

Aus dem Lehrstuhl für Kieferorthopädie  
Univ.-Prof. Dr. Dr. Peter Proff  
der medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

**„Cortisol-Tagesrhythmus  
im Speichel gesunder Schulkinder“**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Christina Tzortzi  
aus Preveza  
2010



Aus dem Lehrstuhl für Kieferorthopädie  
Univ.-Prof. Dr. Dr. Peter Proff  
der medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

**„Cortisol-Tagesrhythmus  
im Speichel gesunder Schulkinder“**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Christina Tzortzi  
aus Preveza  
2010

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Peter Proff

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Behr

Tag der mündlichen Prüfung: 04. November 2010

## **Inhaltsverzeichnis**

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 1.  | Einleitung .....                                     | 1  |
| 1.1 | Fragestellung und Zielsetzung der Untersuchung ..... | 4  |
| 2.  | Patienten und Methoden.....                          | 5  |
| 2.1 | Ethikgenehmigung .....                               | 5  |
| 2.2 | Patienten.....                                       | 5  |
| 2.3 | Probensammlung.....                                  | 7  |
| 2.4 | Speichelcortisolbestimmung .....                     | 8  |
| 2.5 | Statistische Datenanalyse .....                      | 11 |
| 3.  | Ergebnisse.....                                      | 12 |
| 4.  | Diskussion .....                                     | 19 |
| 4.1 | Methodik der Studie .....                            | 19 |
| 4.2 | Schlussfolgerung .....                               | 25 |
| 5.  | Zusammenfassung .....                                | 26 |
| 6.  | Literaturverzeichnis.....                            | 28 |
| 7.  | Tabellen- und Abbildungsverzeichnis .....            | 34 |
| 7.1 | Tabellen .....                                       | 34 |
| 7.2 | Abbildungen.....                                     | 34 |
| 8.  | Danksagung.....                                      | 35 |
| 9.  | Lebenslauf .....                                     | 36 |
| 10. | Anhang 1: Artikel .....                              | 38 |
| 11. | Anhang 2: Fragebogen .....                           | 45 |

## 1. Einleitung

Zahnärztliche Behandlung ist oft mit Schmerz verbunden. Nach Literaturangaben berichten über 77 % der behandelten Patienten über mehr oder weniger starke Schmerzen im Zusammenhang mit einer zahnärztlichen Behandlung [4, 10]. Im kieferorthopädischen Patientengut wird über schmerzhafte Erfahrungen insbesondere während den verschiedenen Behandlungsstadien mit einer festsitzenden Apparatur berichtet. Eine retrospektive Studie aus China berichtet von 203 erwachsenen Patienten, die mit festsitzenden Apparaturen behandelt wurden. 91 % gaben Schmerzen als Folge der Apparatur an und 39 % gaben Schmerzen und Unannehmlichkeiten in jedem Stadium der Behandlung an, insbesondere beim Einsetzen eines neuen Drahtbogens in die Bracketapparatur [6]. Eine prospektive Studie bei Kindern und Erwachsenen zeigte, dass 95 % der befragten Patienten über Schmerzsensation bei einer kieferorthopädischen Behandlung berichten [5,9]. Als Hauptursache für Schmerzentstehung werden die applizierten kieferorthopädischen Kräfte gesehen [1, 3, 4, 7]: Erstens elastische Separatoren, zweitens das vollständige Bekleben mit dem Einsetzen des ersten Bogens und drittens die rasche Gaumennahterweiterung: „Rapid Palatinal Expansion“ (RPE).

Vor Eingliederung einer festsitzenden kieferorthopädischen Bandapparatur müssen benachbarte Zähne mit elastischen Separatoren

auseinandergedrückt werden. In der Regel werden dabei lediglich die ersten Molaren mit einem Band versehen. Die übrigen Zähne werden dann mit Brackets beklebt. Nach dem vollständigen Bekleben erfolgt das Einsetzen des 1. Bogens und damit die Kraftapplikation. In speziellen Fällen bei ausgeprägtem Schmalkiefer ist die zusätzliche oder alleinige Eingliederung einer Gaumennahterweiterungsapparatur nötig.

Eine objektive Bestimmung des Stresses/Schmerzes wird durch die Bestimmung des Kortisol-Spiegels im Speichel des betreffenden Patienten erhofft. Die Speichelkortisolbestimmung stellt eine praktische und nicht-invasive Alternative zur Kortisol-Bestimmung aus Blut-Proben dar. In der Literatur wurde eine signifikante Korrelation zwischen den Kortisol-Spiegeln im Speichel und im Blut bei Kindern und bei Erwachsenen festgestellt [2]. Der Speichel-Kortisol-Spiegel reflektiert die biologisch aktive, d. h. ungebundene Kortisol-Konzentration [11]. Die Kortisol-Sekretion im Speichel unterliegt einem Tagesrhythmus. Bei gesunden Erwachsenen liegt der Unterschied zwischen den Speichel-Konzentrationen um 8:00 Uhr morgens und 20:00 Uhr abends zwischen dem 8 bis 10-fachen Wert [12].

Um eine eindeutige Kortisol-Bestimmung im Speichel zu ermöglichen darf die Speichelprobe nicht während der maximalen Kortisol-Ausschüttung erfolgen.

Eine Schlüsselkomponente des menschlichen Stressreaktionssystems ist die Aktivierung des Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden- (HPA)- Systems und die anschließende Freisetzung des Steroidhormons

Kortisol [13,14]. Bei gesunden Erwachsenen zeigt die Kortisolsekretion sowohl im Speichel als auch im Blut einen ausgeprägten Tagesrhythmus mit einer 8-10 fachen Abnahme zwischen den morgendlichen und abendlichen/nächtlichen Konzentrationen [15,16,17].

Die Speichelkortisolspiegel sind direkt mit dem aktiven biologischen Derivat korreliert, d.h. der ungebundenen (freien) Kortisolkonzentration [11]. Daher kann Speichelkortisol eingesetzt werden, um Reaktionen auf stressreiche Reize zu beurteilen oder die Reaktion auf therapeutische Interventionen zu beurteilen. Kortisolbestimmungen als Möglichkeit zur Stresskontrolle sind in verschiedenen Fachdisziplinen wie Psychologie, Sportmedizin, Pädiatrie, Altersmedizin und Zahnheilkunde gängige Praxis [18,19,20,21,22]. Es wurde festgestellt, dass sogar die Erwartung einer Zahnbehandlung ein bedeutender Reiz für die Nebennierenrinde ist, Kortisol freizusetzen [21]. Das Sammeln von Speichel ist eine einfache, non-invasive, stressfreie Technik und hat sich zur Diagnostik besonders bei Kindern als geeignet erwiesen [23, 24, 25, 26]. Ferner kann diese Prozedur zeitlich festgelegt werden, ohne von der Verfügbarkeit eines Labors oder von Gesundheitspersonal abhängig zu sein [27].

Eine Vorbedingung für Studien, welche Änderungen des Speichelcortisols als eine Reaktion auf Stress analysieren, ist die Bestimmung von detaillierten normalen Tagessekretionsspiegeln in einer gesunden Population, die der Versuchsgruppe ähnlich ist. Für gesunde Erwachsene sind detaillierte Bestimmungen dieses Rhythmus vorhanden[12,28], jedoch für Kinder im Alter von 10 bis 14 Jahren stehen nur zu drei

unterschiedlichen Zeiten bestimmte Referenzwerte zur Verfügung [8,24,25,29]. Wie erwartet zeigen diese Bestimmungen einen deutlichen Tagesrhythmus. Der klinische Arbeitsalltag sowie individuelle Tagesabläufe bei den Probanden (z.B. Stundenplan für die Schule) erfordern einen maximalen zeitlichen Messbereich mit einer Vielzahl geplanter Messungen, um individuelle Schwankungen zu erfassen.

Daher war Zielsetzung dieser Studie, detaillierte Spiegel der TagesspeichelKortisolsekretion bei Schulkindern zu ermitteln, um den genauen Zeitbereich ihrer niedrigsten Konzentration und individuellen Variabilität zu bestimmen. Diese Untersuchung dient als Basis für eine normierte SpeichelKortisolkonzentration, um weitere Therapiestudien bei dieser Altersgruppe durchzuführen und kann bei der Beurteilung von Belastungssituationen durch kieferorthopädische Maßnahmen helfen.

## **1.1 Fragestellung und Zielsetzung der Untersuchung**

Wie oben bereits beschrieben, war es Ziel dieser Studie die Tagesspeichelkortisolsekretion bei Schulkindern zu ermitteln.

Die Ermittlung des Sekretionsprofils dient als Basis für eine normierte Speichelkortisolkonzentration, um die Belastung durch verschiedene kieferorthopädische Maßnahmen in der entsprechenden Altersgruppe einzuschätzen.

## **2. Patienten und Methoden**

### **2.1 Ethikgenehmigung**

Die Genehmigung für dieses Projekt wurde durch die örtliche Ethikkommission des Universitätsklinikums Regensburg erteilt und es wurde eine Einverständniserklärung von allen Teilnehmern und ihren Eltern eingeholt.

### **2.2 Patienten**

In der vorliegenden Studie wurden Schulkinder örtlicher Schulen im Alter zwischen 10 bis 14 Jahren untersucht.

Ausschlusskriterien waren chronische Erkrankungen, Medikamenteneinnahmen, Hormontherapie, Allergien oder irgendeine invasive medizinische Behandlung. Hinsichtlich der Mundhöhle wurden laufende Zahnbehandlungen, Zahnfleischbeschwerden. Der Überblick über die Forschungsarbeit und die Protokollmerkblätter wurden mehr als 100 potentiellen Versuchspersonen erläutert, von denen dreißig eine Einverständniserklärung abgaben.

Die Untersuchungsgruppe bestand Letzt endlich, aus 24 Personen, da wir sechs Versuchspersonen ausschlossen. Vier von ihnen wegen Medikamenteneinnahme, und zwei aufgrund von Diabetes.

Jedoch würden nur 23 Speichelproben zurückgebracht. Zwei dieser Proben wurden nicht in die Studie aufgenommen, da das

Protokolltagebuch nicht verfügbar war, obwohl die Proben für Essayprüfungszwecke verwendet wurden.

Die restlichen 21 Teilnehmer wurden wie unten beschrieben wird, analysiert. Mitarbeiter der Poliklinik für Kieferorthopädie der Universität Regensburg haben die vorliegenden Daten ausgewertet.

