abbildung 5.4a und Abbildung 5.4b zeigen bei den Verlaufskurven der Messwerte der Probanden viele Kurvenverläufe, die vom Verlauf der Durchschnittskurven abweichen. Zudem sind einige Ausreißer erkennbar. Könnten die Ausreißer also übermäßigen Einfluss auf den Durchschnittsverlauf ausgeübt haben, so dass die gegenteiligen Kurvenverläufe aus Kapitel 5.3 dadurch beeinflusst wurden? Um dieser Fragestellung nachzugehen wird in diesem Kapitel überprüft, ob die Tendenzangaben der beiden Messmethoden vergleichbar sind. Dazu wurden die normalisierten Veränderungen aus Kapitel 5.2 in drei Kategorien eingeteilt: Bei einer Abnahme von mehr als 5% im Vergleich zum vorherigen Messzeitpunkt wurde der Messwert in die Kategorie *gefallen* eingeteilt, bei einer Zunahme um mehr als 5% in die Kategorie *gestiegen*. Lag die Veränderung zwischen plus und minus 5%, so wurde der Messwert in die Kategorie *gleich* eingeteilt. Das Ergebnis dieser Einteilung ist in Abbildung 5.5 dargestellt. Bei Betrachtung der Abbildung ist bereits optisch zu erkennen, dass es Unterschiede in den absoluten Häufigkeiten der Tendenzveränderungen bei der Baseline-Messung zur Messung 2 gibt, sowie bei Messung 3 zu Messung 4. Tabelle 5.9 bis Tabelle 5.12 geben als Kreuztabellen die jeweilige Koinzidenz der Wertveränderungen wieder. Zu jedem Messzeitpunkt wurde ein exakter Test nach Fischer durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen den jeweiligen Kategorialvariablen zu un-

tersuchen. Gemäß dem exakten Test nach Fischer wird die Nullhypothese für die Veränderungen von der Baselinemessung zu Messung 2 (Tabelle 5.9), von Messzeitpunkt 3 zu 4 (Tabelle 5.11) und von Messzeitpunkt 4 zu 5 (Tabelle 5.12) beibehalten. Die Nullhypothese besagt, dass ELISA und RIA nicht äquivalente Tendenzaussagen treffen. Die Signifikanzaussage reicht dabei von  $p > 0,99$  bei der Veränderung von Baseline zu Messzeitpunkt 2, über  $p = 0,533$  bei der Veränderung zwischen den Zeitpunkten 3 und 4 bis  $p = 0,120$  bei der Veränderung zwischen Zeitpunkt 4 und 5. Es besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Werten. Der exakte Test nach Fischer lehnt die Nullhypothese für die Veränderung zwischen den Messzeitpunkten 2 und 3 mit  $p = 0,047$  ab, somit besteht ein statistischer Zusammenhang zwischen den Veränderungen, wie sie mit ELISA und RIA gemessen wurden.

		RIA Baseline zu 2			Gesamt
		gefallen	gleich	gestiegen	
ELISA Baseline zu 2	gefallen	1	0	8	9
	gleich	0	0	1	1
	gestiegen	2	1	7	10
Gesamt		3	1	16	20

Tabelle 5.9: Kreuztabelle der Tendenzaussagen von Baseline zu Messpunkt 2. Exakter Test nach Fischer behält Nullhypothese bei ( $p > 0,99$ )

		RIA 2 zu 3			Gesamt
		gefallen	gleich	gestiegen	
ELISA 2 zu 3	gefallen	6	1	1	8
	gleich	0	0	4	4
	gestiegen	3	1	3	7
Gesamt		9	2	8	19

Tabelle 5.10: Kreuztabelle der Tendenzaussagen von Messpunkt 2 zu 3. Exakter Test nach Fischer lehnt Nullhypothese ab ( $p = 0,047$ )

		RIA 3 zu 4			Gesamt
		gefallen	gleich	gestiegen	
ELISA 3 zu 4	gefallen	2	0	2	4
	gleich	3	0	1	4
	gestiegen	8	2	1	11
Gesamt		13	2	4	19

Tabelle 5.11: Kreuztabelle der Tendenzaussagen von Messpunkt 3 zu 4. Exakter Test nach Fischer behält Nullhypothese bei ( $p = 0,533$ )

		RIA 4 zu 5			Gesamt
		gefallen	gleich	gestiegen	
ELISA 4 zu 5	gefallen	1	2	4	7
	gleich	1	1	3	5
	gestiegen	8	0	2	8
Gesamt		8	3	9	20

Tabelle 5.12: Kreuztabelle der Tendenzaussagen von Messpunkt 4 zu 5. Exakter Test nach Fischer behält Nullhypothese bei ( $p = 0,120$ )

## 5.5 Fallstudie zur Ergebnisgleichheit in klinischen Studien

Für die klinische Forschung ist eine absolute Übereinstimmung der Werte gegebenenfalls nicht erforderlich, sofern eine Ergebnisgleichheit bei der Auswertung klinischer Studien unter Anwendung der verschiedenen Messmethoden vorliegt. Dieses Kapitel geht daher der Frage nach, ob die mittels der beiden Messmethoden bestimmten OT-Werte die gleiche Interpretation der Ergebnisse zulassen. Dazu werden die Messungen durch ELISA in Kapitel 5.5.1 und RIA in Kapitel 5.5.2 getrennt voneinander betrachtet.

### 5.5.1 ELISA

Die Auswertung klinischer Studien beginnt meist mit der Darstellung der deskriptiven Statistiken zu den gesammelten Messwerten. Für die mittels ELISA bestimmten Werte findet sich diese in Tabelle 5.1 zu Beginn von Kapitel 5. Neben einer tabellarischen Darstellung werden sogenannte Boxplots verwendet, um einen grafischen Überblick über die gesammelten Werte zu erhalten. Ein entsprechender Boxplot für die mittels ELISA analysierten Werte ist in Abbildung 5.6 dargestellt. Vor einer weiterführenden Analyse werden Extremwerte meist ausgeschlossen, diese sind in Abbildung 5.6 mit ausgefüllten Kreisen gekennzeichnet. Als Extremwert werden Werte betrachtet, die mehr als drei Standardabweichungen vom Median entfernt liegen. Gemäß dieser Definition wurden die Werte der Versuchspersonen mit den IDs 9 und 35 von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Die deskriptiven Statistiken nach dem Ausschluss der Extremwerte sind in Tabelle 5.13 aufgeführt.

Da es sich beim Versuchsaufbau um Messreihen mit einer Messwiederholung handelt, bietet sich die rmANOVA als statistische Methode zur Auswertung an. Die Voraussetzungen dazu sind zum einen eine Normalverteilung der Werte sowie deren Sphärizität. Die Normalverteilung der Messwerte ist größtenteils verletzt (Tabelle 5.2), die ANOVA gilt jedoch als robust gegenüber einer Verletzung dieser Voraussetzung.

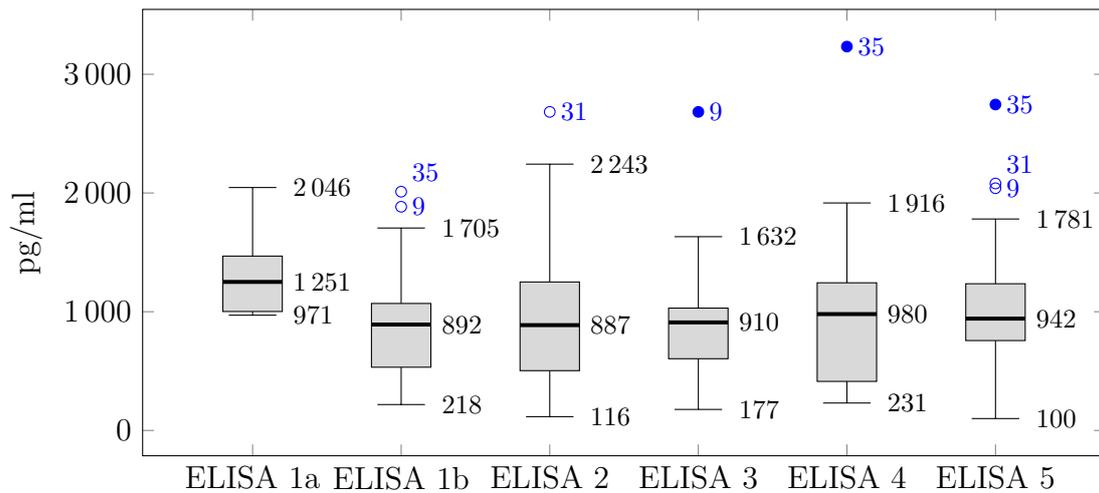


Abbildung 5.6: Boxplot zu den ELISA-Messwerten. Der Median ist als horizontaler Strich innerhalb einer Box, die das untere und obere Quartil der Werte begrenzt, angegeben. Die Antennen erstrecken sich jeweils um das 1,5-fache der Boxausdehnung nach oben oder unten, es sei denn das absolute Minimum oder Maximum der Werte wurde zuvor erreicht. Outlier sind durch Kreise gekennzeichnet, ausgefüllte Kreise zeigen Extremwerte, die aus der Analyse ausgeschlossen wurden. Daneben jeweils: ID der Versuchsperson

Als nichtparametrische Alternative existiert der Friedman-Test, der ebenfalls durchgeführt wurde. Die Sphärizität wurde über den Mauchly-Test bestimmt, der eine Verletzung mit  $p = 0,010$  anzeigt. Das dabei bestimmte Greenhouse-Geisser  $\epsilon$  von 0,58 erlaubt eine Korrektur der Freiheitsgrade der rmANOVA nach Greenhouse-Geisser. Bei der ANOVA zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Messwerte ( $F(2,32; 39,45) = 0,988; p = 0,392$ ). Auch bei angenommener Sphärizität liegt kein signifikanter Unterschied vor ( $F(4; 68) = 0,988; p = 0,420$ ). Auch bei Friedmans zweifaktorieller Varianzanalyse nach Rang zeigt sich kein signifikanter Unterschied ( $\chi^2(4) = 3,378, p = 0,497$ ) zwischen Messwerten der ELISA-Messreihe.

	ELISA 1a	ELISA 1b	ELISA 2	ELISA 3	ELISA 4	ELISA 5
Anzahl Werte	5	18	18	18	18	18
Mittelwert	1 152	815	852	775	888	936
Median	1 227	863	859	779	963	931
Standardabweichung	149	394	608	342	442	467
Minimum	971	218	116	177	231	100
Maximum	1 276	1 705	2 655	1 487	1 916	2 040

Tabelle 5.13: Deskriptive Statistiken ELISA ohne Extremwerte

### 5.5.2 RIA

Analog zum Vorgehen in Kapitel 5.5.1 wurde ein Boxplot für die mittels RIA gemessenen Werte erstellt (Abbildung 5.7). Versuchsperson 17 wurde daher von der Auswertung ausgeschlossen, da bei ihr Extremwerte zum Messzeitpunkt 4 vorlagen. Tabelle 5.14 zeigt die deskriptiven Statistiken nach Ausschluss der Extremwerte.

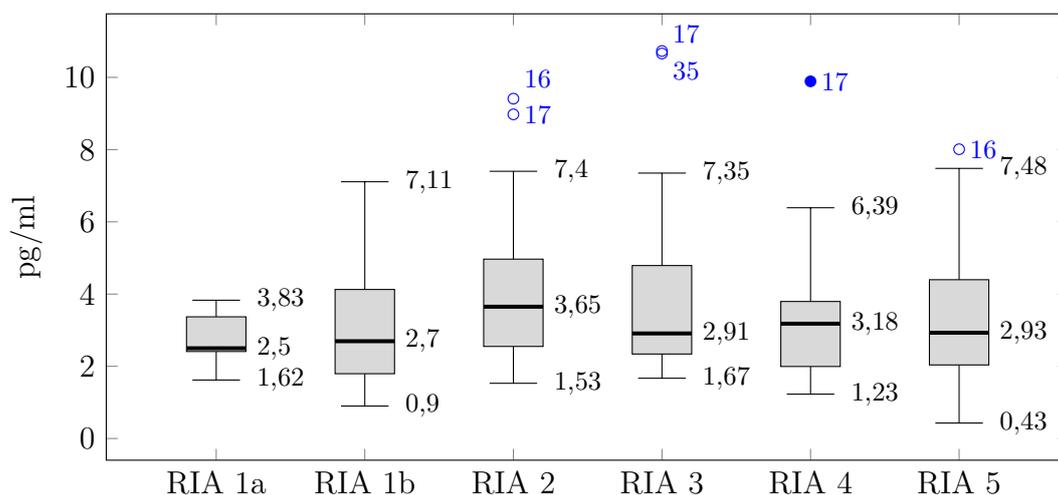


Abbildung 5.7: Boxplot zu den RIA-Messwerten. Der Median ist als horizontaler Strich innerhalb einer Box, die das untere und obere Quartil der Werte begrenzt, angegeben. Die Antennen erstrecken sich jeweils um das 1,5-fache der Boxausdehnung nach oben oder unten, es sei denn das absolute Minimum oder Maximum der Werte wurde zuvor erreicht. Outlier sind durch Kreise gekennzeichnet, ausgefüllte Kreise zeigen Extremwerte, die aus der Analyse ausgeschlossen wurden. Daneben jeweils: ID der Versuchsperson

Für die mittels RIA ermittelten Werte wurde ebenfalls eine rmANOVA und der Friedman-Test durchgeführt. Der Mauchly-Test auf Sphärizität zeigt eine Verletzung dieser Vorbedingung zur ANOVA mit  $p = 0,009$  und einem Greenhouse-Geisser  $\epsilon$  von 0,656. Daher wurde bei der rmANOVA die Greenhouse-Geisser Korrektur der Freiheitsgrade angewandt. Mit korrigierten Freiheitsgraden zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Messwerte ( $F(2,625; 40,63) = 2,765; p = 0,060$ ). Bei angenommener Sphärizität ergäbe sich ein signifikanter Unterschied ( $F(4; 68) = 2,765; p = 0,034$ ). Auch Friedmans zweifaktorielle Varianzanalyse nach Rang zeigt einen signifikanten Unterschied ( $\chi^2(4) = 16,256, p = 0,003$ ).