Die Untersuchungsgruppe bestand aus 21 Patienten im Alter von Zehn bis ca. dreizehn Jahren. Es handelte sich um 10 Mädchen (10 Jahren und drei Monaten bis 13 Jahre und drei Monaten) und 11 Jungen (10 Jahren und drei Monaten bis 13 Jahre und sieben Monaten) mit einem Durchschnittsalter von 11 Jahren.

|           | <b>Anzahl</b> | <b>Alter (von-bis)</b> | <b>Durchschnittsalter</b> |
|-----------|---------------|------------------------|---------------------------|
| Männlich  | 11            | 10y 3m – 13y 7m        | 12.41 ± 1.21              |
| Weiblich  | 10            | 10y 3m – 13y 3m        | 12.22 ± 1.09              |
| Insgesamt | 21            | 10y 3m – 13y 7m        | 12.32 ± 1.16              |

**Tabelle 1.** Demographische Übersicht der Probanden-Gruppe dieser Studie.

## 2.3 Probensammlung

Jedem Teilnehmer wurden 22 Speichelsammelsets gegeben, die aus einem SaliCap®-Sammelröhrchen (IBL Gesellschaft für Immunchemie und Immunbiologie mbH, Hamburg, Deutschland) und einem kurzen Kunststofftrinkhalm bestanden. Sie wurden angewiesen, die Probenentnahme unmittelbar nach dem Aufwachen zu beginnen: während der ersten drei Stunden eine Probe alle 20 Minuten, dann eine Probe jede Stunde bis zur Schlafenszeit. Die Kinder verwendeten den Kunststofftrinkhalm, der vorgesehen war, um den Speichel in das Sammelröhrchen auszustoßen. Insgesamt wurden 20 Proben über eine Spanne von einem Tag gesammelt. Gemäß Gröschl et al. [24] versuchten wir, jedes zusätzliche stressreiche Ereignis auszuschließen, das die Cortisolspiegel beeinflussen könnte. Da sich dieser enge Probenentnahmeplan störend auf den Schulebetrieb auswirkte, fand die Probenentnahme an Wochenenden, Feiertagen oder während der Ferien statt. Jede Probe enthielt 500 µl Speichel. Die Teilnehmer wurden angewiesen, ein Tagebuch über den Probenentnahmetag zu führen, das die Speichelprobenentnahmezeiten, Essenszeiten, eine mögliche medikamentöse Behandlung, körperliche Übungen wie Laufen oder Radfahren, und irgendwelche anderen Ereignisse umfasste, die eine körperliche Aktivität umfassten.

Um eine mögliche Störung der Cortisolquantifizierung auszuschließen, wurden die folgenden Richtlinien vor der Probenentnahme aufgestellt:

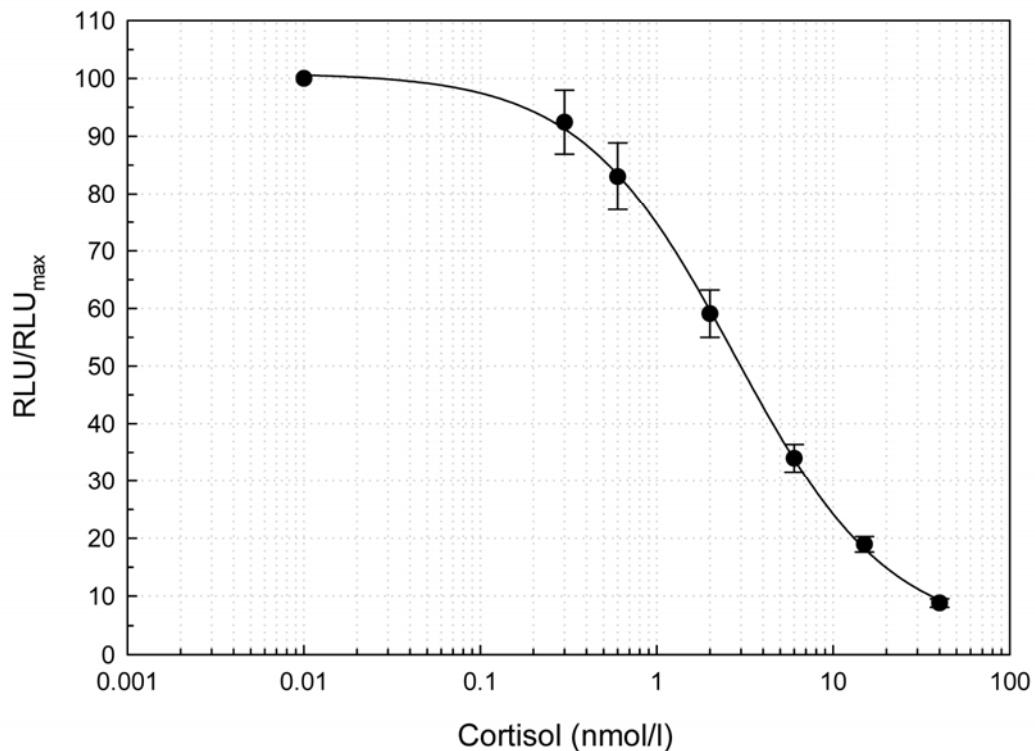
1. Rot gefärbte Proben, d.h. Proben, die Blut enthielten, wurden verworfen, und 10 min nach einer Spülung des Munds mit reinem kaltem Wasser wurde eine andere Probe gezogen;
2. kein Bürsten oder Zahnseidebehandlung der Zähne vor der Probenentnahme;
3. Essen nur unmittelbar nach der Probenentnahme, andernfalls eine gründliche Mundspülung mit kaltem Wasser 5 min vor der Probesammlung.

## **2.4 SpeichelKortisolbestimmung**

Alle Proben wurden unmittelbar nach jeder Probenentnahme zuhause bei 4–8°C in einem Kühlschrank aufbewahrt, und wurden danach angeliefert und bis zur endgültigen Analyse bei -20°C gehalten. Unmittelbar vor der Analyse wurden die Proben aufgetaut, gemischt und für 10 min bei 5000 U/min unter Verwendung einer „Biofuge fresco“ Tischzentrifuge (Kendro, Osterode, Deutschland) bei 4°C zentrifugiert. Die klaren Überstände wurden in frische Röhrchen überführt.

Die Speichelcortisolbestimmung wurde unter Verwendung eines kommerziellen Cortisol-Lumineszenz-Immunoassays (Teile-Nr. RE62011, IBL Gesellschaft für Immunchemie und Immunbiologie mbH, Hamburg, Deutschland) gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Jeder Assay bestand aus den Quantifizierungsstandards (die von 0–40 ng/ml reichten), einer cortisolarmen und - cortisolreichen Positivkontrolle

(Konzentrationen variierte mit der Charge), und Proben von zwei Teilnehmern. Alle Standards und Proben wurden zweifach getestet, und alle Proben derselben Einzelperson wurden im selben Assay unter Verwendung von 20 µl Speichel pro Quelle mitlaufen gelassen. Alle individuellen Messungen und Standardkurvenberechnungen wurden mit einem Tecan GENios™ Multifunktions-Mikroplattenreader (Tecan, Grödig/Salzburg, Österreich) im Luminometermode unter Verwendung der Magellan Software V4.1 (Tecan, Grödig/Salzburg, Österreich) durchgeführt. In allen Assays ( $n = 11$ ) war die Inter- und Intra-Assayvariabilität kleiner als 15%. Die Standardkurve in Abbildung 1 fasst alle Assays zusammen. Sie wurde als eine Vier-Parameter-Logistik-Kurve unter Verwendung SigmaStat für Windows 3.5 (Systat Software, Inc., Point Richmond, CA, USA) berechnet.



**Abbildung 1.** Diese Standardkurve fasst die Kalibrierungsdaten von allen elf Assays zusammen ( $R = 0,9946$ ). In jedem Assay wurden die Standards zweifach bestimmt, und die Cortisolkonzentrationen in den Speichelproben wurden unter Verwendung einer Vier-Punkt-Parameter-Logistik-Regressionskurve berechnet. Die Inter- und Intra-Assayvariation war kleiner als 15%. Die hier gezeigte Standardkurve wurde unter Verwendung von SigmaStat berechnet.

## 2.5 Statistische Datenanalyse

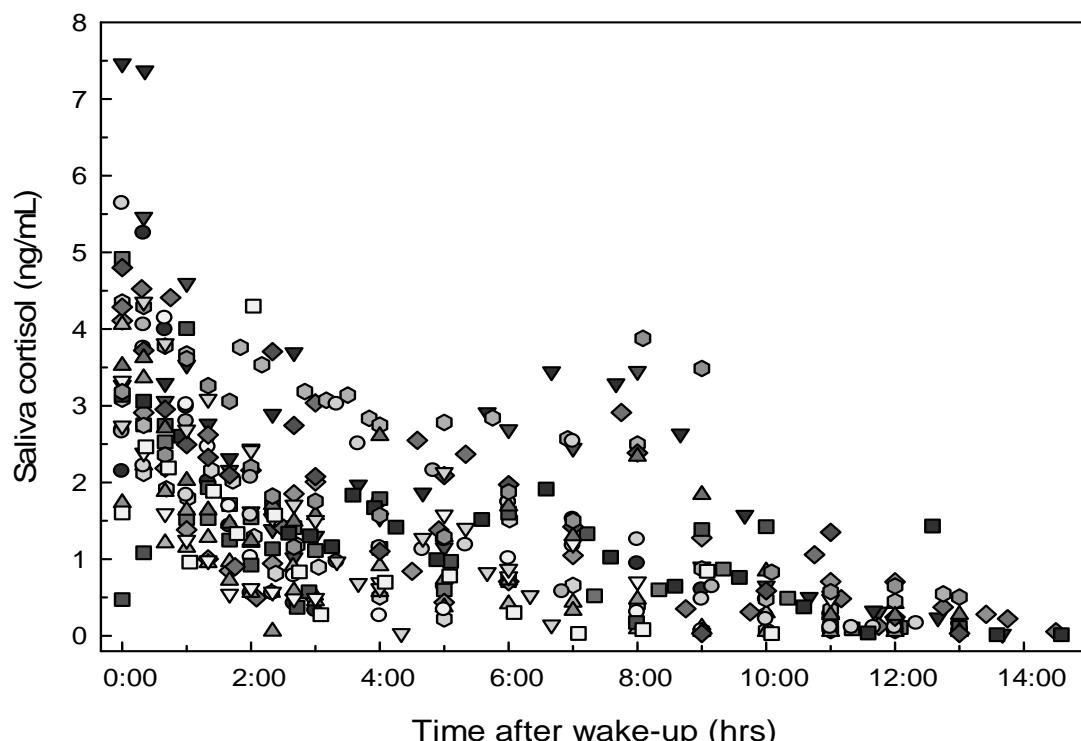
Für jede Einzelperson wurden die tatsächlichen Probenentnahmezeiten mit der Aufwachzeit [17] in Beziehung gesetzt. Es wurde eine beschreibende Statistik, die den Mittelwert und die Standardabweichung umfasste, unter Verwendung von SPSS für Windows 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) berechnet. Es wurde die GLM („allgemeines lineares Modell“) Prozedur von SPSS für wiederholte Messwerte verwendet, um auf eine potentielle Wechselwirkung (Geschlecht und Zeit) zu testen, gefolgt durch Mann-Whitney U Tests als eine Post-Hoc-Prozedur, falls notwendig.