Der Auffassung der Autorin nach sind in diesem Fall die Ergebnisse des Friedman-Tests aussagekräftiger, als die der ANOVA, da die Vorbedingung der Normalverteilung für die ANOVA verletzt ist (s. Tabelle 5.2). Zwar gilt die ANOVA als robust gegenüber Verletzungen der Normalverteilung, allerdings gilt dies eher für größere Stichprobengrößen. Aus diesem Grund wurde auf Basis des Signifikanzergebnisses

	RIA 1a	RIA 1b	RIA 2	RIA 3	RIA 4	RIA 5
Anzahl Werte	7	19	19	18	19	19
Mittelwert	2,79	2,94	3,91	3,79	3,04	3,29
Median	2,50	2,46	3,59	2,82	3,15	2,88
Standardabweichung	0,75	1,66	2,05	2,25	1,24	1,81
Minimum	1,62	0,90	1,53	1,67	1,23	0,43
Maximum	3,83	7,11	9,41	10,73	6,39	8,01

Tabelle 5.14: Deskriptive Statistiken RIA ohne Extremwerte

des Friedman-Tests ein paarweiser Dunn-Test mit Bonferroni-Korrektur ausgeführt, um zu bestimmen, zwischen welchen Messzeitpunkten ein Unterschied vorliegt. Tabelle 5.15 zeigt die Ergebnisse des Dunn-Tests. Bei der Bonferroni-Korrektur wird das Signifikanzniveau abgesenkt, um falsch-positive Ergebnisse bei multipler Hypothesentestung zu vermeiden. Hierbei ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen der Baselinemessung und dem Messzeitpunkt 2 ( $p = 0,004$ ) sowie zwischen der Baselinemessung und Messzeitpunkt 3 ( $p = 0,037$ ). Zwischen den anderen Messzeitpunkten existiert kein signifikanter Unterschied nach der Bonferroni-Korrektur. Unkorrigiert gäbe es noch einen signifikanten Unterschied zwischen Messzeitpunkt 2 und 4 mit  $p = 0,013$  und der Baselinemessung und Zeitpunkt 5 mit  $p = 0,023$ .

Paare	Statistik	Korrig. Statistik	Sig	Korrig. Sig.
RIA 1b-2	-1,861	-3,531	<0,001	0,004*
RIA 1b-3	-1,528	-2,899	0,004	0,037*
RIA 1b-4	-0,556	-1,054	0,292	1,000
RIA 1b-5	-1,194	-2,266	0,023	0,234
RIA 2-3	0,333	0,632	0,527	1,000
RIA 2-4	1,306	2,477	0,013	0,132
RIA 2-5	0,667	1,265	0,205	1,000
RIA 3-4	0,972	1,845	0,065	0,651
RIA 3-5	0,333	0,632	0,527	1,000
RIA 4-5	-0,639	-1,212	0,225	1,000

Tabelle 5.15: Paarweiser Dunn-Test der RIA Messwerte zu unterschiedlichen Messzeitpunkten. Die Spalte Korrig. Sig. gibt die Signifikanz nach der Bonferroni Korrektur des Signifikanzniveaus zum Ausgleich multipler Hypothesentestung an.

### 5.5.3 Vergleich der Auswertungen der ELISA- und RIA-Messwerte

Nach Durchführung der Statistik lässt sich feststellen, dass bei den vorliegenden Daten durch den Einsatz von ELISA oder RIA es zu unterschiedlichen Studienergebnissen kommt. Zum einen wurden andere Testpersonen aufgrund von anderen

Extremwerten ausgeschlossen, zum anderen zeigt die statistische Analyse nur bei der RIA einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Messzeitpunkten.

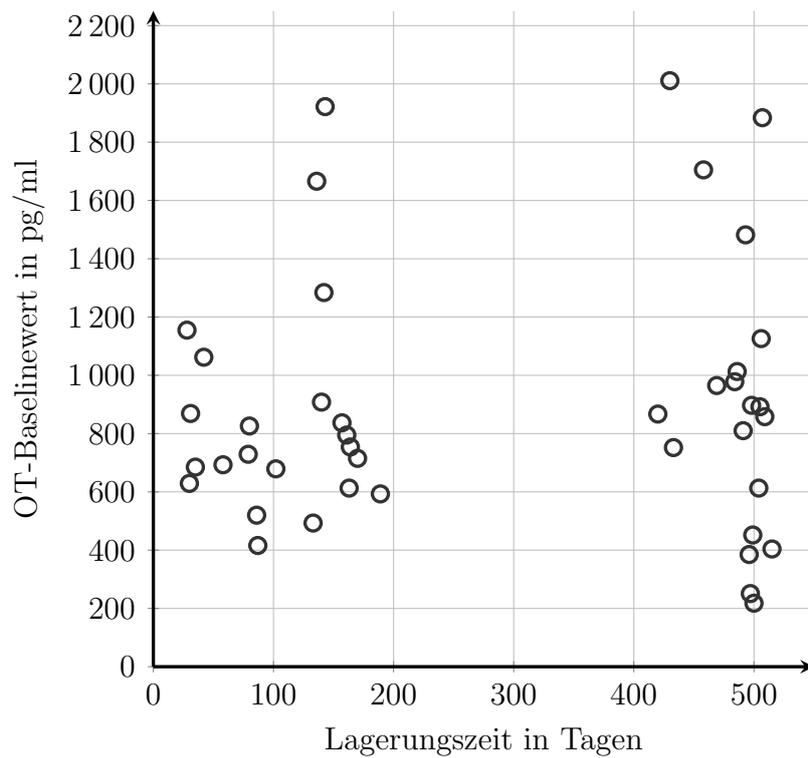
Der gemittelte Kurvenverlauf des ELISA und des RIA ist dabei optisch weitgehend identisch zu den Abbildungen in Abbildung 5.4, weshalb an dieser Stelle die Abbildung nicht erneut wiederholt wird. In Abbildung 5.4a ist ein leichter Abfall zwischen Baseline-Messung und Messung 2 zu erkennen. Von Messung 2 zu Messung 5 zeigt sich ein leichter Anstieg im Vergleich zur Baseline-Messung. Jedoch ist keine der Veränderungen statistisch signifikant, wie in Kapitel 5.5.1 erläutert wurde.

Der Kurvenverlauf der RIA-Messwerte verläuft gegenläufig zum Kurvenverlauf der ELISA-Messwerte. Einem Anstieg zwischen der Baseline-Messung und der Messung 2, folgt ein leicht abfallendes Plateau zwischen Messung 2 und 3. Zwischen Messung 3 und 4 fällt die Kurve wieder ab und zwischen Messung 4 und 5 zeigt sich keine Veränderung. Wie in Kapitel 5.5.2 erörtert zeigen sich hier statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Baseline und Messzeitpunkt 2 und 3. Kapitel 6 diskutiert verschiedene Erklärungsansätze zu den beobachteten Abweichungen zwischen Messungen mittels ELISA und RIA.

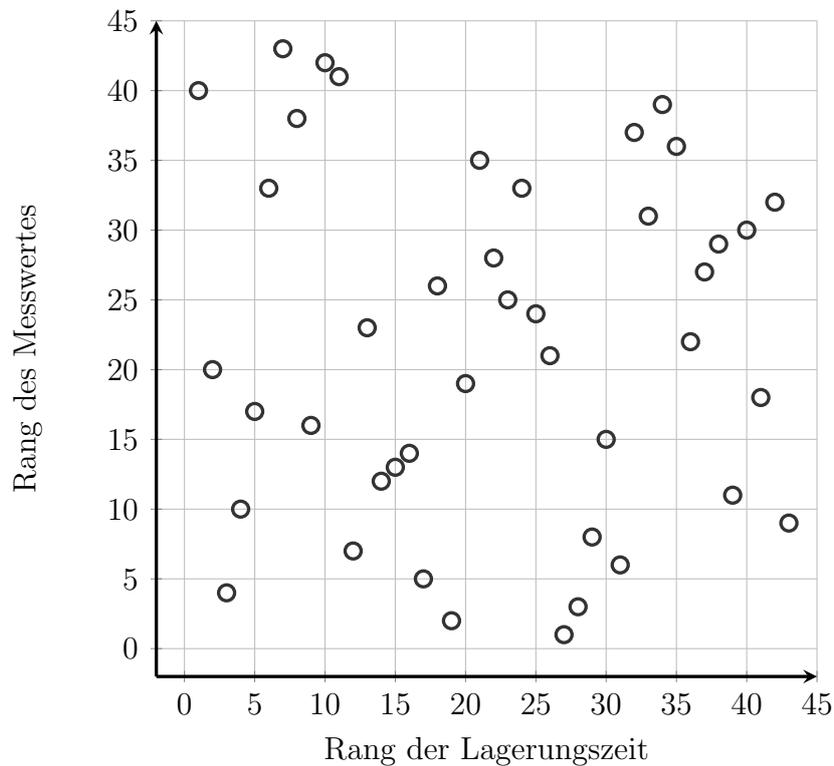
## 5.6 Einfluss der Lagerungszeit

Insgesamt wurden im Kontext dieser Studie 43 Probandinnen getestet (s. Kapitel 4.1), deren Proben in zwei Messreihen analysiert wurden. Die in dieser Auswertung benutzten ELISA-Proben wurden 420 bis 515 Tage gelagert. Der Median liegt bei 497 Tagen. Abbildung 5.8 zeigt die Rangkorrelation der 20 verwendeten Baselineproben und der neueren Baselinemessungen ( $n = 23$ , Lagerungszeit 28 bis 189 Tage, im Median 133 Tage). Da alle anderen Messwerte durch das Cyberball-Paradigma beeinflusst sind, können für die Analyse der Lagerungszeit nur die Baselinemessungen verwendet werden. Dabei wurde keine statistisch signifikante Korrelation zwischen Lagerungszeit und den Baselinewerten beobachtet.

Der  $t$ -Test für unabhängige Stichproben zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $t(41) = 0,0108$ ;  $p = 0,9914$ ) zwischen den Werten der ersten Messreihe ( $M = 928,15$ ;  $SD = 510,99$ ) und der zweiten Messreihe ( $M = 929,82$ ;  $SD = 503,96$ ). Die Nullhypothese, dass keine Unterschiede zwischen den beiden Populationen bestehen, wird daher beibehalten. Der Median der Baselinewerte der älteren Proben lag bei 892 pg/ml OT im Plasma, die neueren Proben hatten im Median 754 pg/ml OT im Plasma.



(a) Scatterplot der ELISA-Messwerte gegen die Lagerungszeit



(b) Scatterplot der Ränge der ELISA-Messwerte gegen die Lagerungszeit

Abbildung 5.8: Illustration der Rangkorrelation zwischen Lagerungszeit und dem gemessenen OT-Wert der Baselinemessung. Die Rangkorrelation nach Kendal beträgt  $\tau = -0.013$ ;  $p = 0.900$ .

# Kapitel 6

## Diskussion

Um aussagekräftige OT-Messwerte zu erhalten ist es wichtig, dass die Analysemethode zur OT-Bestimmung valide und zuverlässig ist. Diese Arbeit beantwortet die Frage, ob der RIA, durchgeführt im Labor RIAGnosis München, und der ELISA der Firma Enzo Life Science, die gleiche Interpretation der OT-Werte zulassen. In Kapitel 6.1 wird diskutiert, inwiefern der Studienaufbau aus Kapitel 4.2 geeignet ist, um einen repräsentativen Methodenvergleich durchführen zu können. Die Ergebnisse aus Kapitel 5 werden in Kapitel 6.2 detailliert betrachtet. Daran anschließend zeigt Kapitel 6.3 die Grenzen der Studie auf. Kapitel 6.4 schließt mit einem Ausblick auf ein weiteres Vorgehen und mögliche anschließende Studien.