Es wurde der Einfluss der Aufwachzeit auf Cortisol, und auf Geschlechtsunterschiede der Aufwachzeit und von Cortisol unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests geprüft. Ergebnisse wurden für  $p \leq 0,05$  als signifikant betrachtet. Alle Abbildungen wurden mit SigmaPlot für Windows 10.0 (Systat Software, Inc., Point Richmond, CA, USA) hergestellt.

### 3. Ergebnisse

Es wurden in dieser Studie Speichelproben von 11 Jungen (Altersbereich: 10 Jahre 3 Monate – 13 Jahre 7 Monate) und 10 Frauen (Altersbereich: 10 Jahre 3 Monate – 13 Jahre 3 Monate) mit ausgefülltem Protokolltagebuch aufgenommen. Insgesamt wurden 402 Speichelproben von 21 Teilnehmern unter Verwendung des Cortisol-Lumineszenz-Kits analysiert, wie im Abschnitt Versuchspersonen und Methoden beschrieben.

Die Einzelpersonen zeigten einen ausgedehnten Tagesaktivitätsbereich mit selbst gemeldeten Aufwachzeiten, die von 6:30 bis 10:15 am Morgen reichten.



**Abbildung 2 .** Kortisol-Spiegel im Speichel von Schulkindern beiderlei Geschlechts im Alter von 10–14 Jahren ( $n = 21$ , 402 Speichelproben).

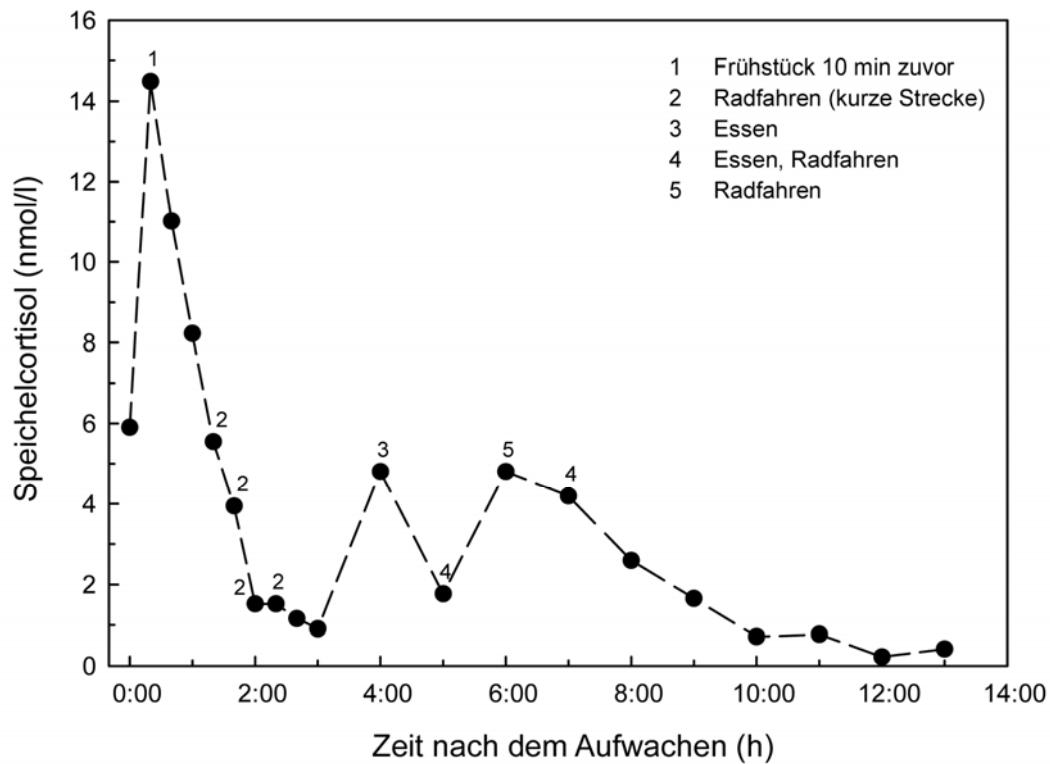
Wir prüften auf Geschlechtsunterschiede der Aufwachzeiten und Cortisolkonzentration unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests und stellten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern für beide Messwerte fest (Tabelle 2). Es wurden keine signifikanten Unterschiede des morgendlichen Cortisols von Früh- und Spätaufstehern ( $p = 0,699$ ) festgestellt, wobei bei beiden eine Medianwertspaltung bei einer Aufwachzeit von 8:24 (Tabelle 2) verwendet wurde.

|                    |                 | <b>N</b> | <b>Mittelwert</b> | <b>SD</b> | <b>Min</b> | <b>Max</b> | <b>Medianwert</b> | <b>Mann-Whitney U-Test</b> |
|--------------------|-----------------|----------|-------------------|-----------|------------|------------|-------------------|----------------------------|
| Aufwach-zeit (h)   | Männlich        | 11       | 8:44              |           | 1:13       | 6:15       | 10:14             | 9:00                       |
|                    | Weiblich        | 10       | 8:20              |           | 1:08       | 6:30       | 10:10             | 8:08                       |
|                    | Summe           | 21       | 8:32              |           | 1:10       | 6:15       | 10:14             | 8:24                       |
| Cortisol (nmol/ml) | Männlich        | 11       | 9,05              |           | 3,63       | 4,4        | 15,6              | 8,52                       |
|                    | Weiblich        | 10       | 10,24             |           | 4,86       | 1,3        | 20,6              | 9,45                       |
|                    | Summe           | 21       | 9,62              |           | 4,19       | 1,3        | 20,6              | 9,03                       |
| Cortisol (nmol/m)  | Früh- aufsteher | 11       | 9,28              |           | 4,77       | 1,3        | 20,6              | 8,76                       |
|                    | Spät- aufsteher | 10       | 9,99              |           | 3,67       | 4,4        | 15,6              | 10,11                      |
|                    | Summe           | 21       | 9,62              |           | 4,19       | 1,3        | 20,6              | 9,03                       |

**Tabelle 2.** Auswertung von Geschlechtsunterschieden für Aufwachzeit und Cortisolkonzentration.

Um individuelle Variationen zu kompensieren, wurden die Probenentnahmezeiten auf die Aufwachzeit normiert, die auf 0:00 Stunden gesetzt wurde. Obwohl die Kinder angewiesen wurden, Speichelproben nach einem strengen Probenentnahmeplan bereitzustellen, hielten sich nicht alle Teilnehmer an diesen Stundenplan. Daher wurden nur jene Proben, die innerhalb der folgenden Grenzen gezogen wurden, zur weiteren Analyse aufgenommen: während der ersten drei Stunden (20 min Probenentnahmehorizont) Proben innerhalb  $\pm$  5 min, und während der verbleibenden Probenentnahmehorizont  $\pm$  15 min.

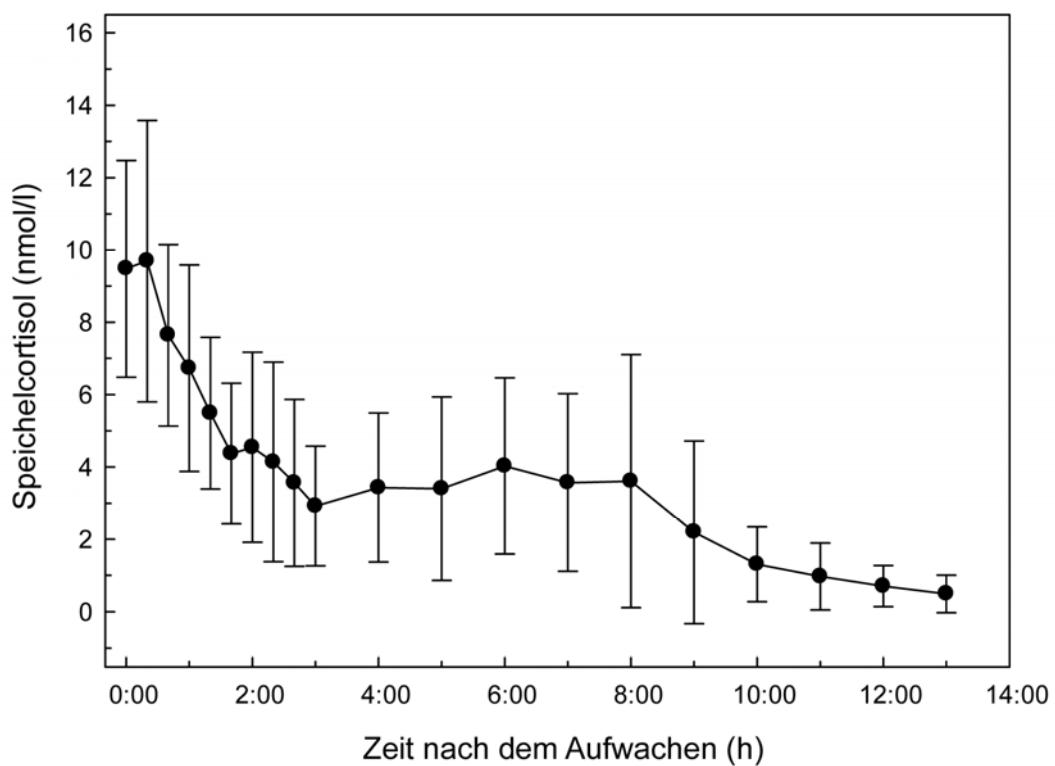
Aufgrund des wohlbekannten Phänomens von erhöhten Speichelcortisolspiegeln nach körperlichen Übungen [30], wurden alle während einer hohen körperlichen Aktivität gezogenen Proben ausgeschlossen, wenn eine solche Aktivität im Tagebuch explizit vermerkt war. Diese Prozedur wird in Abbildung 3 beispielhaft dargestellt, die ein Beispielprofil von Aktivitäten und Speichelcortisolspiegel eines männlichen Freiwilligen zeigt.



**Abbildung 3. Speichelcortisolprofil eines Teilnehmers.** Jede Speichelprobe wird dargestellt (•). Zahlen bezeichnen Einträge im Probenentnahmetagebuch. Proben ohne Zahlen hatten keine schriftlichen Anmerkungen. Die mit „1“–„6“ bezeichneten Anmerkungen wurden vom Deutschen ins Englische übersetzt und repräsentieren die originalen schriftlichen Einträge im Probenentnahmetagebuch dieser Freiwilligen. Zur weiteren Analyse wurden Speichelproben, die während einer körperlichen Belastung (z.B. Radfahren) gesammelt wurden, aus allen Datensätzen entfernt, d.h. alle Datenpunkte, die in diesem Fall mit „4“ oder „5“ bezeichnet sind.

Die einigen der Proben benachbarten Zahlen repräsentieren die Vermerke, die der Proband in seinem Tagebuch niederschrieb. Sie wurden ohne irgendwelche weitere Veränderungen oder Hinzufügungen vom Deutschen ins Englische übersetzt. Hier wurden die mit „4“ und „5“ bezeichneten Proben vor der weiteren Analyse entfernt.

Von 420 möglichen Proben (21 Probanden mit jeweils 20 Proben) wurden 402 Proben durch die Probanden zurückgegeben (= 95,7%). In 37 Proben stimmten die vermerkten Probenentnahmezeiten im Probenentnahmetagebuch des Probanden nicht mit dem Studienprotokoll überein (= 365 Proben, 86,9%). Zusätzlich wurden 28 direkt mit einer körperlichen Aktivität korrelierten Cortisolproben vor der weiteren Analyse entfernt (Abbildung 3). Zur endgültigen Analyse blieben 337 (= 80,2%) Proben von 21 Teilnehmern übrig (Abbildung 4).



**Abbildung 4.** Mittlerer Tagescortisolspiegel in Speichelprofilen von Schulkindern ( $n = 21$ ; Altersbereich: 10 Jahre 3 Monate – 13 Jahre 7 Monate; 337 Proben). Die Symbole bezeichnen den Mittelwert und die Balken den  $\pm 1\text{SD}$ -Bereich.

Innerhalb von 20 min nach dem Aufwachen erreichte die als Mittelwert ( $\pm \text{SD}$ ) angegebene Cortisolkonzentration ihr Maximum von 9,69 ( $\pm 3,89$ ) nmol/l und nahm nach zusätzlichen 60 Minuten um 50% ab. Während des restlichen Teils des Tages fielen die Speichelcortisolspiegel auf 1/20 der Anfangskonzentration (Abbildung 4). Zwischen 3 und 6 Stunden nach dem Aufwachen stagnierte das

Speichelcortisol bei 4,03 ( $\pm 2,44$ ) nmol/l (Abbildung 4). Die potentielle Wechselwirkung zwischen Geschlecht und Zeit wurde für wiederholte Messwerte unter Verwendung GLM-Prozedur von SPSS getestet. Es wurde keine Geschlechtsspezifität festgestellt ( $p = 0,550$ ).

## 4. Diskussion

### 4.1 Methodik der Studie

Das Tagesrhythmusmuster der Cortisolabsonderung im Blut und Speichel ist bei Erwachsenen [12] und Kleinkindern [31] ausführlich ausgewertet worden. Bei Schulkindern stehen jedoch nur minimale Informationen zur Verfügung. Trotz ausführlicher Literatursuche wurden keine Daten über einen 24-Stunden- oder Tagesspeichelcortisolrhythmus gefunden. Stattdessen waren nur Referenzwerte für drei Zeitpunkte (morgens, mittags und abends) verfügbar [8, 24, 25, 29]. Diese Daten zeigen einen hohe individuelle Variabilität am Morgen und eine reduzierte Variabilität der Speichelcortisolkonzentrationen am Nachmittag und in der Nacht an. Jedoch fehlt diesen Daten eine definierte Zeitspanne während des Tages, wo eine stabile Hormonabsonderung und niedrige Grundspeichelcortisolspiegel erkannt werden können, was eine größere Flexibilität bei der Probenentnahme als eine Definition bereitstellt, die eine explizite Probenentnahmzeit verwendet [32].

Daher wurde die vorliegende Studie durchgeführt, um das Tagesprofil von Speichelcortisolspiegeln bei 21 gesunden Schulkindern (Altersbereich 10–14 Jahre) zu bestimmen. Dieses Profil (Abbildung 4) zeigte eine ausgedehnte individuelle Variabilität. Insgesamt wurde die maximale Speichelcortisolkonzentration mit 9,69 ( $\pm 4,19$ ) nmol/l 20 Minuten nach

dem Aufwachen erreicht. Interessanterweise wurden jedoch keine Geschlechtsunterschiede der Speichelcortisolspiegel beobachtet. [41] Für jede Einzelperson wurden die Probenentnahmzeiten auf die Aufwachzeit normiert, was zu einem ähnlichen Verlauf führt, wie er vorher für Erwachsene [12,28] veröffentlicht wurde. Gröschl et al. [24] und Netherton et al. [8] veröffentlichten Referenzwerte für definierte Tageszeiten.

Tabelle 3 fasst die relevanten Daten aus ihren Veröffentlichungen und dieser Studie zusammen. Die in dieser Studie berichteten morgendlichen Speichelwerte (Tabelle 3) waren 1,7 Mal kleiner als jene von Gröschl et al. [24], (7:00 Uhr), jedoch ähnlich zu jenen, die durch Netherton et al. [8] für eine Probenentnahme um 8:00 Uhr berichtet wurden. Die berichteten abendlichen Cortisolkonzentrationen waren höher (Gröschls Daten) oder ähnlich (Nethertons Daten) zu jenen in dieser Studie. Netherton et al. [8] verwendeten Verhältnisse der morgendlichen zu den abendlichen Spiegeln (vormittags/nachmittags; 8:00 zu 20:00), um den Tagesrhythmus von Cortisol zu bewerten. Unter Verwendung der Mittelwertsdaten aus Tabelle 3 wurden die Verhältnisse berechnet (Tabelle 3, letzte Spalte). Im Vergleich zu Gröschls und Nethertons Daten waren die aus den Daten dieser Studie berechneten Verhältnisse höher, jedoch in derselben Größenordnung. [41]

|   | Tageszeit<br>(h) | N   | Cortisol (nmol/l) |       | Verhältnis<br>(vormittags/nachmittags) |
|---|------------------|-----|-------------------|-------|--|
|   |                  |     | Mittelwert        | SD    |  |
| Diese Studie  | 7:00             | 3   | 13,21             | 6,64  | 7:00 zu 19:00: 13,6                    |
|   | 8:00             | 11  | 7,60              | 3,58  | 8:00 zu 20:00: 9,2                     |
|   | 13:00            | 21  | 3,36              | 2,09  |  |
|   | 19:00            | 19  | 0,97              | 0,73  |  |
|   | 20:00            | 16  | 0,83              | 0,61  |  |
| Gröschl et al. <sup>24</sup><br>(11–13 alt)                   | 7:00             | 52  | 23,3              | 7,8   | 7:00 zu 19:00: 11,1                    |
|   | 13:00            | 52  | 6,0               | 3,3   |  |
|   | 19:00            | 52  | 2,1               | 1,9   |  |
| Gröschl et al. <sup>24</sup><br>(14–15 alt)                   | 7:00             | 40  | 23,2              | 7,0   | 7:00 zu 19:00: 11,0                    |
|   | 13:00            | 40  | 7,8               | 3,8   |  |
|   | 19:00            | 40  | 2,1               | 1,7   |  |
| Netherton et al. <sup>8</sup><br>(alle Versuchs-<br>personen) | 8:00             | 126 | 9,12*             | 0,30* | 8:00 zu 20:00: 7,7                     |
|   | 20:00            | 126 | 1,19*             | 0,08* |  |

\* Berechnet aus Netherton et al.<sup>8</sup>, um Speichelcortisol in nmol/l anzugeben.

**Tabelle 3.** Vergleich der Speichelcortisol-Referenzwerte von Gröschl et al.

[24 und Netherton et al [8]. mit Daten dieser Studie. Die Verhältnisse vom morgendlichen zum abendlichen Cortisol (vormittags/nachmittags) wurden unter Verwendung der mittleren Cortisolkonzentrationen zu gegebenen Zeiten berechnet.

In allgemeinen erreicht das menschliche Speichelcortisol beim Erwachsenen seinen maximalen Spiegel innerhalb von 30 bis 60 Minuten nach dem Aufwachen und nimmt bis Mittag schnell ab und bleibt dann auf einem niedrigen Spiegel bis zum nächsten Morgen [15,16,17]. Westermann et al. [12] berichtet einen maximalen Cortisolspiegel von 27,6 ( $\pm 12,1$ ) nmol/l 50 Minuten nach dem Aufwachen. Über die nächsten 2,5 Stunden nahm das Speichelcortisol auf ~7 nmol/l ab, und erreichte seinen Minimalspiegel von < 2 nmol/l 15 Stunden nach dem Aufwachen. Abbildung 3 zeigt einen ähnlichen Verlauf, mit einer Ausnahme: zwischen 3–6 Stunden nach dem Aufwachen blieb die Speichelcortisolkonzentration erhöht. Dies kann dem Probenentnahmesystem zuzuschreiben sein, da die Proben an Wochenenden und freien Tagen aufgrund von Feiertagen oder Ferien gesammelt wurden. Diese Gestaltung wurde gewählt, um alle potentiellen stressreichen Ereignisse auszuschließen, die aufgrund des engen Probenentnahmezeitabstands unmittelbar nach dem Aufwachen an Schultagen [24] auftreten könnten. Es ist vernünftig anzunehmen, dass sich der Tagesablauf während normaler Schultage etwas von den Wochenenden oder Ferien unterscheiden könnte, was daher zu Variationen bezüglich der Aufwachzeit und anderen Tagesaktivitäten, insbesondere der Essenszeiten führt. Mehrere Autoren berichteten, dass bei Erwachsenen frühere Aufwachzeiten zu höheren morgendlichen Speichelkonzentrationen [33,34] führen, jedoch das Cortisolabsonderungsmuster während des ganzen Tages innerhalb der Einzelperson [34,35] einigermaßen stabil blieb.

Eine Referenz umfasste Kinder [36], und sie berichtete, dass ein Ein-/Ausschluss von dreizehn Kindern ihre Ergebnisse nicht veränderte. Der Altersbereich dieser Kinder wurde nicht erwähnt. Von daher kann angenommen werden, dass das an freien Tagen bestimmte Absonderungsmuster für die Bestimmung einer Periode mit niedriger Grundabsonderung einigermaßen stabil ist. Diese Periode beginnt 6 Stunden nach dem Aufwachen und dauert bis zur Schlafenszeit. Dies entspricht 13:00 Uhr während Schultagen, wobei vorausgesetzt wird, dass die Schule um 8:00 Uhr beginnt und etwa eine Stunde notwendig ist, um sich nach dem Aufwachen vorzubereiten und zur Schule zu gehen [8, 24, 25, 29].