### 6.1 Studienaufbau

Die Auswahl der Testpersonen erfolgte in Anlehnung an die anderen Teilstudien des Projekts, in denen Untersuchungen über die Schwankungen des Blutplasma-OT-Wertes bei gesunden Probandinnen und Borderlinepatientinnen untersucht werden. In dieser Arbeit wurden nur die Proben der gesunden weiblichen Kontrollgruppe untersucht, um mögliche Störfaktoren durch psychische Erkrankungen auszuschließen. Die Testung von männlichen Probanden wäre einfacher gewesen, da man hier nicht auf Zyklus-abhängige Testungstage angewiesen wäre, sondern jeden Tag testen könnte. Zur Vermeidung von zirkadianen Schwankungen des OT wurden alle Probandinnen zu einem fest definierten Zeitpunkt morgens um 8.30 Uhr getestet. Um sicher zu stellen, dass die Probandinnen psychisch sowie körperlich gesund sind, wurde vor der Testung ein Telefoninterview mit standardisierten psychologischen Fragebögen durchgeführt. Es wurde dabei strukturiert und einheitlich nach einem festen Ablaufprotokoll (s. Kapitel 4.2) verfahren. Das Ablaufprotokoll orientierte sich dabei an früheren Studien der Arbeitsgruppe (Jobst et al. 2014, 2016).

Aufgrund der hohen interpersonellen Schwankungen von Plasma-OT werden meist nicht einzelne Messwerte verglichen, sondern es wird der zeitliche Verlauf des OT-Spiegels unter bestimmten äußeren Reizen untersucht. Um Reaktionen in der OT-Ausschüttung zu provozieren, konnten andere Studien (Ditzen et al. 2008, Heinrichs et al. 2003) zeigen, dass Probanden mit einer veränderten OT-Ausschüttung reagieren, wenn sie in eine emotional stressauslösende Situation versetzt werden. Die Ausschlussituation im *Cyberball-Paradigma* stellt solch eine emotional belastende Situation dar (Williams & Jarvis 2006). Gemäß der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen Social Reconnection Hypothese reagieren die Testpersonen auf die Ostrazismuserfahrung während des *Cyberball-Paradigmas* mit prosozialem Verhalten. Eine messbare Veränderung des OT-Spiegels während des Versuchsverlaufs stellt daher die erwartete physiologische Reaktion dar. Dieser Effekt wurde durch die Analyse mittels des RIA bestätigt. Die Analyse der Kurvenverläufe in Kapitel 5.3 zeigt im Vergleich zur Baselinemessung einen starken Anstieg des OT-Levels während der Ausschlusserfahrung zu Messzeitpunkt 2 (partieller Ausschluss) und 3 (kompletter Ausschluss). Nach Ende des *Cyberball-Paradigmas* kann eine Regression des OT-Levels zum Ausgangswert beobachtet werden. Die statistische Analyse in Kapitel 5.5.2 zeigt auch nach der Korrektur des Signifikanzniveaus für Mehrfachtestungen signifikante Unterschiede zwischen der Baselinemessung und dem Messzeitpunkt 2 ( $p = 0,004$ ) sowie zwischen der Baseline und Messpunkt 3 ( $p = 0,037$ ). Unkorrigiert gäbe es noch einen signifikanten Unterschied zwischen Messzeitpunkt 2 und 4 mit  $p = 0,013$ . Vorhergehende Studien der Arbeitsgruppe konnten einen ähnlichen Verlauf der OT-Werte während des *Cyberball-Paradigmas* beobachten (Jobst et al. 2014, 2016).

Die Auswahl der verwendeten Messmethoden beruht auf den zur Zeit einzigen verbreiteten Analysemethoden zur Bestimmung von OT aus dem Plasma, RIA und ELISA. Einige Studien (Landgraf & Neumann 2004, Neumann & Landgraf 2012) befürchten, dass die zentralen Effekte von OT bei der Untersuchung des Plasmas nicht aussagekräftig genug abgebildet werden könnten. Als Begründung für diese Aussage führen die Autoren eine unzureichende Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durch OT an und empfehlen daher die Untersuchung mittels Mikrodialyse oder Liquor. Da die Studie ausschließlich menschliche Probandinnen umfasst, sind solch invasive Untersuchungsmethoden ethisch nicht vertretbar. Cyranowski et al. (2008) und Goldman et al. (2008) bestätigen diese Auffassung der OT-Messung im Plasma bei menschlichen Testpersonen. Zur genau getakteten OT-Messung und somit einem engen zeitlichen Abnahmeintervall eignet sich die Blutabnahme, und somit die Bestimmung der Werte aus dem Plasma, am besten. Andere Studien konnten bereits zeigen, dass sich zentrale OT-Prozesse im Plasma abbilden lassen

(Kéri & Kiss 2011, Pierrehumbert et al. 2010). Das Ziel des Forschungsprojektes, unter dem diese Arbeit angesiedelt ist, ist ein besseres Verständnis der psychischen Erkrankungen bei Borderline-Störung und chronischer Depression, welche langfristig zur Verbesserung von Therapiemöglichkeiten führen sollen. Zur Verlaufskontrolle von Therapiemöglichkeiten eignet sich die Blutabnahme als minimalinvasive Maßnahme am besten. Daher ist es von Vorteil, wenn schon die Forschungsergebnisse mit der gleichen Methode erhoben werden, die später gegebenenfalls routinemäßig in der Klinik erfolgt.

## 6.2 Ergebnisse des Methodenvergleichs

### 6.2.1 Vergleich der Absolutwerte

Auf Basis der unterschiedlichen Größenverhältnisse zwischen den Messwerten, die durch RIA und ELISA bestimmt wurden, zeigt sich deutlich, dass ein direkter Vergleich nicht möglich ist. Zudem bestehen laut dem in Kapitel 5.1.1 durchgeführten *t*-Test für gepaarte Stichproben signifikante Unterschiede zwischen den mittels ELISA und RIA gewonnenen Messwerten zu allen Messzeitpunkten.

Die unterschiedlichen Größenverhältnisse lassen sich auf verschiedene Ansätze der Durchführung der Messmethoden zurück führen. Hier stehen sich zwei gegensätzliche Denkansätze in der Durchführung und Verarbeitung der Proben gegenüber, die Durchführung mit und ohne Extraktion. Bei der Durchführung mit Extraktion geht man davon aus, dass das Plasma von inaktiven und fragmentierten OT-Molekülen gereinigt werden muss, um eine realistische Abbildung der aktiven und komplett funktionstüchtigen OT-Moleküle zu erhalten. Die Studienlage zeigt (s. Kapitel 3.7), dass die Extraktion für die Durchführung der RIA essentiell ist. Die Ergebnisse lassen sich reproduzieren und befinden sich in unabhängigen Studien in ähnlichen Größenintervallen, während dies beim ELISA nicht gegeben ist. Daran schließt sich die Überlegung an, ob die Werte, die durch den ELISA gemessen wurden plausibel sind. Leng & Sabatier (2016) halten OT-Werte im Bereich von 1000 pg/ml für nicht realistisch. Sie begründen diese Überlegung damit, dass die Halbwertszeit von OT im menschlichen Blut 2 min beträgt (Cool & DeBrosse 2003). Dieses Argument passt zu der Überlegung, dass im nicht extrahierten Versuchsansatz viele inaktive und fragmentierte Molekülbestandteile und Epitope mitgemessen werden, die keinerlei biochemische Relevanz mehr besitzen. Das Handbuch der Firma Enzo Life Science schreibt daher eine Verdünnung der Proben in Anlehnung an die Standardkurve vor. Die Standardkurve dient dazu das Markersignal zu quantifizieren und den validen

Bereich festzulegen, in dem die Messwerte bevorzugt gemessen werden sollten. Außerhalb dieses Bereichs steigt die Fehlerrate sehr stark an, da die Werte nicht mehr interpoliert sondern extrapoliert werden (Wild & Sheehan 2013). Eine Verdünnungsreihe auf Grundlage der Standardkurve durchzuführen bedeutet aufgrund der großen interpersonellen Schwankungen und den vielen verschiedenen Verdünnungsschritten einen hohen Verlust an Probenmaterial. Durch die unterschiedliche Verdünnungsrate und unterschiedliche Vorgehensweisen wird die Vergleichbarkeit des ELISA zwischen unterschiedlichen Laboratorien eingeschränkt. Jedes Labor erstellt nach seinen internen Standards eine Verdünnung für die Analyse, die im Endeffekt zu unterschiedlichen Messwerten und Größenverhältnissen führen kann.

Die Ermittlung der Korrelation zwischen ELISA und RIA-Werten in Kapitel 5.1.2 führt ebenfalls zu einem negativen Ergebnis, da kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Werten der beiden Messmethoden ermittelt werden konnte. Zudem zeigt Kapitel 5.1.3, dass keine statistisch signifikante Rangkorrelation zwischen den durch RIA und den durch ELISA gemessenen Werten existiert und somit auch keine nichtlinearen Zusammenhänge ermittelt werden konnten. Dies ist ein deutliches Signal, dass die Vergleichbarkeit der Messwerte eingeschränkt ist, wie schon McCullough et al. (2013), Szeto et al. (2011), Robinson et al. (2014) und Leng & Sabatier (2016) postulieren. Es zeigen sich hohe interpersonelle Schwankungen in den mittels ELISA analysierten Proben, sowie eine hohe intrapersonelle Konsistenz bei ELISA und RIA. Die RIA-Messwerte zeigen eine starke Korrelation mit einem starken Effekt nach Cohen zwischen den Messzeitpunkten 2 und 3, aber keine signifikante Korrelation zwischen Messzeitpunkt 2 und den Ruhemeszeitpunkten 4 und 5. Bei den mit ELISA analysierten Proben zeigt sich zwischen allen Messzeitpunkten und allen darauf folgenden Messzeitpunkten, eine statistisch signifikante Korrelation mit einer mittleren bis starken Effektstärke nach Cohen. Die Schlussfolgerung daraus lautet, dass die RIA sensitiver reagiert und die Schwankungen innerhalb des Versuchs detaillierter abbilden kann. Dies spricht wiederum für die Extraktion und gegen das beim ELISA angewandte Verdünnungsverfahren. Die noch im Blut vorhandenen inaktiven OT-Moleküle werden wahrscheinlich fälschlicherweise als aktive und biochemisch relevante Metabolite gemessen. Es lässt sich auch die Grundhypothese der übergeordneten Studie verifizieren, dass ein partieller und kompletter Ausschluss bei gesunden Probandinnen zu einem OT-Anstieg führt. Dies entspricht der eingangs erwähnten, und in Kapitel 2.4.3 beschriebenen, Social Reconnection Hypothese. Des Weiteren zeigt sich die Annahme bestätigt, dass sich durch ein emotional belastendes Erlebnis hervorgerufene OT-Veränderung im Blut sichtbar zeigen und nicht nur auf das Gehirn beschränkt sind.

### 6.2.2 Vergleich nach Normalisierung der Messwerte

Aufgrund der unterschiedlichen Größenordnungen vor der Normalisierung zeigte der  $t$ -Test für gepaarte Stichproben signifikante Unterschiede. Nach der in Kapitel 5.2 beschriebenen Normalisierung wurde diesmal der Wilcoxon-Rang-Vorzeichen-Test als nicht parametrische Alternative zum  $t$ -Test durchgeführt. Die Ergebnisse für die normalisierten Werte zu den Messzeitpunkten 4 und 5 weisen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den RIA- und ELISA-Werten auf. Jedoch zeigen sich signifikante Unterschiede in den Messungen 2 und 3 und somit wird die Nullhypothese, dass die Differenzen zwischen den jeweiligen Messwerten gleichmäßig um 0 verteilt seien, verworfen. Auch nach Normalisierung der Messwerte ist somit eine essenzielle Voraussetzung für die Äquivalenz der verglichenen Messmethoden verletzt.

Der Konkordanz-Korrelationskoeffizient sowie Bland-Altman-Plots sind zwei etablierte Verfahren für Methodenvergleiche in der Medizin (Carstensen 2011, Koch & Spörl 2007). Aufgrund der großen Diskrepanz der absoluten Messwerte sind diese Verfahren nicht direkt anwendbar, weshalb eine Normierung durchgeführt wurde. Die Normierung ist sinnvoll, weil einerseits innerhalb eines Assaytyps zwischen verschiedenen Laboratorien keine Vergleichbarkeit vorliegt und andererseits der Kurvenverlauf sowie die relativen Veränderungen von OT interessant sind.

Kapitel 5.2.2 zeigt die Bland-Altman-Plots für alle normierten Messwerte. Dabei wird deutlich sichtbar, dass die Schwankungsbreite der Werte über 400% beträgt, wobei die Schwankungsbreite bei den Messzeitpunkten 2 und 3 am höchsten ist. Dies liegt, wie in Kapitel 6.2.1, ausführlich diskutiert an der unterschiedlichen Sensitivität der beiden Messmethoden. Daraus lässt sich ableiten, dass die Messwerte klinisch und forschungstechnisch zu unterschiedlich sind, als dass die beiden Methoden untereinander austauschbar wären.

Auch der in Kapitel 5.2.1 berechnete Konkordanz-Korrelationskoeffizient zeigt, nach allen gängigen Standards, eine schlechte Übereinstimmung zwischen den untersuchten Messmethoden. Normalerweise würde der Methodenvergleich hier enden, da an dieser Stelle ein eindeutiges Ergebnis steht. Um zu sehen, ob die beiden Messverfahren in sich plausible Werte gemessen haben und die Interpretation der Ergebnisse den gleichen Schluss zulässt, wurde in Kapitel 5.5 eine Fallstudie durchgeführt, die aufzeigt zu welchen unterschiedlichen Ergebnissen die beiden Messmethoden bei der Studiendurchführung kommen.