Wenn schulspezifische stressreiche Situationen wie Prüfungen oder Sport ausgeschlossen werden, könnte dieser Zeitrahmen um 1–2 Stunden am Morgen ausgedehnt werden, d.h. frühestens 11:00–12:00 Uhr.

Wir beobachteten eine hohe individuelle Variabilität hinsichtlich der Befolung der Probenentnahmezeiten und des Führens eines Probenentnahmetagebuchs in dieser Studie. Das Probenentnahmetagebuch wurde durch alle 21 Teilnehmer geführt: zwanzig von ihnen schrieben alle Probenentnahmezeiten nieder, jedoch hielten sich nur 14 Protokolle vollständig an das Studienprotokoll. Anmerkungen wurden durch 19 Teilnehmer notiert, die von einem einzigen Eintrag in das Tagebuch bis zu spezifischen Einträgen für jede Probenentnahmezeit reichten. Es wurden keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in diesem Kontext beobachtet. Wie vorher beschrieben

wurden 19,8% der Proben vor der Analyse aufgrund von Unstimmigkeiten während der Probenentnahme (unvollständige Probenentnahme, falsche Probenentnahmezeiten) und körperlicher Aktivität entfernt. In zukünftigen Studien sollten notwendige Vorkehrungen getroffen werden, um solchen individuellen Unterschieden gerecht zu werden.

Es wurde berichtet, dass im Speichel die Dauer und Art einer Behandlung, die Anwendung einer allgemeinen oder örtlichen Narkose, oder die Angst vorm Zahnarzt alle die Cortisolkonzentration beeinflussen [18,22, 37].

Jedoch ist noch keine quantitative Korrelation zwischen Stress und Cortisolspiegeln hergestellt worden. Insbesondere wurde in den meisten Versuchen die Speichelsammlung zwischen 8:00 Uhr und 11:00 Uhr durchgeführt. Diese Periode ist durch eine hohe individuelle Variabilität der Speichelcortisolkonzentration gekennzeichnet, die leichte Änderungen der Konzentration verschleiern könnte.

## **4.2 Schlussfolgerung**

Zielsetzung dieser Studie war es, den Zeitbereich zu erkennen und zu definieren, in dem die Speichelcortisolkonzentration und ihre individuelle Variation niedrig sind. 6 Stunden nach dem Aufwachen beginnend und bis zum Zubettgehen andauernd wurden verhältnismäßig niedrige Cortisolspiegel bei männlichen und weiblichen Kindern festgestellt, die 10 bis 14 Jahre alt waren. Diese Beobachtung legt einen geeigneten Zeitrahmen nahe, der mit täglichen Arbeitsplänen und der Situation in Zahnkliniken verträglich ist. Die in dieser Studie definierten normalen Werte können wichtige Referenzwerte für weitere Studien repräsentieren, die Beschwerden und Stress bei Kindern, die medizinischen und Zahnbehandlungen unterworfen sind, unter Verwendung von Speichelcortisolspiegeln bewerten.

## 5. Zusammenfassung

Ziel der Studie war die Bestimmung des Tageskortisolspiegels im Speichel bei 10–14 Jahre alten Kindern. Die Probandenrekrutierung erfolgte aus regionalen und überregionalen Schulen. Ausschlusskriterien waren endokrine Störungen, laufende ärztliche oder zahnärztliche Behandlungen, Medikamenteneinnahmen und unzureichende Mundhygiene. Zu definierten Zeiten wurden zwanzig Speichelproben während eines Tages gesammelt, die Entnahmezeit wurde von den Patienten entsprechend der Anweisungen protokolliert. Die Kortisolbestimmung erfolgte mittels eines kommerziellen Testkits (IBL Immuno Biological Laboratories, Hamburg, Deutschland) nach Herstellerprotokoll.

Dabei zeigte sich im täglichen Verlauf der Speichelcortisol Konzentration innerhalb von 20 Minuten nach dem Aufwachen ein Maximum von 9,69 ( $\pm 3,89$ ) nmol/l. Nach 90 Minuten nahm die Cortisolkonzentration linear um 50% ab und stagnierte für 3 bis 8 Stunden bei 4,14 ( $\pm 1,93$ ) nmol/l. Danach nahmen die Speichelcortisol Konzentrationen allmählich ab, wobei sie nach 14 Stunden nahezu ein Minimum von Null erreichten. Insgesamt wurden keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in den Speichelcortisolspiegeln nachgewiesen.

Die Ergebnisse der Studie liefern das tägliche Kortisolsekretionsmuster im Speichel von 10- bis 14-jährigen Kindern und stellen nunmehr die Vergleichsbasis für die Messung von Stress anhand von Kortisolspiegelveränderungen nach kieferorthopädischen Therapiemaßnahmen dar.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Fernandes LM, Øgaard B, Skoglund L. Pain and discomfort experienced after placement of a conventional or a superelastic NiTi aligning archwire. A randomized clinical trial. *J Orofac Orthop* 1998 **59**: 331-339.
- [2] Goodyer IM, Herbert J, Altham PM, et al. Adrenal secretion during major depression. *Psychol Med* 1996 **26**: 245-256.
- [3] Huskisson EC. Visual analogue scale. In: Melzack R, ed. *Pain Measurement and Assessment*. New York: Raven Press, 1983:33-37.
- [4] Klepac RK, Dowling J, Hauge G, et al. Reports of pain after dental treatment, electrical tooth pulp stimulation, and cutaneous shock. *J Am Dent Assoc* 1980 **100**: 692-695.
- [5] Kvam E, Gjerdet NR, Bondevik O. Traumatic ulcers and pain during orthodontic treatment. *Community Dent Oral Epidemiol* 1987 **15**: 104-107.
- [6] Lew KK. Attitudes and perceptions of adults towards orthodontic treatment in an Asian community. *Community Dent Oral Epidemiol* 1993 **21**:31-35.
- [7] Litt MD. A model of pain and anxiety associated with acute stressors: distress in dental procedures. *Behav Res Ther* 1996 **34**:459-476.

- [8] Netherton C, Goodyer I, Tamplin A, et al. Salivary cortisol and dehydroepiandrosterone in relation to puberty and gender. *Psychoneuroendocrinology* 2004 **29**: 125-140.
- [9] Scheurer PA, Firestone AR, Bürgin WB. Perception of pain as a result of orthodontic treatment with fixed appliances. *Eur J Orthod* 1996 **18**:349-357.
- [10] Vassend O. Anxiety, pain and discomfort associated with dental treatment. *Behav. Res Ther* 1993 **31**: 659-666.
- [11] Vining RF, McGinley RA, Maksytyis JJ, et al. Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. *Ann Clin Biochem* 1983 **20** (Pt 6):329- 335.
- [12] Westermann J, Demir A, Herbst V. Determination of cortisol in saliva and serum by a luminescence-enhanced enzyme immunoassay. *Clin Lab* 2004 **50**:11-24.
- [13] Gunnar M R, Bruce J, Hickman S E. Salivary cortisol response to stress in children. *Adv Psychosom Med* 2001 **22**: 52-60.
- [14] Schmidt N A. Salivary cortisol testing in children. *Issues Compr Pediatr Nurs* 1997 **20**: 183-190.
- [15] Scheer F A, Buijs R M. Light affects morning salivary cortisol in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1999 **84**: 3395-3398.
- [16] Schmidt-Reinwald A, Pruessner J C, Hellhammer D H et al. The cortisol response to awakening in relation to different challenge tests and a 12-hour cortisol rhythm. *Life Sci* 1999 **64**: 1653-1660.

- [17] Pruessner J C, Wolf O T, Hellhammer D H *et al.* Free cortisol levels after awakening: a reliable biological marker for the assessment of adrenocortical activity. *Life Sci* 1997 **61**: 2539-2549.
- [18] Vining R F, McGinley R A, Maksvytis J J *et al.* Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. *Ann Clin Biochem* 1983 **20** (Pt 6): 329-335.
- [19] Hashem A A, Claffey N M, O'Connell B. Pain and anxiety following the placement of dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006 **21**: 943-950.
- [20] Gutteling B M, de Weerth C, Buitelaar J K. Prenatal stress and children's cortisol reaction to the first day of school. *Psychoneuroendocrinology* 2005 **30**: 541-549.
- [21] Bakke M, Tuxen A, Thomsen C E *et al.* Salivary cortisol level, salivary flow rate, and masticatory muscle activity in response to acute mental stress: a comparison between aged and young women. *Gerontology* 2004 **50**: 383-392.
- [22] Brand H S, Gortzak R A, Palmer-Bouva C C *et al.* Cardiovascular and neuroendocrine responses during acute stress induced by different types of dental treatment. *Int Dent J* 1995 **45**: 45-48.
- [23] Brand H S. Anxiety and cortisol excretion correlate prior to dental treatment. *Int Dent J* 1999 **49**: 330-336.
- [24] Veerman E C, van den Keybus P A, Vissink A *et al.* Human glandular salivas: their separate collection and analysis. *Eur J Oral Sci* 1996 **104**: 346-352.

- [25] Gröschl M, Rauh M, Dörr H G. Circadian rhythm of salivary cortisol, 17a-hydroxyprogesterone, and progesterone in healthy children. *Clin Chem* 2003 **49**: 1688-1691.
- [26] Kiess W, Meidert A, Dressendorfer R A *et al*. Salivary cortisol levels throughout childhood and adolescence: relation with age, pubertal stage, and weight. *Pediatr Res* 1995 **37**: 502-506.
- [27] Kiess W, Pfaeffle R. Steroid analysis in saliva: a noninvasive tool for pediatric research and clinical practice. *J Pediatr (Rio J)* 2007 **83**: 97-99.
- [28] Hanrahan K, McCarthy A M, Kleiber C *et al*. Strategies for salivary cortisol collection and analysis in research with children. *Appl Nurs Res* 2006 **19**: 95-101.
- [29] Walker R F. Salivary cortisol determinations in the assessment of adrenal activity. In Ferguson D B (ed) *Steroid Hormones in Saliva*. pp 33-50. Basel: Karger, 1984.
- [30] Westermann J, Demir A, Herbst V. Determination of cortisol in saliva and serum by a luminescence-enhanced enzyme immunoassay. *Clin Lab* 2004 **50**: 11-24.
- [31] Törnhage C J, Alfvén G. Diurnal salivary cortisol concentration in school-aged children: increased morning cortisol concentration and total cortisol concentration negatively correlated to body mass index in children with recurrent abdominal pain of psychosomatic origin. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2006 **19**: 843-854.

- [32] Netherton C, Goodyer I, Tamplin A *et al.* Salivary cortisol and dehydroepiandrosterone in relation to puberty and gender. *Psychoneuroendocrinology* 2004 **29**: 125-140.
- [33] Kirschbaum C, Hellhammer D H. Salivary cortisol in psychobiological research: an overview. *Neuropsychobiology* 1989 **22**: 150-169.
- [34] Santiago L B, Jorge S M, Moreira A C. Longitudinal evaluation of the development of salivary cortisol circadian rhythm in infancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996 **44**: 157-161.
- [35] Suzuki K, Maekawa K, Minakuchi H *et al.* Responses of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and pain threshold changes in the orofacial region upon cold pressor stimulation in normal volunteers. *Arch Oral Biol* 2007 **52**: 797-802.
- [36] Kudielka B M, Kirschbaum C. Awakening cortisol responses are influenced by health status and awakening time but not by menstrual cycle phase. *Psychoneuroendocrinology* 2003 **28**: 35-47.
- [37] Edwards S, Evans P, Hucklebridge F *et al.* Association between time of awakening and diurnal cortisol secretory activity. *Psychoneuroendocrinology* 2001 **26**: 613-622.
- [38] Edwards S, Clow A, Evans P *et al.* Exploration of the awakening cortisol response in relation to diurnal cortisol secretory activity. *Life Sci* 2001 **68**: 2093-2103.
- [39] Kudielka B M, Broderick J E, Kirschbaum C. Compliance with saliva sampling protocols: electronic monitoring reveals invalid cortisol

- daytime profiles in noncompliant subjects. *Psychosom Med* 2003 **65**: 313-319.
- [40] Greabu M, Purice M, Totan A *et al*. Salivary cortisol-marker of stress response to different dental treatment. *Rom J Intern Med* 2006 **44**: 49-59.
- [41] Tzortzi C. et al: Cortisol daily rhythm in saliva of healthy school children, *International Dental Journal* 2009, **59**:12-18

## **7. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis**

### **7.1 Tabellen**

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Tabelle 1. | Alter der Patienten in der Testgruppe   | 6  |
| Tabelle 2. | Auswertung von Geschlechtsunterschieden für Aufwachzeit und Cortisolkonzentration                               | 13 |
| Tabelle 3. | Vergleich der Speichelcortisol-Referenzwerte von Gröschl et al., und Netherton et al., mit Daten dieser Studie. | 21 |

### **7.2 Abbildungen**

|              |   |    |
|--------------|---|----|
| Abbildung 1. | Kalibrierungsdaten von allen elf Assays                             | 10 |
| Abbildung 2. | Kortisol-Spiegel im Speichel von Schulkindern                       | 12 |
| Abbildung 3. | Speichelcortisolprofil eines Teilnehmers                            | 15 |
| Abbildung 4. | Mittlerer Tagescortisolspiegel in Speichelprofilen von Schulkindern | 17 |

## **8. Danksagung**

Ich möchte mich besonders bei Herrn Professor Dr. Dr. Peter Proff für die stets freundliche und hilfsbereite Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Ein besonderer Dank ist an Herrn Professor Dr. med. dent. D. Müßig für die Überlassung der Arbeit danken.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Uwe Baumert für die intensive und fachspezifische Betreuung der Arbeit danken.

Bei Frau Bernadette Fürnstein, möchte ich mich für die biometrische Auswertung der klinisch erhobenen Daten bedanken.

Zu Letzt möchte ich mich bei Herr Dr. med. dent. Antonios Moralis und Frau Eirini Zakyri bedanken für die Unterstützung meiner Arbeit.

Ein herzlicher Dank gilt auch meiner Familie und meinem Freund für ihre Geduld und ihr motivierendes Engagement während meiner Studien- und Weiterbildungszeit.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

|                             |                   |
|-----------------------------|-------------------|
| <b>Name:</b>                | Christina Tzortzi |
| <b>Geburtsdatum:</b>        | 10.06.1977        |
| <b>Geburtsort:</b>          | Toronto Kanada    |
| <b>Staatsangehörigkeit:</b> | Griechisch        |
| <b>Familienstand:</b>       | Ledig             |

### Bildungsweg

---

|                           |   |
|---------------------------|---|
| September 1984-Juni 1990  | Grundschule Preveza, Griechenland   |
| September 1990-Juni 1993  | 1. Gymnasium Preveza, Griechenland  |
| September 1993-Juni 1995  | 1. Lyzeum Preveza, Griechenland   |
| Juni 1995                 | Abitur  |
| Oktober 1996-Oktober 2001 | Studium der Zahnheilkunde an der National und Kapodistrian Universität Athen-Griechenland |
| Juni 2002                 | Approbation als Zahnärztein   |

## Berufliche Tätigkeiten

- |                           |   |
|---------------------------|---|
| Juni 2002-September 2004  | Tätigkeit als Zahnärztin in der Praxis von Dr. Dr. Elefterios Vairaktaris in Athen, Griechenland          |
| Oktober 2004-Oktober 2007 | Weiterbildungsassistentin an der Poliklinik für Kieferorthopädie des Klinikums der Universität Regensburg |
| Dezember 2007             | Facharztprüfung für Kieferorthopädie an der Bayerischen Landeszahnärztekammer                             |
| Seit Juli 2008            | In eigener Praxis in Patras, Griechenland   |

## 10. Anhang 1: Artikel

International Dental Journal (2009) 59, 12-16

# Cortisol daily rhythm in saliva of healthy school children

Ch Tzortzi and P Proff  
Regensburg, Germany

M Redlich, DJ Aframian and A Palmon  
Jerusalem, Israel

I Golan  
Zurich, Switzerland

D Muessig  
Linz, Austria

A Wichelhaus and U Baumert  
Munich, Germany

**Aim:** To investigate the daily rhythm of cortisol levels in saliva of school children. **Subjects and methods:** Probands (10–14 years, both genders) were recruited via personal contact and school visits. Exclusion criteria included hormonal and dental treatments during the trial, pharmaceuticals containing cortisol, or poor oral hygiene. Each volunteer collected 20 saliva samples during one day at defined times starting immediately after waking up and ending at night. Additionally, they completed a sampling diary. Saliva samples were analysed in duplicate using a commercial cortisol luminescence kit. **Results:** Cortisol concentration in saliva followed a daily rhythm. Within 20 minutes after waking up cortisol reached the highest level of 9.69 ( $\pm 3.89$ ) nmol/L. After 90 minutes cortisol concentration decreased linearly by 50% and stagnated at 4.14 ( $\pm 1.83$ ) nmol/L for 3 to 8 hours. Thereafter, levels decreased gradually reaching almost zero after 14 hours. Overall, no gender-specific differences in saliva cortisol levels were observed except for 3 time points: 3, 10 and 11 hours after waking. **Conclusion:** This study establishes guidelines for a normal secretion pattern, plus explores pain level measurements and their correlation to saliva cortisol levels in this age group.

**Key words:** Cortisol, saliva, dental care, pain

A key component of the human stress reaction system is the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) system and the subsequent release of the steroid hormone cortisol<sup>1,2</sup>. In healthy adults, cortisol secretion, both in saliva and blood, shows a strong diurnal rhythm with an 8–10 times decrease between morning and evening/night concentrations<sup>3–5</sup>. Salivary cortisol levels correlate directly to the active biological derivative, meaning the unbound (free) cortisol concentration<sup>6</sup>. Therefore, saliva cortisol can be employed to assess responses to stressful stimuli or to determine the effectiveness of interventions intended to reduce stress in different fields such as psychology, sports medicine, paediatrics, ageing medicine, and dentistry<sup>7–11</sup>.

Even anticipation of dental treatment was found to be a significant stimulus for the adrenal cortex to release cortisol<sup>10</sup>. Collecting saliva is an easy, non-invasive, stress-free technique<sup>12</sup> and has proven to be convenient for diagnostics in children<sup>13–15</sup>. Furthermore, this procedure can be timed without depending on the availability of a laboratory or health care professional<sup>16</sup>.

A prerequisite for studies evaluating changes in salivary cortisol as a response to stress is the determination of detailed daily normal secretion levels in a healthy population similar to the experimental group. For healthy adults, detailed determinations of this rhythm exist<sup>17,18</sup>, but for children ranging in age from 10 to 14 years, only reference values, determined at three different times,

are available<sup>13,14,19,20</sup>. As expected, these determinations show a clear diurnal rhythm. However, clinical/office practice and individual variations in daily activity (e.g. time schedule for school) require a maximum time range and more tightly scheduled measurements to allow for flexibility in sampling with low baseline salivary cortisol concentration and little individual variability.

Therefore, the objective of this study was to establish detailed levels of daily salivary cortisol secretion in school children in order to determine the precise time range of its lowest concentration and individual variability. This study establishes a baseline for normalised saliva cortisol concentration in order to perform further studies in this particular age group, and may help in assessing stress levels in future studies.

### Subjects and methods

#### Ethics approval

Approval for this project was given by the local ethics committee of the Regensburg University Medical Center and informed consent was obtained from all participants and their parents.

#### Subjects

School children of both genders between 10 and 14 years of age were recruited from local schools, direct communication with colleagues and their acquaintances, and a local dental office. The exclusion criteria (chronic diseases, medication intake, hormone therapy, allergies, or any invasive medical procedure) were enforced based on a personal interview. Regarding the oral cavity, no participant reported any current dental procedures, pain or spontaneous gingival bleeding. The research outline and the protocol leaflets were explained to more than 100 potential test persons, of whom 30 gave informed consent. We excluded six test persons: four of them due to medication intake, and two because of diabetes. However, only 23 returned their saliva samples. Two of these samples were not included in the study because the protocol diary was not available, although the samples were used for assay validation purposes. The remaining 21 participants were analysed as described below.

#### Sample collection

Each participant was given 22 saliva collecting sets consisting of a SaliCap® collection tube (IBL Immuno Biological Laboratories, Hamburg, Germany) and one short plastic straw. They were instructed to start sampling immediately after waking up: during the first three hours, one sample each 20 minutes, then one sample each hour until bedtime. The children used the plastic straw provided to expel the saliva into the collection tubes. Altogether, 20 samples were collected over a

period of one day. In accordance with Gröschl *et al.*<sup>13</sup> we tried to exclude any additional stressful event that might affect cortisol levels. Since this tight sampling schedule interfered with school routine, sampling took place on weekends, holidays or during vacations. Each sample contained 500 µL of saliva. The participants were instructed to keep a diary on the sampling day, which included saliva sampling times, meal times, possible medication, physical exercise like running or cycling, and any other incidents involving physical activity.