### 6.2.3 Vergleich der Kurvenverläufe

Der in Kapitel 5.3 durchgeführte Vergleich der gemittelten Verlaufskurven bietet zwar kein statistisches Maß, zeigt dafür in Abbildung 5.4 jedoch optisch deutlich auf, dass die gewonnenen Messwerte unterschiedliche Schlüsse zulassen. Die Veränderungen der gemittelten Verlaufskurven stehen zueinander im Gegensatz, so dass die Verlaufskurve des ELISA eine Abnahme des gemessenen OT-Wertes an den Stellen zeigt, an denen die Verlaufskurve des RIA einen Anstieg ausweist.

### 6.2.4 Qualitativer Vergleich

Auch beim qualitativen Vergleich in Kapitel 5.4 zeigen sich unterschiedliche Tendenzen im Verhalten der Kurvenverläufe. Beide Methoden sind sich nicht über die Tendenz *steigend*, *fallend* oder *gleichbleibend* zwischen zwei Messzeitpunkten einig. Es kann darüber diskutiert werden, ob die Bereiche adäquat gewählt wurden. Der Bereich von 10% relativer Schwankung als gleichbleibende Tendenz wurde großzügig gewählt, jedoch lässt dieser Bereich immer noch die Abbildung signifikanter Schwankungen zu. Die meisten Tendenzaussagen fallen bei beiden Messmethoden in eine der anderen Kategorien.

### 6.2.5 Ergebnisgleichheit

Die Konsequenzen aus den Eigenschaften der beiden Messmethoden treten in der Fallstudie in Erscheinung. Wie in Kapitel 6.1 angesprochen zeigen die RIA-Messwerte signifikante Unterschiede zwischen der Baseline-Messung und den Ausschlusszeitpunkten. Beide Unterschiede zeigen starke Effekte nach Cohen. Die mittels RIA gewonnenen Messwerte führen daher in dieser Studie zu einer Bestätigung der Social Reconnection Hypothese, wonach gesunde Probanden auf soziale Ausschlusserfahrungen mit prosozialem Verhalten reagieren. Dieses manifestiert sich auch in dem gemessenen Anstieg des OT-Levels. Vorausgegangene Studien konnten den gleichen Effekt beobachten (Jobst et al. 2014, 2016).

Bei den Messwerten, die durch ELISA gemessen wurden, zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Baseline-Messung und den anderen Messzeitpunkten. Wissenschaftlich führen diese beiden Methoden daher zu unterschiedlichen Interpretationen des vorliegenden Probenmaterials.

### 6.2.6 Bewertung

Mehrere Studien weisen auf die Gültigkeit der Social Reconnection Hypothese hin (Williams et al. 2000, Maner et al. 2007, Jobst et al. 2014, 2016). Bei den untersuchten Proben zeigen die mittels RIA erhobenen Messwerte ebenfalls das gemäß Social Reconnection Hypothese erwartete Bild. Die mittels des ELISA (Enzo Life-Science) erfassten Messwerte zeigen in dieser Studie jedoch kein mit den durch RIA gemessenen Werten übereinstimmendes Ergebnis und entsprechen auch nicht den Ergebnissen der Vorversuche. Abweichungen im Studienaufbau eignen sich in Anbetracht der RIA-Ergebnisse nicht zur Erklärung der Unterschiede. Der ELISA wurde unter den gleichen Bedingungen im selben Labor wie zuvor durchgeführt. Daher liegt der Schluss nahe, dass der ELISA nicht robust bei wiederholter Durchführung ist und stärker auf externe Einflüsse reagiert, die außerhalb der Einflussmöglichkeiten des Labors und der Studienleitung liegen. Um solche unerwünschten und unkontrollierbaren Kreuzreaktionen auszuschließen wird daher beim RIA eine Extraktion durchgeführt, sodass in diesem Versuch mit der RIA valide Ergebnisse erzielt werden konnten.

Für die Durchführung weiterer Studien kann daher für den ELISA der Firma Enzo Life-Science keine Empfehlung ausgesprochen werden. Auch nach Wahl eines anderen ELISA-Kits sollte dessen Validität in der Etablierungsphase des Studienvorgehens zunächst durch eine anerkannte Referenzmethode, wie der RIA, überprüft werden. Für Studien mit einer erwartungsgemäß eher geringen Anzahl an Proben und Versuchspersonen bietet sich daher die Option an, die Messwerte in einem Referenzlabor bestimmen zu lassen.

## 6.3 Grenzen der Studie

Viel diskutiert in Forschungskreisen ist die Tatsache, ob die Gewinnung von OT aus dem Plasma zentrale Vorgänge im Gehirn abbilden kann (Landgraf & Neumann 2004, Neumann & Landgraf 2012). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass zentrale und periphere OT Ausschüttung zum einen synchron stattfinden, zum anderen zentrale und periphere OT Konzentrationen miteinander korrelieren (Neumann 2008, Carter 2014). Zudem ist die Blutabnahme die einzig mögliche Art zur Gewinnung von Probenmaterial für den vorgestellten Studienablauf. Invasive Maßnahmen, wie die Liquorpunktion oder die Mikrodialyse, sind in menschlichen Studien ethisch kaum vertretbar. Andere nicht invasive Arten der Gewinnung, wie z.B. aus dem Speichel (Carter et al. 2007) oder Urin, sind weniger gut untersucht als die Analyse von Plasma-OT. Zudem sind diese Arten der Gewinnung ebenfalls ungeeignet für den beschriebenen Versuchsaufbau (s. Kapitel 4).

Als möglicher Kritikpunkt der statistischen Berechnungen kann die geringe Probandenzahl angeführt werden. Aufgrund der starken Effekte kann die Auswertung aber trotzdem als aussagekräftig angesehen werden. Vor dem Hintergrund eine Fallanalyse durchzuführen, die zwei typische Studien, welche sich nur durch die Wahl des Assaytypen unterscheiden, vergleicht, ist die Probandenzahl ebenfalls repräsentativ.

Eine einheitliche präanalytische Behandlung der Proben ist wichtig, um zusätzliche Störfaktoren für die Analyse auszuschließen (Lippi et al. 2006). In dieser Studie besteht die ungleiche präanalytische Behandlung der Proben in einer unterschiedlich langen Lagerungszeit. Robertson et al. (1973) haben einen Effekt von langer Lagerungszeit auf den Abbau von Hormonen aufgezeigt. Aus technischen und logistischen Gründen wurden die für den Vergleich in dieser Arbeit benutzten ELISA-Proben 420 bis 515 Tage gelagert. Der Median liegt bei 497 Tagen. Mittels RIA wurden die Proben bereits nach 99 bis 194 Tagen analysiert, der Median lag bei 175,5 Tagen. Dieser Effekt wurde in Kapitel 5.6 untersucht. Dabei trat keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Lagerungszeit und den Baselinemessungen zu Tage. Da alle anderen Messwerte durch das Cyberball-Paradigma beeinflusst sind, können für die Analyse der Lagerungszeit nur die Baselinemessungen verwendet werden. Ein *t*-Test für unabhängige Stichproben zeigt zudem keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Messwerten der länger gelagerten Messreihe und denen der kürzer gelagerten Messreihe. Die Ergebnisse von Robertson et al. (1973) beziehen sich auf eine Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ , die Proben dieser Studie wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Ein weiterer Unterschied im präanalytischen Vorgehen besteht im Zusatz von Aprotinin zu den Blutproben, die mittels ELISA bestimmt wurden (s. Kapitel 4.2.4). Emeny et al. (2015) befürchten, dass OT *in vitro* von Serin-Proteasen abgebaut wird und durch Aprotinin als ein Serin-Protease-Inhibitor stabilisiert werden müsse. Eventuell könnte dies ein weiterer Faktor für die unterschiedlich hohen Messwerte sein. Um dies genauer zu evaluieren, könnten sich weitere Untersuchungen anschließen, um den Einfluss von Aprotinin zu klären.

In dieser Arbeit wird ein bestimmtes ELISA-Kit der Firma Enzo Life Science mit dem RIA von RIAGnosis München verglichen. Da es vielfältige Kits von verschiedenen Firmen auf dem Markt gibt, ist eine Verallgemeinerung, welches Messverfahren das universell validere und reliablere Verfahren ist, nicht möglich. Wie in Kapitel 3.7 ausgeführt, kommen die meisten aktuellen Studien zu dem Schluss, dass der ELISA ohne Extraktion zur OT-Messung aus Plasma nicht geeignet ist. Es werden unrealistisch hohe Werte gemessen (Leng & Sabatier 2016, McCullough et al. 2013, Szeto et al. 2011). Diese Arbeit zeigt, dass zumindest der ELISA von Enzo Life Science nicht vergleichbar mit den durch RIA ermittelten Plasma-OT Werten ist.

## 6.4 Ausblick

Anschließend an diese Studie bietet sich ein Vergleich mit einem ELISA einer anderen Firma an, wie z.B. dem ELISA-Kit von Assay Designs, Ann Arbor, Michigan/USA. Es wäre interessant zu untersuchen, ob man damit zu dem gleichen Ergebnis kommen würde wie in dieser Arbeit. In diesem Zusammenhang wäre es sinnvoll einen weiteren Vergleich zwischen extrahierten Proben und nicht extrahierten Proben anzustellen, die beide mit Hilfe eines ELISA analysiert werden.

Zusätzlich ist die Erarbeitung eines einheitlichen Protokolls zur Präanalytik ein weiterer Schritt. Dies betrifft zum einen die Untersuchung der tatsächlichen Haltbarkeit von OT-Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ein weiterer zu untersuchender Punkt, wäre der tatsächliche Einfluss von Aprotinin auf die Haltbarkeit von Plasma-OT, da sich hierzu in der Literatur unterschiedliche Angaben finden.



# Kapitel 7

## Zusammenfassung und Fazit

In den vergangenen Jahren ist die Forschung um OT immer populärer geworden. Es spielt auf biochemischer Ebene bei vielen verschiedenen sozialen Interaktionen und Verhaltensweise eine wichtige Rolle und beeinflusst maßgeblich das menschliche Verhalten in sozialen Gruppen und in sozialen Interaktionen. Entsprechend haben Störungen des OT-Regelkreislaufs Auswirkungen auf die psychische sowie physische Gesundheit.

Bei psychischen Erkrankungen spielt OT für die Regulation von interpersonellem Erleben und Verhalten eine große Rolle. Eine Möglichkeit Veränderungen im endogenen Oxytocinsystem bei Menschen zu erfassen ist die Bestimmung des Oxytocin-gehaltes im Blutplasma. Die Bestimmung des OT-Gehalts aus dem Plasma bildet im Hinblick auf eventuelle Anwendungen in der klinischen Praxis den besten Kompromiss aus Validität und möglichst geringer Invasivität der Probengewinnung. In dieser Arbeit wurden daher die zwei gängigsten Analysemethoden zur OT-Bestimmung aus dem menschlichen Blutplasma getestet und miteinander verglichen. Es handelt sich dabei um RIA mit vorgeschalteter Extraktion sowie ELISA ohne Extraktion. Die Absolutwerte spielten dabei für die Auswertung eine untergeordnete Rolle. Wichtig für den Vergleich war stattdessen, ob die Veränderung über die Zeit, ausgedrückt als die relativen Veränderungen zu einem individuellen Baselinewert, die gleichen Schlussfolgerungen und Interpretationsmöglichkeiten bieten.

Im Verlauf dieser Arbeit zeigte sich, dass dies nicht der Fall ist und die beiden Methoden nicht miteinander vergleichbar sind. Wie in Kapitel 5 beschrieben liegen zwischen den mittels beider Analysemethoden gewonnenen Absolutwerten Unterschiede von zwei bis drei Größenordnungen. Beim Vergleich der relativen Verlaufsveränderungen mittels des Konkordanz-Korrelationskoeffizienten und mittels Bland-Altman-Plots zeigen sich ebenfalls Ergebnisse, die gegen eine klinische Äquivalenz der Methoden sprechen. Der Konkordanz-Korrelationskoeffizient betrug im

Maximum lediglich 0,3452. Für die klinische Vergleichbarkeit sind jedoch Werte von 0,9 oder noch höher gefordert. Auch die durch die Bland-Altman-Plots aufgezeigte Schwankungsbreite von bis zu 400% des Ausgangswertes weist nicht auf eine Austauschbarkeit der beiden Analysemethoden hin. In der durchgeführten Fallstudie, bei der untersucht wurde, ob bei Anwendung der beiden Messmethoden für das gleiche Probenmaterial die gleichen wissenschaftlichen Schlüsse gezogen werden können, zeigten sich ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse. Unter Anwendung des RIA konnte ein statistisch signifikanter starker Effekt gezeigt werden, der der erwarteten physiologischen Reaktion entspricht. Unter Anwendung des ELISA zeigte sich dagegen kein statistisch signifikanter Effekt.

Als Fazit steht die Erkenntnis, dass die beiden verglichenen Methoden für wissenschaftliche Studien nicht austauschbar sind. Die vorliegenden Ergebnisse folgen der vorherrschenden Meinung der Forschungsgemeinschaft, dass der RIA mit vorheriger Extraktion die geeignetere Messmethode für die OT-Messung aus dem Plasma ist (s. Kapitel 3.7). Da die Durchführung des RIA spezieller Laborausrüstung und der Einhaltung von höheren Sicherheitsstandards bedarf, wird der ELISA von einigen Forschungsgruppen als attraktive Alternative betrachtet. Der Antikörper wird enzymmarkiert und kann dadurch von jedem in Labortechniken ausgebildeten Mitarbeiter durchgeführt werden. Für den RIA wird aufgrund der radioaktiven Bestandteile spezielle Laborausrüstung benötigt und es wird radioaktiver Abfall produziert, der unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen entsorgt werden muss. Zusätzlich ist eine lange Lagerung der Isotopen nicht möglich und deshalb eine zeitnahe und häufige Durchführung des RIAs essentiell. Eine sinnvolle Alternative könnte daher die Durchführung eines ELISAs mit vorheriger Extraktion sein. Hierbei existiert die Gefahr, dass die Messwerte nach der Extraktion geringer ausfallen als der kleinste, zur Bestimmung der Kalibrationskurve des ELISAs verwendete, Kalibrator. So liegen in diesem Experiment alle mit der RIA bestimmten OT-Werte unterhalb des 15,63 pg/ml Kalibrators. Somit ergäbe sich bei einer Extraktion voraussichtlich die Problematik der Extrapolation außerhalb der Kalibrationskurve am unteren Ende des Messbereichs, was mit großer mathematischer Unsicherheit behaftet und deswegen nicht empfohlen ist. Aus den genannten Gründen ist die RIA daher weiter als Referenzmethode zu betrachten.

# Veröffentlichungen

## *Poster*

Research Festival 07/2017 in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Ludwig-Maximilians-Universität

“Verlauf von Plasma Oxytocin in einem sozialen Ausschlussparadigma bei gesunden Probanden - Vergleich zweier methodischer Ansätze zur Bestimmung von Oxytocin”.  
Hannah Windmüller, Julia Dewald-Kaufmann, Torsten Wüstenberg, Nina Sarubin, Peter Falkei, Peter Zill, Karin Neumeier, Frank Padberg, Andrea Jobst

## *Artikel*

Teilergebnisse dieser Arbeit werden für eine Publikation verwendet. Das Manuskript wurde vom “Journal of Personality Disorders” angenommen und wird demnächst veröffentlicht:

“Sequential social exclusion in a novel Cyberball paradigm leads to reduced behavioral repair and plasma oxytocin in borderline personality disorder”.

Matthias Reinhard, Barbara Barton, Lisa Brandl, Andre Brunoni, Julia Dewald-Kaufmann, Fabiana Fernandes, Stephan Goerigk, Richard Musil, Hannah Windmüller, Torsten Wüstenberg, Adima Zülch, Frank Padberg, Andrea Jobst



# Anhang A

## Weitere Fragebögen

Im Laufe der Versuchsdurchführung wurden, neben den in Kapitel 4.2.2 erwähnten Fragebögen, weitere Fragebögen aus der Psychologie und Psychiatrie erhoben. Die per Post an die Probandin verschickten Fragebögen (Kapitel A.1) fragen das Beziehungsnetzwerk, kindliche Erfahrungen und Traumata sowie Mobbing-Erfahrungen, Resilienz und Borderline-Symptomatik ab. Sie zielen darauf ab herauszufinden, ob es Zusammenhänge zwischen dem Verhalten als Erwachsene in einer sozialen Ausschlussituation und Erfahrungen im Beziehungsbereich als Kind und Jugendliche gibt. Die Fragebögen, die vor und nach dem Paradigma beantwortet werden ((Kapitel A.2)), zielen darauf ab die Anspannung sowie die Gefühle vor und nach dem Ausschluss zu erfassen. Dabei ist wichtig, ob es Unterschiede im Befinden der Probandin gibt und wie sie hinterher mit der Situation umgeht. Die Auswertung und Interpretation der Fragebögen erfolgt in anderen Teilprojekten der Studie, aus diesem Grund werden die Fragebögen hier nur zur Übersicht erwähnt.

### A.1 Verschickte Fragebögen

#### **RSQ: Rejection sensitivity questionnaire**

Hier wird das individuelle Level der Sensibilität auf Ablehnung gemessen, dabei werden 20 Items abgefragt (Downey & Feldman 1996). Der Test besitzt eine hohe interne Konsistenz sowie eine hohe Retest-Validität .

#### **BIS-11: Barratt-Impulsivenes**

Bei diesem Fragebogen (Barratt 1994) wird die Impulsivität abgefragt, die häufig mit schnellem unüberlegten Handeln sowie Missachtung, der daraus resultierenden Konsequenzen einhergeht. Das BIS-11 ist das am meisten benutzte Messinstrument um Impulsivität zu erfassen, sowie um die Beziehung zu anderen klinischen Phänomenen darzustellen.

**UCLA Loneliness Scale**

Dieser Fragebogen (Russell 1996) wurde entwickelt um subjektive Gefühle von Einsamkeit, emotionaler Isolation sowie sozialer Isolation zu erfassen. Es werden 20, meist negativ formulierte, Aussagen bewertet, die erfassen sollen ob die Probandin diese Gefühle schon erlebt hat. Der Fragebogen weist eine hohe Retest-Validität sowie interne Konsistenz. Er ist der meisten benutzte Fragebogen weltweit um Einsamkeit zu erfassen.

**Bulling/Peer Group**

Dieser Fragebogen wurde von einer Arbeitsgruppe der Universität Bielefeld entwickelt, da es kein geeignetes Messinstrument gab, um sozialen Ausschluss in der Kindheit und Jugend retrospektiv abzufragen (Sansen et al. 2013). Die psychometrischen Eigenschaften wurden in einer Internetumfrage getestet und die Konstruktvalidität wurde bestätigt.

**CTQ: Childhood Trauma Questionnaire**

Hier werden traumatische Kindheitserfahrungen in Bezug auf Vernachlässigung und Misshandlung retrospektiv abgefragt. Die deutsche Kurzversion (Klinitzke et al. 2012) besteht aus 28 Items, in dieser Studie wurden 31 Items verwendet. Der Fragebogen zeigt eine hohe interne Konsistenz und Konstruktvalidität, enthält allerdings einige Schwächen auf der Skala für körperliche Vernachlässigung.

**Social Network Index**

Dieser Fragebogen (Cohen et al. 1997) beschäftigt sich mit zwölf verschiedenen Arten von Beziehungen zu den Mitmenschen der Probandin. Es handelt sich dabei sowohl im innerfamiliäre Beziehungen sowie Beziehungen im sozialen als auch professionellen Umfeld. Besonders die Intensität und die Kontaktintensität wird abgefragt.

**NEO-FFI**

Dieser Fragebogen (Costa et al. 1989) bildet individuelle Unterschiede zu robusten Persönlichkeitsfaktoren ab, die aufgrund des Fünf-Faktoren-Modells entstehen. Dazu zählen Neurotizismus, Extraversion, Offenheit für neue Erfahrung, Verträglichkeit und Gewissenhaftigkeit. Er besteht aus 60 Fragen, wobei jedem Merkmal zwölf Fragen zugeordnet werden.

**CD-Risk Resilience Skala: The Connor-Davidson Resilience Scale**

Dieses Instrument (Connor & Davidson 2003) dient dazu die Resilienz abzubilden. Es besteht aus 25 Items. Er weist eine hohe Validität, Reliabilität sowie gute psychometrische Faktoren auf. Der Fragebogen kann auch eingesetzt werden um Therapieerfolge zu untersuchen.

**BSL: Borderline-Symptom-Liste**

Nach heutigem Stand der Forschung existieren valide und reliable Testinstrumente,

um eine emotional-instabile Persönlichkeitsstörung vom Borderline-Typ hinreichend zu diagnostizieren. Jedoch fehlen verlässliche Messinstrumente, um die Schwere der Erkrankung zu klassifizieren. Die BSL (Bohus et al. 2001) erfasst 23 Items, eine Analogskala in Prozent zur visuellen Verdeutlichung des momentanen Befindens sowie einen Ergänzungsbogen mit 11 Items zur Klassifikation des Schweregrades.

## A.2 Fragebögen während der Testung

### **Emotion Scale**

Die Emotion Scale (Gross & Levenson 1995) erfasst die momentane Gefühlslage der Probandin anhand 15 Items, die verschiedene Emotionen repräsentieren. Dieser Fragebogen wird unmittelbar vor dem Cyberball-Spiel und direkt im Anschluss abgefragt.

### **Assessment of Inner Tension**

Hier wird die innere Anspannung in Prozent als einziges Item abgefragt. Dieser Fragebogen (Staebler et al. 2011) wird unmittelbar vor und nach dem Cyberball-Spiel abgefragt.

### **NTQ: Needs-Threats-Questionnaire**

Dieser Fragebogen (Williams et al. 2000) wurde speziell für das Cyberball-Paradigma entwickelt, um die Gefühle während des Spiels und somit des sozialen Ausschlusses zu erfassen. Er besteht aus 23 Items, die sich auf die Gedanken während des Spiels beziehen. Als Anhang enthält er noch einen Freitext mit der Frage, was die Probandin aus ihrer jetzigen Gefühlslage am ehesten machen möchte. Dieser Fragebogen wird direkt im Anschluss an das Paradigma ausgefüllt.

### **Questionnaire on Behavioural Intentions**

Dieser Fragebogen (Staebler et al. 2011) dient zur Erfassung von Verhaltensinterpretationen. Es handelt sich um eine Liste von 21 Items gefolgt von einem Freitextfeld. Die Probandin wird gebeten alles ankreuzen, was sie gerne in ihrer momentanen Stimmung erleben möchten. Dieser Fragebogen wird direkt nach dem Paradigma erfasst.

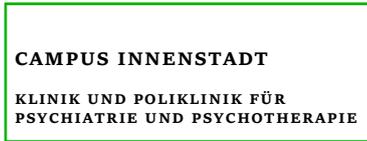


# Anhang B

## Probandenkommunikation

Auf den nachfolgenden Seiten werden die zur Kommunikation mit den Probandinnen verwendeten Dokumente wiedergegeben. Dies sind:

- Der zur Rekrutierung der Probandinnen verwendete Aushang (Anhang B.1)
- Die Probandeninformation (Anhang B.2)
- Die Einverständniserklärung (Anhang B.3)
- Die Einverständniserklärung zum Datenschutz (Anhang B.4)



# Probanden gesucht!

Für unsere Doktorarbeit, die wir in der Sektion Psychosomatische Medizin und Psychotherapie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchführen, suchen wir Probanden für unsere Kontrollgruppe.

(w, 18 – 35 Jahre alt)



Als Aufwandsentschädigung erhaltet Ihr **60€!**

## Was müsst Ihr dafür tun?

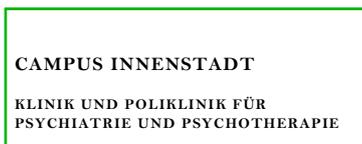
Die Studie besteht aus drei Teilen:

1. Wir führen ein kurzes Telefoninterview mit Euch durch.
2. Wir schicken Euch einige Fragebögen zu, die Ihr zu Hause ausfüllt.
3. Ihr spielt ein Computerspiel, während dessen wir Euch Blut abnehmen.

Lust mitzumachen?  
Habt Ihr noch Fragen?

Meldet Euch einfach bei uns ✍

Adima, Lisa, Fabiana + Hannah: [studie.psychiatrie@gmail.com](mailto:studie.psychiatrie@gmail.com)



## Probandeninformation und Einverständniserklärung zur Studie

### „Oxytocinausschüttung in sozialen Situationen - vergleichende Untersuchung bei Borderline-Patienten, chronisch Depressiven, episodisch Depressiven, Patienten mit somatoformen Störungen sowie gesunden Kontrollen“

#### Sehr geehrte Probandin, sehr geehrter Proband,

vielen Dank für Ihr Interesse an unserer Untersuchung zu hormonellen Veränderungen in sozialen Situationen. In diesem Schreiben werden Sie über die Inhalte der Studie aufgeklärt und welche Untersuchungen im Einzelnen durchgeführt werden.

#### Ziel der Studie

Im Rahmen der Studie soll bei Patienten, welche Probleme in zwischenmenschlichen Beziehungen aufweisen, hormonelle Veränderungen untersucht werden. Hierunter fallen Patienten, welche an einer Borderline-Störung leiden, sowie Patienten, welche chronisch, also schon über viele Jahre, an einer Depression erkrankt sind. Die Reaktionsmuster sollen verglichen werden mit Patienten, welche episodisch, also nur zu bestimmten Zeiten, unter Depressionen leiden sowie mit Patienten, welche unter körperlichen Beschwerden im Rahmen einer psychischen Erkrankung leiden und mit gesunden Kontrollprobanden.