To exclude possible interference with the cortisol quantification, the following guidelines were established before sampling: Red coloured samples, i.e. samples containing blood, were discarded, and 10 min after mouth rinsing with pure cold water another sample was drawn; no tooth brushing or flossing before sampling; eating only immediately after sampling, otherwise a thorough mouth rinse with cold water 5 min prior to sample collection.

#### Saliva cortisol determination

All samples were stored at home at 4–8°C in a refrigerator immediately after each sampling, and thereafter were delivered and kept at -20°C until final analysis. Immediately prior to analysis, the samples were thawed, mixed, and centrifuged for 10 min at 5,000 rpm using a 'Biofuge fresco' table-top centrifuge (Kendro, Osterode, Germany) at 4°C. The clear supernatants were transferred to fresh tubes.

Saliva cortisol determination was completed using a commercial cortisol luminescence immunoassay (part no. RE62011, IBL Immuno Biological Laboratories, Hamburg, Germany) according to the manufacturer's instructions. Each assay consisted of the quantification standards (ranging from 0–40 ng/mL), a low and a high cortisol-positive control (concentrations varied with lot), and samples from two participants. All standards and samples were assayed in duplicate, and all samples from the same individual were run in the same assay using 20 µL of saliva per well. All individual measurements and standard curve calculations were done with a Tecan GENios™ multimode microplate reader (Tecan, Grödig/Salzburg, Austria) in luminometer mode using Magellan software V4.1 (Tecan, Grödig/Salzburg, Austria). In all assays ( $n = 11$ ) the inter- and intra-assay variability was less than 15%. The standard curve in Figure 1 summarises all assays. It was calculated as a four-parameter logistic curve using SigmaStat for Windows 3.5 (Systat Software, Inc., Point Richmond, CA, USA).

#### Statistics

For each individual, the actual sampling times were related to waking time<sup>8</sup>. Descriptive statistics including mean and standard deviation were calculated using SPSS for Windows 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). SPSS's

GLM (general linear model) procedure for repeated measures was used to test for potential interaction (gender by time), followed by Mann-Whitney U tests as a post hoc procedure, when necessary. The influence of waking time on cortisol and for gender differences in waking time and cortisol was tested using Mann-Whitney's U-test. Results were considered significant for  $p \leq 0.05$ . All figures were prepared with SigmaPlot for Windows 10.0 (Systat Software, Inc., Point Richmond, CA, USA).

## Results

Saliva samples from 11 males (age range: 10y 3m – 13y 7m) and 10 females (age range: 10y 3m – 13y 3m) with

completed protocol diary were included in this study. Altogether, 402 saliva samples from 21 participants were analysed using the cortisol luminescence kit as described in the Subjects and Methods section.

Individuals showed a broad range of daily activity, with self-reported waking times ranging from 6:30 to 10:15 in the morning. We tested for gender differences in waking times and cortisol concentration using Mann-Whitney's U-test and found no statistical significant differences between gender for both measures (Table 1). No significant differences were found in morning cortisol of early and late awakers ( $p = 0.699$ ) using a median split at 8:24 awakening time (Table 1) either. In order to compensate for the individual variations, sampling times were normalised against waking time, set to 0:00 hours.

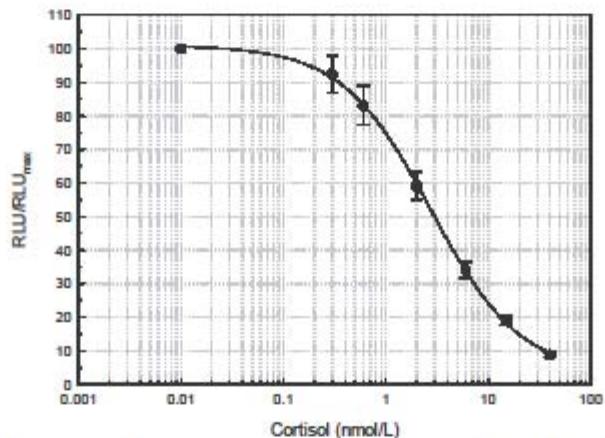


Figure 1. This standard curve summarises the calibration data from all eleven assays ( $R = 0.9946$ ). In each assay, the standards were determined in duplicate, and the cortisol concentrations in the saliva samples were calculated using a four-point parameter logistic regression curve. Inter- and intra-assay variation were less than 15%. The standard curve shown here was calculated using SigmaStat.

Table 1 Evaluation of gender differences for waking time and cortisol concentration.

|                    |               | N  | Mean  | S.D. | Min  | Max   | Median | Mann-Whitney U-test |
|--------------------|---------------|----|-------|------|------|-------|--------|---------------------|
| Waking time (hrs)  | Male          | 11 | 8.44  | 1.13 | 6.15 | 10.14 | 9.00   | $p = 0.426$         |
|                    | Female        | 10 | 8.20  | 1.08 | 6.30 | 10.10 | 8.08   |                     |
|                    | Total         | 21 | 8.32  | 1.10 | 6.15 | 10.14 | 8.24   |                     |
| Cortisol (nmol/mL) | Male          | 11 | 9.05  | 3.63 | 4.4  | 15.6  | 8.52   | $p = 0.387$         |
|                    | Female        | 10 | 10.24 | 4.86 | 1.3  | 20.6  | 9.45   |                     |
|                    | Total         | 21 | 9.62  | 4.19 | 1.3  | 20.6  | 9.03   |                     |
| Cortisol (nmol/mL) | Early awakers | 11 | 9.28  | 4.77 | 1.3  | 20.6  | 8.76   | $p = 0.699$         |
|                    | Late awakers  | 10 | 9.99  | 3.67 | 4.4  | 15.6  | 10.11  |                     |
|                    | Total         | 21 | 9.62  | 4.19 | 1.3  | 20.6  | 9.03   |                     |

Although children were instructed to provide saliva samples according to a strict sampling schedule, not all participants adhered to this timetable. Therefore, only those samples which were drawn within the following limits were included for further analysis: during the first three hours (20min sampling interval) samples within  $\pm$  5min, and during the remaining sampling time (1 hour sampling interval)  $\pm$  15min. Due to the well-known phenomenon of increased saliva cortisol levels after physical exercise<sup>21</sup>, all samples drawn during highly physical activity were excluded when such an activity was explicitly noted in the diary. This procedure is ex-

emplified in Figure 2, which shows an example profile of activities and salivary cortisol levels of a male volunteer. The numbers adjacent to some of the samples represent the notations the proband wrote down in his diary. They were translated from German to English without any further modifications or additions. Here, the samples labelled with '4' and '5' were removed before further analysis.

From 420 possible samples (21 probands with 20 samples each), 402 samples were returned by the probands (= 95.7%). In 37 samples the noted sampling times in the probands sampling diary did not coincide

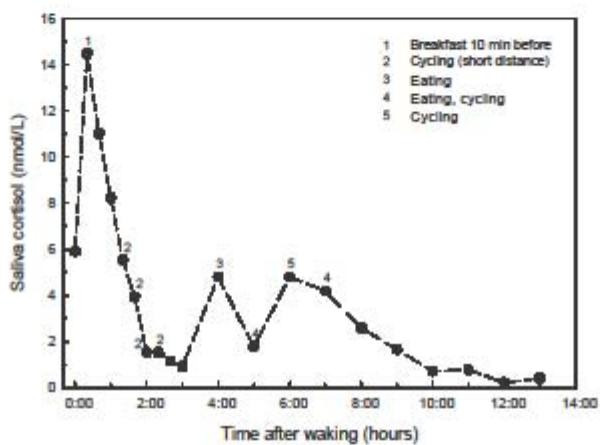


Figure 2. Saliva cortisol profile of one participant. Each saliva sample is represented (•). Numbers denote entries in the sampling diary. Samples without numbers had no written remarks. The remarks labelled "1"–"6" were translated from German to English and represent the original written entries in the sampling diary of this volunteer. For further analysis, saliva samples collected during physical stress (e.g. cycling) were removed from all data sets, i.e. all data points labelled with "4" or "5" in this case.

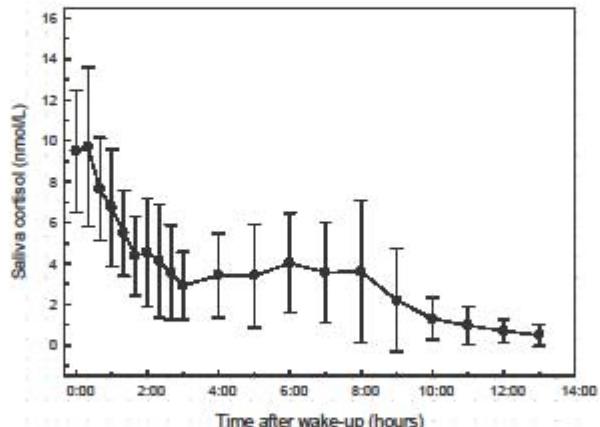


Figure 3. Mean diurnal cortisol levels in saliva profiles of school children (n = 21; age range: 10y 3m – 13y 7m; 337 samples). The symbols indicate the mean and the bars the  $\pm$  1SD range.

with the study protocol (= 365 samples, 86.9%). Additionally, 28 cortisol samples directly correlated with physical activity were removed before further analysis (Figure 2). For final analysis, 337 (= 80.2 %) samples from 21 participants remained (Figure 3).

Within 20 min after waking up the cortisol concentration given as mean ( $\pm$  S.D.) reached its maximum of 9.69 ( $\pm$  3.89) nmol/L, and decreased by 50 % after an additional 60 minutes. During the remaining part of the day, saliva cortisol levels dropped to 1/20<sup>th</sup> of the initial concentration (Figure 3). Between 3 and 6 hours after waking up the saliva cortisol stagnated at 4.03 ( $\pm$  2.44) nmol/L (Figure 3). The potential interaction between gender and time was tested using SPSS's GLM procedure for repeated measures. No gender specificity was found ( $p = 0.550$ ).

### Discussion

The diurnal rhythmic pattern of cortisol secretion in blood and saliva has been extensively evaluated in adults<sup>18</sup> and infants<sup>22</sup>. In school children, however, only minimal information is available. Despite extensive literature searches, no data on 24-hour or daytime saliva cortisol rhythm was found. Instead, only reference values for three time points (morning, noon and evening) were available<sup>13,14,19,20</sup>. This data indicates high individual variability in the morning and reduced variability in saliva cortisol concentrations in the afternoon and at night. However, this data lacks a defined period of time during the day where stable hormone secretion and low baseline saliva cortisol levels can be identified, which provides more flexibility in sampling than a definition using an explicit sampling time<sup>23</sup>.