#### Ablauf und einzelne Teile der Studie

Die Untersuchung erfolgt zum einen mittels Untersuchungsverfahren, die in Interviewform mit Ihnen durchgeführt werden. Zum anderen werden Sie an einem virtuellen Ballspiel teilnehmen, welches eine gute Methode darstellt, die geistige Vorstellungskraft in einer sozialen Situation zu testen. Dieses Ballspiel wird zusammen mit den Mitspielern gespielt, die Sie auf dem Bildschirm sehen. Es ist nicht wichtig, welche Leistung Sie erbringen. Vielmehr ist es wichtig, dass Sie sich das gesamte Spielgeschehen als möglichst wirklich vorstellen. Im Rahmen des Ballspiels sowie bei einem Interview werden Blutproben für Hormonuntersuchungen abgenommen.

Insgesamt werden zwei Untersuchungstermine festgelegt.

---

Direktor der Klinik: Prof. Dr. med. Peter Falkai

Das Klinikum der Universität München ist eine Anstalt des Öffentlichen Rechts

Vorstand: Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. Karl-Walter Jauch (Vorsitz), Kaufmännischer Direktor: Gerd Koslowski, Pflegedirektorin: Helle Dokken, Vertreter der Medizinischen Fakultät: Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser (Dekan)  
Institutionskennzeichen: 260 914 050, Umsatzsteuer-Identifikationsnummer gemäß §27a Umsatzsteuergesetz: DE813536017

- a) Zunächst wird zu einem Termin (auch als Telefontermin möglich) eine allgemeine Diagnostik erhoben. Hierbei wird psychische Symptomatik und Persönlichkeit anhand eines Interviews erfasst.
- b) An einem zweiten Termin werden Sie an dem virtuellen Ballspiel teilnehmen. Vor und nach Durchführung des Spiels werden Ihnen mehrere Fragebögen zur Selbsteinschätzung vorgelegt, um Ihre aktuelle Befindlichkeit sowie die Veränderungen Ihrer Befindlichkeit durch das Spiel zu erfassen. Vor- und nach dem Spiel werden zu fünf Zeitpunkten Blutproben (über Verweilkanüle) entnommen.

### **Risiko-Nutzen-Abwägung**

Die mit einer Studienteilnahme verbundenen Belastungen beschränken sich auf eine gewisse emotionale Belastung durch die Befragungen und das Ausfüllen der Fragebögen sowie die Teilnahme an dem virtuellen Ballspiel. Diese geht jedoch nicht über die Belastung hinaus, die auch in der Psychotherapie im Rahmen der Erhebung Ihrer Lebens-, bzw. Krankengeschichte vorkommt. Sie können diesbezüglich jederzeit die Bearbeitung, bzw. Teilnahme unterbrechen. Die Studienteilnahme hat keinen Einfluss auf die weitere Behandlung, die Sie erhalten.

Für die hormonellen Messungen im Rahmen des zweiten und dritten Termins werden jedem Probanden insgesamt 10 Röhrchen á 7,5 ml Blut abgenommen. Eine Blutabnahme von 75 ml stellt keine gesundheitsgefährdende Maßnahme dar. Während der Blutabnahme besteht die Möglichkeit, dass die Punktionsstelle schmerzt oder es zu einem Bluterguss kommt. Selten führt die Blutabnahme zu einem Schwindelgefühl oder einer Ohnmacht. In sehr seltenen Fällen kann es zu einer Venenentzündung kommen. Durch die nicht-invasiven Speichelproben ist mit keinen Risiken oder Nebenwirkungen zu rechnen.

### **Vertraulichkeit/Datenschutz**

**Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde über Sie erhoben und gespeichert. Die Studiendaten und sämtliche Unterlagen werden erst nach Verschlüsselung (Pseudonymisierung) und nur in verschlüsselter Form weitergegeben, d.h. weder Ihr Name noch ihre Initialen oder das exakte Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode. Im Falle eines Widerrufs der Einwilligung werden die pseudonymisiert gespeicherten Daten in irreversibel anonymisierter Form weiter verwendet.**

**Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf folgende Personen beschränkt: Prof.D Dr. F. Padberg, Dipl.-Psych. L. Sabaß, Dr. med. A. Jobst, Dr. J. Dewald-Kaufmann, Hannah Windmüller, Lisa Brandl, Fabiana Fernandes, Adima Zülch. Die Unterlagen werden in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie für 10 Jahre aufbewahrt. Eine Entschlüsselung erfolgt lediglich in Fällen, in denen es Ihre eigene Sicherheit erfordert („medizinische Gründe“) oder falls es zu Änderungen in der wissenschaftlichen**

**Fragestellung kommt („wissenschaftliche Gründe“). Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten gewährleistet.**

#### **Wegeunfallversicherung**

Für die gesunden Probanden, die natürlich nicht in der Klinik in Behandlung sind, wird für die Untersuchungstermine eine Wegeunfallversicherung bei der HDI-Gerling Industrie Versicherung AG abgeschlossen. Stationäre Patienten der LMU sind nur noch im Rahmen der normalen verschuldensabhängigen Haftung abgesichert. Ihnen ist bekannt, dass Sie während der Teilnahme an dem Forschungsprojekt keinen über die verschuldensabhängige Haftung hinausgehenden Versicherungsschutz für eventuell durch die Studie verursachte Schäden genießen. Es gelten die allgemeinen Haftungsbedingungen. Auf den Abschluss einer zusätzlichen verschuldensunabhängigen Versicherung wurde verzichtet, so dass für Sie diesbezüglich kein Versicherungsschutz besteht. Einen Schaden, der Ihrer Meinung nach auf die Studie zurückzuführen ist, melden Sie bitte unverzüglich dem Versuchs- oder Projektleiter.

#### **Rückmeldung**

Auf Wunsch erhalten Sie eine persönliche Auswertung Ihrer Daten, sowie eine Darstellung der Gesamtergebnisse der Studie.

Sollten Sie sich nicht für diese Studie entscheiden, entstehen Ihnen natürlich keinerlei Nachteile. Während der Studie können Sie jeder Zeit ohne Angaben von Gründen Ihre Studienteilnahme beenden.

Für Rückfragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Prof. Dr. Frank Padberg (Studienleiter)

Tel.:

Dr. Andrea Jobst (Ärztin im Projekt)

Tel.:

Dipl.-Psych. Lena Sabaß (Psychologin im Projekt)

Tel.:

Dr. Julia Dewald-Kaufmann (Psychologin im Projekt)

Tel.:

.....  
**Ort/Datum**

.....  
**Name der aufklärenden Ärztin/Psychologin**

### Einverständniserklärung

#### zur Teilnahme an der Studie:

#### „Interpersonelles Erleben und Verhalten – vergleichende Untersuchungen bei Borderline-Patienten, chronisch Depressiven, episodischer Depression, Patienten mit somatoformen Störungen sowie gesunden Kontrollen“

Inhalt, Vorgehensweise, Risiken und Ziel des obengenannten Forschungsprojektes hat mir Frau/Herr ..... ausreichend erklärt.

- Ich stimme der Teilnahme an der wissenschaftlichen Untersuchung im Rahmen o.g. Studie mit Erhebung und Verwendung meiner Daten zu.
- Ich wurde schriftlich und mündlich über die geplanten Untersuchungen informiert und hatte ausreichend Gelegenheit meine Fragen hierzu zu klären.
- Ich habe insbesondere die mir vorgelegte Teilnehmerinformation verstanden und eine Ausfertigung derselben und dieser Einwilligungserklärung erhalten.
- Mir ist bekannt, dass ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angaben von Gründen und ohne nachteilige Folgen für mich zurückziehen und einer Weiterverarbeitung meiner Daten jederzeit widersprechen und ihre Löschung verlangen kann.

.....  
Name des Patienten bzw. Probanden

.....  
Ort, Datum

.....  
Unterschrift des Patienten bzw. Probanden

#### Zum Versicherungsschutz

Mir ist bekannt, dass ich während der Teilnahme an dem Forschungsprojekt keinen über die verschuldensabhängige Haftung hinausgehenden Versicherungsschutz für eventuell durch die Studie verursachte Schäden genieße. Es gelten die allgemeinen Haftungsbedingungen. Auf den Abschluss einer zusätzlichen verschuldensunabhängigen Versicherung wurde verzichtet, so dass diesbezüglich kein Versicherungsschutz besteht. Einen Schaden, der meiner Meinung nach auf die Studie zurückzuführen ist, melde ich unverzüglich dem Versuchs- oder Projektleiter.

Ort, Datum

\_\_\_\_\_

Unterschrift (Teilnehmer)

\_\_\_\_\_

**Einverständniserklärung zum Datenschutz**

**Ich bin mit der Erhebung und Verwendung persönlicher Daten und Befunddaten nach Maßgabe der Patienteninformation einverstanden.**

**Ort, Datum**

\_\_\_\_\_

**Unterschrift (Teilnehmer)**

\_\_\_\_\_



# Literaturverzeichnis

- Ainsworth, M. (1974), *The Development Of Infant-Mother Attachment. Review of Child Development*, Technical report, University of Chicago.
- Angermeyer, M. C., Matschinger, H. & Schomerus, G. (2013), 'Attitudes towards psychiatric treatment and people with mental illness: changes over two decades', *The British Journal of Psychiatry* **203**.
- Bakdash, J. Z. & Marusich, L. R. (2017), 'Repeated measures correlation', *Frontiers in Psychology* **8**.
- Barratt, E. S. (1994), 'Impulsiveness and aggression', *Violence and mental disorder: Developments in risk assessment* **10**.
- Bartholomew, K. & Horowitz, L. M. (1991), 'Attachment styles among young adults: a test of a four-category model', *Journal of Personality and Social Psychology* **61**.
- Baumeister, R. F. & Leary, M. R. (1995), 'The need to belong: Desire for interpersonal attachments as a fundamental human motivation', *Psychological Bulletin* **117**.
- Bland, J. M. & Altman, D. (1986), 'Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement', *The Lancet* **327**.
- Bland, J. M. & Altman, D. G. (1995), 'Calculating correlation coefficients with repeated observations: part 2—correlation between subjects', *The BMJ* .
- Bland, M. (2015), *An introduction to medical statistics*, Oxford University Press.
- Bohus, M. & Kröger, C. (2011), 'Psychopathologie und Psychotherapie der Borderline-Persönlichkeitsstörung', *Der Nervenarzt* **82**.
- Bohus, M., Limberger, M. F., Frank, U., Sender, I., Gratwohl, T. & Stieglitz, R.-D. (2001), 'Entwicklung der Borderline-Symptom-Liste', *Psychotherapie, Psychosomatik, medizinische Psychologie* **51**.
- Bowlby, J. (1973), *Attachment and Loss, Volume 2: Separation – Anxiety and Anger*, Tavistock Publications.

- Bowlby, J. (1975), *Bindung: Eine Analyse der Mutter-Kind-Beziehung*, Kindler.
- Bowlby, J. (1980), *Attachment and Loss, Volume 2: Loss – Sadness and Depression*, Tavistock Publications.
- Brandtzaeg, O. K., Johnsen, E., Roberg-Larsen, H., Seip, K. F., MacLean, E. L., Gesquiere, L. R., Leknes, S., Lundanes, E. & Wilson, S. R. (2016), ‘Proteomics tools reveal startlingly high amounts of oxytocin in plasma and serum’, *Scientific reports* **6**.
- Brisch, K. H. & Hellbrügge, T. (2009), *Wege zu sicheren Bindungen in Familie und Gesellschaft*, Klett-Cotta.
- Bruhn, H. D., Junker, R., Schäfer, H. & Schreiber, S. (2011), *Labormedizin*, Schattauer Verlag.
- Buchheim, A., Heinrichs, M., George, C., Pokorny, D., Koops, E., Henningsen, P., O’Connor, M.-F. & Gundel, H. (2009), ‘Oxytocin enhances the experience of attachment security’, *Psychoneuroendocrinology* **34**.
- Bundesärztekammer (2014), ‘Richtlinie zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen’, *Deutsches Ärzteblatt*.
- Carstensen, B. (2011), *Comparing clinical measurement methods: a practical guide*, Wiley.
- Carter, C. S. (2007), ‘Sex differences in oxytocin and vasopressin: implications for autism spectrum disorders?’, *Behavioural Brain Research* **176**.
- Carter, C. S. (2014), ‘Oxytocin pathways and the evolution of human behavior’, *Annual Review of Psychology* **65**.
- Carter, C. S., Pournajafi-Nazarloo, H., Kramer, K. M., Ziegler, T. E., White-Traut, R., Bello, D. & Schwertz, D. (2007), ‘Oxytocin: Behavioral associations and potential as a salivary biomarker’, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1098**.
- Chester, D. S., DeWall, C. N. & Pond, R. S. (2016), ‘The push of social pain: Does rejection’s sting motivate subsequent social reconnection?’, *Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience* **16**.
- Christensen, J. C., Shiyanov, P. A., Estep, J. R. & Schlager, J. J. (2014), ‘Lack of association between human plasma oxytocin and interpersonal trust in a prisoner’s dilemma paradigm’, *PLOS One* **9**.
- Ciosek, J. & Izdebska, K. (2009), ‘Thyrotropin-releasing hormone modulates vasopressin and oxytocin synthesis and release from the hypothalamo-neurohypophysial system of different age male rats’, *Acta Physiologica Polonica* **60**.

- Cohen, S., Doyle, W. J., Skoner, D. P., Rabin, B. S. & Gwaltney, J. M. (1997), 'Social ties and susceptibility to the common cold', *JAMA* **277**.
- Connor, K. M. & Davidson, J. R. (2003), 'Development of a new resilience scale: The Connor-Davidson resilience scale (CD-RISC)', *Depression and Anxiety* **18**.
- Cool, D. R. & DeBrosse, D. (2003), 'Extraction of oxytocin and arginine-vasopressin from serum and plasma for radioimmunoassay and surface-enhanced laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry', *Journal of Chromatography B* **792**.
- Costa, P. T., McCrae, R. R. & Resources, I. P. A. (1989), *NEO PI/FFI Manual Supplement for Use with the NEO Personality Inventory and the NEO Five-Factor Inventory*, Psychological Assessment Resources.
- Cottet, M., Albizu, L., Perkovska, S., Jean-Alphonse, F., Rahmeh, R., Orcel, H., Mejean, C., Granier, S., Mendre, C., Mouillac, B. et al. (2010), 'Past, present and future of vasopressin and oxytocin receptor oligomers, prototypical GPCR models to study dimerization processes', *Current Opinion in Pharmacology* **10**.
- Croux, C. & Dehon, C. (2010), 'Influence functions of the Spearman and Kendall correlation measures', *Statistical methods & applications* **19**.
- Cyranowski, J. M., Hofkens, T. L., Frank, E., Seltman, H., Cai, H.-M. & Amico, J. A. (2008), 'Evidence of dysregulated peripheral oxytocin release among depressed women', *Psychosomatic Medicine* **70**.
- Dale, H. H. (1906), 'On some physiological actions of ergot', *The Journal of Physiology* **34**.
- Derfler-Rozin, R., Pillutla, M. & Thau, S. (2010), 'Social reconnection revisited: The effects of social exclusion risk on reciprocity, trust, and general risk-taking', *Organizational Behavior and Human Decision Processes* **112**.
- Detillion, C. E., Craft, T. K., Glasper, E. R., Prendergast, B. J. & DeVries, A. C. (2004), 'Social facilitation of wound healing', *Psychoneuroendocrinology* **29**.
- DeVries, A. C., Glasper, E. R. & Detillion, C. E. (2003), 'Social modulation of stress responses', *Physiology & Behavior* **79**.
- DeWall, C. N. & Richman, S. B. (2011), 'Social exclusion and the desire to reconnect', *Social and Personality Psychology Compass* **5**.
- Ditzen, B., Schmidt, S., Strauss, B., Nater, U. M., Ehlert, U. & Heinrichs, M. (2008), 'Adult attachment and social support interact to reduce psychological but not cortisol responses to stress', *Journal of Psychosomatic Research* **64**.

- Domes, G., Heinrichs, M., Michel, A., Berger, C. & Herpertz, S. C. (2007), 'Oxytocin improves "mind-reading" in humans', *Biological Psychiatry* **61**.
- Donaldson, Z. R. & Young, L. J. (2008), 'Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality', *Science* **322**.
- Downey, G. & Feldman, S. I. (1996), 'Implications of rejection sensitivity for intimate relationships', *Journal of Personality and Social Psychology* **70**.
- Dunn, J. & Wild, D. (2013), *The Immunoassay Handbook*, Elsevier, chapter Calibration curve fitting.
- Ebstein, R. P., Knafo, A., Mankuta, D., Chew, S. H. & Lai, P. S. (2012), 'The contributions of oxytocin and vasopressin pathway genes to human behavior', *Hormones and Behavior* **61**.
- Eisenberger, N. I. (2013), 'Social ties and health: a social neuroscience perspective', *Current Opinion in Neurobiology* **23**.
- Eisenberger, N. I., Lieberman, M. D. & Williams, K. D. (2003), 'Does rejection hurt? An fMRI study of social exclusion', *Science* **302**.
- Emeny, R. T., Huber, D., Bidlingmaier, M., Reincke, M., Klug, G. & Ladwig, K.-H. (2015), 'Oxytocin-induced coping with stressful life events in old age depends on attachment: Findings from the cross-sectional KORA age study', *Psychoneuroendocrinology* **56**.
- Engvall, E. & Perlmann, P. (1971), 'Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G', *Immunochemistry* **8**.
- Febo, M., Numan, M. & Ferris, C. F. (2005), 'Functional magnetic resonance imaging shows oxytocin activates brain regions associated with mother-pup bonding during suckling', *Journal of Neuroscience* **25**.
- Feldman, R. (2012), 'Oxytocin and social affiliation in humans', *Hormones and Behavior* **61**.
- Fisher, H. E., Aron, A. & Brown, L. L. (2006), 'Romantic love: a mammalian brain system for mate choice', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **361**.
- Francis, D. D., Young, L. J., Meaney, M. & Insel, T. R. (2002), 'Naturally occurring differences in maternal care are associated with the expression of oxytocin and vasopressin (V1a) receptors: gender differences', *Journal of Neuroendocrinology* **14**.

- Frayne, J. & Nicholson, H. (1998), 'Localization of oxytocin receptors in the human and macaque monkey male reproductive tracts: evidence for a physiological role of oxytocin in the male', *Molecular Human Reproduction* **4**.
- Fuchs, A., Fields, M., Freidman, S., Shemesh, M. & Ivell, R. (1995), 'Oxytocin and the timing of parturition. Influence of oxytocin receptor gene expression, oxytocin secretion, and oxytocin-induced prostaglandin F2 alpha and E2 release', *Advances in Experimental Medicine and Biology* **395**.
- George, C. & West, M. L. (2012), *The Adult Attachment Projective Picture System: attachment theory and assessment in adults*, Guilford Press.
- Gimpl, G. & Fahrenholz, F. (2001), 'The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation', *Physiological Reviews* **81**.
- Goldman, M., Marlow-O'Connor, M., Torres, I. & Carter, C. (2008), 'Diminished plasma oxytocin in schizophrenic patients with neuroendocrine dysfunction and emotional deficits', *Schizophrenia Research* **98**.
- Goodson, J. L., Kelly, A. M. & Kingsbury, M. A. (2012), 'Evolving nonapeptide mechanisms of gregariousness and social diversity in birds', *Hormones and Behavior* **61**.
- Grange, R., Thompson, J. & Lambert, D. (2014), 'Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays', *British Journal of Anaesthesia* **112**.
- Grippe, A. J., Pournajafi-Nazarloo, H., Sanzenbacher, L., Trahanas, D. M., McNeal, N., Clarke, D. A., Porges, S. W. & Carter, C. S. (2012), 'Peripheral oxytocin administration buffers autonomic but not behavioral responses to environmental stressors in isolated prairie voles', *Stress* **15**.
- Gross, J. J. & Levenson, R. W. (1995), 'Emotion elicitation using films', *Cognition & Emotion* **9**.
- Grossmann, K. & Grossmann, K. E. (2014), *Bindungen—das Gefüge psychischer Sicherheit*, Klett-Cotta.
- Hallbach, J. (2006), *Klinische Chemie für den Einstieg*, Georg Thieme Verlag.
- Hautzinger, M., Keller, F. & Kühner, C. (2006), *Beck Depressions-Inventar (BDI-II)*, Harcourt Test Services.
- Heim, C. & Nemeroff, C. B. (2001), 'The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies', *Biological Psychiatry* **49**.

- Heim, C., Young, L. J., Newport, D. J., Mletzko, T., Miller, A. H. & Nemeroff, C. B. (2009), 'Lower CSF oxytocin concentrations in women with a history of childhood abuse', *Molecular Psychiatry* **14**.
- Heinrichs, M., Baumgartner, T., Kirschbaum, C. & Ehlert, U. (2003), 'Social support and oxytocin interact to suppress cortisol and subjective responses to psychosocial stress', *Biological Psychiatry* **54**.
- Hirst, J. J., Haluska, G. J., Cook, M. J. & Novy, M. J. (1993), 'Plasma oxytocin and nocturnal uterine activity: maternal but not fetal concentrations increase progressively during late pregnancy and delivery in rhesus monkeys', *American Journal of Obstetrics & Gynecology* **169**.
- Hurlemann, R., Patin, A., Onur, O. A., Cohen, M. X., Baumgartner, T., Metzler, S., Dziobek, I., Gallinat, J., Wagner, M., Maier, W. et al. (2010), 'Oxytocin enhances amygdala-dependent, socially reinforced learning and emotional empathy in humans', *Journal of Neuroscience* **30**.
- Insel, T. R. (1997), 'A neurobiological basis of social attachment', *The American Journal of Psychiatry* **154**.
- Ivell, R., Balvers, M., Rust, W., Bathgate, R. & Einspanier, A. (1997), 'Oxytocin and male reproductive function', *Advances in Experimental Medicine and Biology* **424**.
- Jack, A., Connelly, J. J. & Morris, J. P. (2012), 'DNA methylation of the oxytocin receptor gene predicts neural response to ambiguous social stimuli', *Frontiers in Human Neuroscience* **6**.
- Janeway, C. A. & Travers, P. (1995), *Immunologie*, Spektrum Akad. Verlag.
- Jobst, A., Albert, A., Bauriedl-Schmidt, C., Mauer, M. C., Renneberg, B., Buchheim, A., Sabass, L., Falkai, P., Zill, P. & Padberg, F. (2014), 'Social exclusion leads to divergent changes of oxytocin levels in borderline patients and healthy subjects', *Psychotherapy and Psychosomatics* **83**.
- Jobst, A., Padberg, F., Mauer, M.-C., Daltrozzo, T., Bauriedl-Schmidt, C., Sabass, L., Sarubin, N., Falkai, P., Renneberg, B., Zill, P. et al. (2016), 'Lower oxytocin plasma levels in borderline patients with unresolved attachment representations', *Frontiers in Human Neuroscience* **10**.
- Jobst, A., Sabass, L., Palagyi, A., Bauriedl-Schmidt, C., Mauer, M. C., Sarubin, N., Buchheim, A., Renneberg, B., Falkai, P., Zill, P. et al. (2015), 'Effects of social exclusion on emotions and oxytocin and cortisol levels in patients with chronic depression', *Journal of Psychiatric Research* **60**.

- Kagerbauer, S., Martin, J., Schuster, T., Blobner, M., Kochs, E. & Landgraf, R. (2013), 'Plasma oxytocin and vasopressin do not predict neuropeptide concentrations in human cerebrospinal fluid', *Journal of Neuroendocrinology* **25**.
- Kéri, S. & Kiss, I. (2011), 'Oxytocin response in a trust game and habituation of arousal', *Physiology & Behavior* **102**.
- Kikusui, T., Winslow, J. T. & Mori, Y. (2006), 'Social buffering: relief from stress and anxiety', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **361**.
- Klinitzke, G., Romppel, M., Häuser, W., Brähler, E. & Glaesmer, H. (2012), 'Die deutsche Version des Childhood Trauma Questionnaire (CTQ) – psychometrische Eigenschaften in einer bevölkerungsrepräsentativen Stichprobe', *Psychotherapie, Psychosomatik, medizinische Psychologie* **62**.
- Koch, R. & Spörl, E. (2007), 'Statistische Verfahren zum Vergleich zweier Messmethoden und zur Kalibrierung: Konkordanz-, Korrelations- und Regressionsanalyse am Beispiel der Augeninnendruckmessung', *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* **224**.
- Kosfeld, M., Heinrichs, M., Zak, P. J., Fischbacher, U. & Fehr, E. (2005), 'Oxytocin increases trust in humans', *Nature* **435**.
- Kramer, K. M., Cushing, B. S., Carter, C. S., Wu, J. & Ottinger, M. A. (2004), 'Sex and species differences in plasma oxytocin using an enzyme immunoassay', *Canadian Journal of Zoology* **82**.
- Landgraf, R., Häcker, R. & Buhl, H. (1982), 'Plasma vasopressin and oxytocin in response to exercise and during a day-night cycle in man', *Endokrinologie* **79**.
- Landgraf, R. & Neumann, I. D. (2004), 'Vasopressin and oxytocin release within the brain: a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication', *Frontiers in Neuroendocrinology* **25**.
- Landgraf, R., Neumann, I., Holsboer, F. & Pittman, Q. J. (1995), 'Interleukin-1 $\beta$  stimulates both central and peripheral release of vasopressin and oxytocin in the rat', *European Journal of Neuroscience* **7**.
- Lee, H.-J., Macbeth, A. H., Pagani, J. H. & 3rd, W. S. Y. (2009), 'Oxytocin: The great facilitator of life', *Progress in Neurobiology* **88**.
- Leng, G. & Sabatier, N. (2016), 'Measuring oxytocin and vasopressin: bioassays, immunoassays and random numbers', *Journal of Neuroendocrinology* **28**.
- Leuner, B., Caponiti, J. M. & Gould, E. (2012), 'Oxytocin stimulates adult neurogenesis even under conditions of stress and elevated glucocorticoids', *Hippocampus* **22**.

- Lin, L. I. et al. (2000), 'Total deviation index for measuring individual agreement with applications in laboratory performance and bioequivalence', *Statistics in Medicine* **19**.
- Lippi, G., Guidi, G. C., Mattiuzzi, C. & Plebani, M. (2006), 'Preanalytical variability: the dark side of the moon in laboratory testing', *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **44**.
- Loranger, A. W. (1999), *IPDE: International personality disorder examination: DSM-IV and ICD-10 interviews*, Psychological Assessment Resources.
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M. & Myrtek, D. (2014), *Der Experimentator: Immunologie*, Springer-Verlag.
- Mabrouk, O. S. & Kennedy, R. T. (2012), 'Simultaneous oxytocin and arg-vasopressin measurements in microdialysates using capillary liquid chromatography–mass spectrometry', *Journal of Neuroscience Methods* **209**.
- MacDonald, E., Dadds, M. R., Brennan, J. L., Williams, K., Levy, F. & Cauchi, A. J. (2011), 'A review of safety, side-effects and subjective reactions to intranasal oxytocin in human research', *Psychoneuroendocrinology* **36**.
- MacDonald, K. & MacDonald, T. M. (2010), 'The peptide that binds: a systematic review of oxytocin and its prosocial effects in humans', *Harvard Review of Psychiatry* **18**.
- Maner, J. K., DeWall, C. N., Baumeister, R. F. & Schaller, M. (2007), 'Does social exclusion motivate interpersonal reconnection? Resolving the porcupine problem', *Journal of Personality and Social Psychology* **92**.
- McBride, G. (2005), A proposal for strength-of-agreement criteria for Lin's concordance correlation coefficient, Technical report, National Institute of Water & Atmospheric Research.
- McCarthy, M. (1995), 'Estrogen modulation of oxytocin and its relation to behavior', *Advances in Experimental Medicine and Biology* **395**.
- McCullough, M. E., Churchland, P. S. & Mendez, A. J. (2013), 'Problems with measuring peripheral oxytocin: can the data on oxytocin and human behavior be trusted?', *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **37**.
- McNeilly, A. S., Robinson, I., Houston, M. J. & Howie, P. W. (1983), 'Release of oxytocin and prolactin in response to suckling', *British Medical Journal (Clinical research ed.)* **286**.

- Meyer-Lindenberg, A., Domes, G., Kirsch, P. & Heinrichs, M. (2011), 'Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine', *Nature Reviews Neuroscience* **12**.
- Modi, M. E., Connor-Stroud, F., Landgraf, R., Young, L. J. & Parr, L. A. (2014), 'Aerosolized oxytocin increases cerebrospinal fluid oxytocin in rhesus macaques', *Psychoneuroendocrinology* **45**.
- Neumann, I. D. (2008), 'Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males', *Journal of Neuroendocrinology* **20**.
- Neumann, I. D. (2009), 'The advantage of social living: brain neuropeptides mediate the beneficial consequences of sex and motherhood', *Frontiers in Neuroendocrinology* **30**.
- Neumann, I. D. & Landgraf, R. (2012), 'Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, depression, and social behaviors', *Trends in Neurosciences* **35**.
- Neumann, I. D., Maloumy, R., Beiderbeck, D. I., Lukas, M. & Landgraf, R. (2013), 'Increased brain and plasma oxytocin after nasal and peripheral administration in rats and mice', *Psychoneuroendocrinology* **38**.
- Oliver, G. & Schäfer, E. (1895), 'On the physiological action of extracts of pituitary body and certain other glandular organs: preliminary communication', *The Journal of Physiology* **18**.
- Pedersen, C. A. & Prange, A. J. (1979), 'Induction of maternal behavior in virgin rats after intracerebroventricular administration of oxytocin', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**.
- Petrovic, P., Kalisch, R., Singer, T. & Dolan, R. J. (2008), 'Oxytocin attenuates affective evaluations of conditioned faces and amygdala activity', *Journal of Neuroscience* **28**.
- Pierrehumbert, B., Torrisi, R., Laufer, D., Halfon, O., Ansermet, F. & Popovic, M. B. (2010), 'Oxytocin response to an experimental psychosocial challenge in adults exposed to traumatic experiences during childhood or adolescence', *Neuroscience* **166**.
- Pratt, M., Apter-Levi, Y., Vakart, A., Feldman, M., Fishman, R., Feldman, T., Zagoory-Sharon, O. & Feldman, R. (2015), 'Maternal depression and child oxytocin response; moderation by maternal oxytocin and relational behavior', *Depression and Anxiety* **32**.
- Reinhard, M., Barton, B., Brandl, L., Brunoni, A., Dewald-Kaufmann, J., Fernandes, F., Goerigk, S., Musil, R., Windmüller, H., Wüstenberg, T., Zülch, A., Padberg, F. & Jobst, A. (2021), 'Sequential social exclusion in a novel cyberball paradigm leads to reduced behavioral repair and plasma oxytocin in borderline personality disorder', *Personality Disorders* . Zur Veröffentlichung angenommen.

- Robertson, G. L., Mahr, E. A., Athar, S. & Sinha, T. (1973), 'Development and clinical application of a new method for the radioimmunoassay of arginine vasopressin in human plasma', *Journal of Clinical Investigation* **52**.
- Robinson, K. J., Hazon, N., Lonergan, M. & Pomeroy, P. P. (2014), 'Validation of an enzyme-linked immunoassay (ELISA) for plasma oxytocin in a novel mammal species reveals potential errors induced by sampling procedure', *Journal of Neuroscience Methods* **226**.
- Ross, H. E. & Young, L. J. (2009), 'Oxytocin and the neural mechanisms regulating social cognition and affiliative behavior', *Frontiers in Neuroendocrinology* **30**.
- Russell, D. W. (1996), 'UCLA Loneliness Scale (Version 3): Reliability, validity, and factor structure', *Journal of Personality Assessment* **66**.
- Sansen, L., Iffland, B., Catani, C. & Neuner, F. (2013), 'Entwicklung und Evaluation des Fragebogens zu belastenden Sozialerfahrungen in der Peergroup (FBS)', *Zeitschrift für Klinische Psychologie und Psychotherapie* **42**.
- Savaskan, E., Ehrhardt, R., Schulz, A., Walter, M. & Schächinger, H. (2008), 'Post-learning intranasal oxytocin modulates human memory for facial identity', *Psychoneuroendocrinology* **33**.
- Skodol, A. E. & Bender, D. S. (2003), 'Why are women diagnosed borderline more than men?', *Psychiatric Quarterly* **74**.
- Slattery, D. A. & Neumann, I. D. (2008), 'No stress please! Mechanisms of stress hyporesponsiveness of the maternal brain', *The Journal of Physiology* **586**.
- Slattery, D. A. & Neumann, I. D. (2010a), 'Oxytocin and major depressive disorder: experimental and clinical evidence for links to aetiology and possible treatment', *Pharmaceuticals* **3**.
- Slattery, D. & Neumann, I. (2010b), 'Chronic ICV oxytocin attenuates the pathological high anxiety state of selectively bred Wistar rats', *Neuropharmacology* **58**.
- Staebler, K., Renneberg, B., Stopsack, M., Fiedler, P., Weiler, M. & Roepke, S. (2011), 'Facial emotional expression in reaction to social exclusion in borderline personality disorder', *Psychological Medicine* **41**.
- Stenseng, F., Belsky, J., Skalicka, V. & Wichstrøm, L. (2014), 'Preschool social exclusion, aggression, and cooperation: A longitudinal evaluation of the need-to-belong and the social-reconnection hypotheses', *Personality and Social Psychology Bulletin* **40**.

- Stock, S. & Uvnäs-Moberg, K. (1988), 'Increased plasma levels of oxytocin in response to afferent electrical stimulation of the sciatic and vagal nerves and in response to touch and pinch in anaesthetized rats', *Acta Physiologica* **132**.
- Stoop, R. (2012), 'Neuromodulation by oxytocin and vasopressin', *Neuron* **76**.
- Szeto, A., McCabe, P. M., Nation, D. A., Tabak, B. A., Rossetti, M. A., McCullough, M. E., Schneiderman, N. & Mendez, A. J. (2011), 'Evaluation of enzyme immunoassay and radioimmunoassay methods for the measurement of plasma oxytocin', *Psychosomatic Medicine* **73**.
- Tasker, J. (2004), 'Endogenous cannabinoids take the edge off neuroendocrine responses to stress', *Endocrinology* **145**.
- Trepel, M. (2008), *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*, Elsevier.
- Twenge, J. M., Baumeister, R. F., Tice, D. M. & Stucke, T. S. (2001), 'If you can't join them, beat them: effects of social exclusion on aggressive behavior', *Journal of Personality and Social Psychology* **81**.
- Uvnäs-Moberg, K., Bruzelius, G., Alster, P. & Lundeberg, T. (1993), 'The antinociceptive effect of non-noxious sensory stimulation is mediated partly through oxytocinergic mechanisms', *Acta Physiologica* **149**.
- Vila, G. (2014), 'Ein Hormon stellt sich vor: Oxytocin', *Journal für Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel* **7**.
- Voderholzer, U. (2015), *Therapie psychischer Erkrankungen: State of the Art*, Elsevier.
- Watson-Jones, R. E., Whitehouse, H. & Legare, C. H. (2016), 'In-group ostracism increases high-fidelity imitation in early childhood', *Psychological Science* **27**.
- Watson, P. & Petrie, A. (2010), 'Method agreement analysis: A review of correct methodology', *Theriogenology* **73**.
- Weaver, I. C., Cervoni, N., Champagne, F. A., D'Alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R., Dymov, S., Szyf, M. & Meaney, M. J. (2004), 'Epigenetic programming by maternal behavior', *Nature Neuroscience* **7**.
- Wild, D. & Sheehan, C. (2013), *The Immunoassay Handbook*, Elsevier, chapter Standardization and calibration.
- Williams, J. R., Insel, T. R., Harbaugh, C. R. & Carter, C. S. (1994), 'Oxytocin administered centrally facilitates formation of a partner preference in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*)', *Journal of Neuroendocrinology* **6**.

- Williams, K. D. (2007), 'Ostracism', *Annual Review of Psychology* **58**.
- Williams, K. D. (2009), 'Ostracism: A temporal need-threat model', *Advances in Experimental Social Psychology* **41**.
- Williams, K. D., Cheung, C. K. & Choi, W. (2000), 'Cyberostracism: Effects of being ignored over the Internet', *Journal of Personality and Social Psychology* **79**.
- Williams, K. D. & Jarvis, B. (2006), 'Cyberball: A program for use in research on interpersonal ostracism and acceptance', *Behavior Research Methods* **38**.
- Williams, K. D. & Nida, S. A. (2011), 'Ostracism: Consequences and coping', *Current Directions in Psychological Science* **20**.
- Wittchen, H.-U., Wunderlich, U., Gruschwitz, S. & Zaudig, M. (1997), *SKID I. Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV. Achse I: Psychische Störungen. Interviewheft und Beurteilungsheft. Eine deutschsprachige, erweiterte Bearbeitung der amerikanischen Originalversion des SKID I*, Hogrefe.
- Yalow, R. S. & Berson, S. A. (1959), 'Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods', *Nature* **184**.
- Yap, B. W. & Sim, C. H. (2011), 'Comparisons of various types of normality tests', *Journal of Statistical Computation and Simulation* **81**.
- Zhang, G., Zhang, Y., Fast, D. M., Lin, Z. & Steenwyk, R. (2011), 'Ultra sensitive quantitation of endogenous oxytocin in rat and human plasma using a two-dimensional liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay', *Analytical Biochemistry* **416**.

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei den Menschen bedanken, die mit dazu beigetragen haben, dass meine Doktorarbeit entstehen und fertig gestellt werden konnte:

Zuallererst danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Frank Padberg sowie meiner Betreuerin PD Dr. Andrea Jobst-Heel für die Bereitstellung dieses faszinierenden Themas, die vielen interessanten und zielführenden Diskussionen in der Arbeitsgruppe und die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. Julia Dewald-Kaufmann, die bei Fragen immer ansprechbar war und zielführend reagiert hat. Ihr Engagement und ihre Ratschläge waren eine außerordentliche Hilfe.

Darüber hinaus danke ich dem Laborteam von Herrn PD Dr. Peter Zill für die labortechnische Unterstützung. Insbesondere möchte ich Frau Karin Neumeier meinen Dank aussprechen, ohne deren Expertise, Engagement, Anregungen und praktische Unterstützung diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Auch dem Stationsteam der Station D1 möchte ich danken für die unkomplizierte Möglichkeit, in ihren Laborräumen zu testen und in Kauf zu nehmen, dass ihr Stationsalltag dadurch durcheinander gebracht wurde.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums, ihre Geduld, Rücksichtnahme und Ermutigung. Meiner Schwester und meinen Freund\*innen danke ich dafür, dass sie durch ihren Zuspruch und ihren Humor mit dazu beigetragen haben, in schwierigen Phasen durchzuhalten.

Zum Schluss geht mein spezieller Dank an meinen Mann Thomas, dessen Unterstützung, Rücksichtnahme, Ermutigung und Geduld maßgeblich zum Abschluss meiner Dissertation beigetragen haben.



# Eidesstattliche Erklärung

Windmüller, Hannah Carola

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Verlauf von Plasma-Oxytocin in einem sozialen Ausschlussparadigma  
bei gesunden Probanden – Vergleich zweier methodischer Ansätze zur  
Bestimmung von Oxytocin**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München den 10.04.2021

Hannah Windmüller