Therefore, the present study was conducted to determine the daily profile of saliva cortisol levels in 21 healthy school children (age range 10–14 years). This profile (Figure 3) showed broad individual variability. Overall, the maximal saliva cortisol concentration was reached 20 minutes after waking up with 9.69 ( $\pm$  4.19) nmol/L. Interestingly, however, no gender differences in saliva cortisol levels were observed. For each individual, sampling times were normalised against waking time, resulting in a similar course as previously published for adults<sup>17,18</sup>. Gröschl *et al.*<sup>13</sup> and Netherton *et al.*<sup>20</sup> published reference values for defined times of days. Table 2 summarises the relevant data from their publications and this study. The morning saliva values (Table 2) reported in this study were 1.7 times less than those from Gröschl *et al.*<sup>13</sup> (7:00 am), but similar to those reported by Netherton *et al.*<sup>20</sup> for sampling at 8:00 am. The evening cortisol concentrations reported were higher (Gröschl's data) or similar (Netherton's data) to those in this study. Netherton *et al.*<sup>20</sup> used ratios of morning to evening levels (am/pm; 8:00 vs. 20:00) to evaluate the diurnal rhythm of cortisol. Using the mean data from Table 2, the ratios were calculated (Table 2, last column). In comparison to Gröschl's and Netherton's data the ratios calculated from data of this study were higher but in the same order of magnitude.

In general, human adult salivary cortisol reaches its maximum level within 30 to 60 minutes after waking up and decreases rapidly until noon, and then remains at a low level through the next morning<sup>1–4</sup>. Westermann *et al.*<sup>18</sup> reported a maximum cortisol level of 27.6 ( $\pm$  12.1) nmol/L 50 minutes after waking up. Over the next 2.5 hours the saliva cortisol decreased to < 7 nmol/L, and reached its minimum level of < 2 nmol/L 15 hours

**Table 2** Comparison of saliva cortisol reference values from Gröschl *et al.*<sup>13</sup> and Netherton *et al.*<sup>20</sup> with this study. The ratios of morning vs. evening cortisol (am/pm) were calculated using the mean cortisol concentrations at given times.

|   | Time of day<br>(hrs) | N   | Cortisol (nmol/L) |       | Ratio<br>(am/pm)     |
|---|----------------------|-----|-------------------|-------|----------------------|
|   |                      |     | Mean              | S.D.  |                      |
| This study  | 7:00                 | 3   | 13.21             | 6.64  | 7:00 vs. 19:00: 13.6 |
|   | 8:00                 | 11  | 7.60              | 3.58  | 8:00 vs. 20:00: 9.2  |
|   | 13:00                | 21  | 3.36              | 2.09  |                      |
|   | 19:00                | 19  | 0.97              | 0.73  |                      |
|   | 20:00                | 16  | 0.83              | 0.61  |                      |
| Gröschl <i>et al.</i> <sup>13</sup><br>(aged 11–13)     | 7:00                 | 52  | 23.3              | 7.8   | 7:00 vs. 19:00: 11.1 |
|   | 13:00                | 52  | 6.0               | 3.3   |                      |
|   | 19:00                | 52  | 2.1               | 1.9   |                      |
| Gröschl <i>et al.</i> <sup>13</sup><br>(aged 14–15)     | 7:00                 | 40  | 23.2              | 7.0   | 7:00 vs. 19:00: 11.0 |
|   | 13:00                | 40  | 7.8               | 3.8   |                      |
|   | 19:00                | 40  | 2.1               | 1.7   |                      |
| Netherton <i>et al.</i> <sup>20</sup><br>(all subjects) | 8:00                 | 126 | 9.12*             | 0.30* | 8:00 vs. 20:00: 7.7  |
|   | 20:00                | 126 | 1.19*             | 0.08* |                      |

\* Calculated from Netherton *et al.*<sup>20</sup> to give saliva cortisol in nmol/L.

after waking up. Figure 3 shows a similar course, with one exception: between 3–6 hours after waking up the saliva cortisol concentration remained elevated. This may be attributed to the sampling regime, since the samples were collected on weekends and days off for holidays or vacation. This design was chosen to exclude any potential stressful events that might occur due to the tight sampling interval immediately after waking up on school days<sup>13</sup>. It is reasonable to assume that the daily routine during normal school days might be somewhat different than on weekends or vacation, therefore resulting in variations with respect to waking time and other daily activities, especially meal times. Several authors reported, that in adults earlier waking times result in higher morning saliva concentrations<sup>24,25</sup>, but cortisol secretion pattern remained reasonably stable throughout the day intra-individually<sup>25,26</sup>. One reference included children<sup>27</sup>, and they reported, that in-/exclusion of the thirteen children did not change their results. The age range of these children was not mentioned. As such, it can be assumed that the secretion pattern determined on free days is reasonably stable for the determination of a low baseline secretion period. This period starts at 6 hours after waking up and lasts until bedtime. This corresponds to 1:00 pm during school days, assuming that school begins at 8:00 am and about one hour is necessary for preparing and going to school after waking up<sup>13,14,19,20</sup>. If school-specific stressful situations like examinations or sports are excluded, this time frame could be extended for 1–2 hours in the morning, i.e. earliest 11:00–12:00 am.

We observed highly individual variability concerning adherence to sampling times and keeping a sampling diary in this study. The sampling diary was kept by all 21 participants: twenty of them wrote down all sampling times, but only 14 protocols completely adhered to the study protocol. Remarks were noted by 19 participants, ranging from a single entry in the diary up to specific entries for each sampling time. No gender-specific differences were observed in this context. As previously described, 19.8% of the samples were removed before analysis due to inconsistencies during sampling (incomplete sampling, incorrect sampling times) and physical activity. In future studies, necessary precautions should be taken to cope with such individual differences.

In saliva, the duration and type of treatment, the application of general or local anaesthesia, or dental anxiety all were reported to influence cortisol concentration<sup>7,11,28</sup>. However, a quantitative correlation between stress and cortisol levels has not yet been established. Notably, in most of the experiments saliva collection was implemented between 8:00 am and 11:00 am. This period is characterised by high individual variability of saliva cortisol concentration which might obscure slight changes in concentration.

### Summary and outlook

The aim of this study was to identify and define the time range in which saliva cortisol concentration and its individual variation is low. Starting at 6 hours after waking up and lasting until going to sleep, relatively low cortisol levels were found in male and female children aged 10 to 14 years old. This observation suggests a suitable timeframe which is compatible with daily work schedules and settings in dental clinics. The normal values defined in this study may represent important reference values for further studies assessing pain and stress in children undergoing medical and dental procedures using salivary cortisol levels.

### Acknowledgements

The authors wish to thank the volunteers and their parents for their participation in this study. The technical assistance of B. Fürnstein in performing cortisol measurements is gratefully acknowledged. The continuing support and encouragement of IBL Hamburg during this study and particularly J. Westermann (IBL Hamburg) for critically reading the manuscript is also very much appreciated.

### References

1. Gunnar MR, Bruce J, Hickman SE. Salivary cortisol response to stress in children. *Adv Psychosom Med* 2001; 22: 52–60.
2. Schmidt NA. Salivary cortisol testing in children. *Issues Compr Pediatr Nurs* 1997; 20: 183–190.
3. Scheer FA, Buijs RM. Light affects morning salivary cortisol in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3395–3398.
4. Schmidt-Reinwald A, Proessner JC, Hellhammer DH *et al*. The cortisol response to awakening in relation to different challenge tests and a 12-hour cortisol rhythm. *Life Sci* 1999; 64: 1653–1660.
5. Proessner JC, Wolf OT, Hellhammer DH *et al*. Free cortisol levels after awakening: a reliable biological marker for the assessment of adrenocortical activity. *Life Sci* 1997; 61: 2539–2549.
6. Vining RF, McGinley RA, Maksvytis JJ *et al*. Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. *Ann Clin Biochem* 1983; 20: 329–335.
7. Hashem AA, Claffey NM, O'Connell B. Pain and anxiety following the placement of dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006; 21: 943–950.
8. Gutteling BM, de Weerth C, Buitelaar JK. Prenatal stress and children's cortisol reaction to the first day of school. *Psychoneuroendocrinology* 2005; 30: 541–549.
9. Bakke M, Thunen A, Thomsen CE *et al*. Salivary cortisol level, salivary flow rate, and masticatory muscle activity in response to acute mental stress: a comparison between aged and young women. *Gerontology* 2004; 50: 383–392.
10. Eiland HS, Goetzak RA, Palmer-Brown CC *et al*. Cardiovascular and neuroendocrine responses during acute stress induced by different types of dental treatment. *Int Dent J* 1995; 45: 45–48.
11. Eiland HS. Anxiety and cortisol excretion correlate prior to dental treatment. *Int Dent J* 1999; 49: 330–336.
12. Veerma EC, van den Keybus PA, Vissink A *et al*. Human glandular salivas: their separate collection and analysis. *Eur J Oral Sci* 1996; 104: 346–352.

Tzortzi *et al*: Cortisol daily rhythm in saliva of healthy school children

13. Gröschl M, Rank M, Dörk HG. Circadian rhythm of salivary cortisol, 17-hydroxyprogesterone, and progesterone in healthy children. *Clin Chem* 2003; 49: 1688-1691.
14. Kiess W, Meidert A, Dressendorfer RA *et al*. Salivary cortisol levels throughout childhood and adolescence: relation with age, pubertal stage, and weight. *Pediatr Res* 1995; 37: 502-506.
15. Kiess W, Pfeiffel R. Steroid analysis in saliva: a noninvasive tool for pediatric research and clinical practice. *J Pediatr (Rio J)* 2007; 83: 97-99.
16. Hamzah K, McCarthy AM, Kleiber C *et al*. Strategies for salivary cortisol collection and analysis in research with children. *Appl Nurs Res* 2006; 19: 95-101.
17. Walker RF. Salivary cortisol determinations in the assessment of adrenal activity. In Ferguson DB (ed) *Steroid Hormones in Saliva*. pp 33-50. Basel: Karger, 1984.
18. Westermann J, Demir A, Herbst V. Determination of cortisol in saliva and serum by a luminescence-enhanced enzyme immunoassay. *Clin Lab* 2004; 50: 11-24.
19. Törnås CJ, Alfvén G. Diurnal salivary cortisol concentration in school-aged children: increased morning cortisol concentration and total cortisol concentration negatively correlated to body mass index in children with recurrent abdominal pain of psychosomatic origin. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2006; 19: 843-854.
20. Netherton C, Goodyer I, Tamplin A *et al*. Salivary cortisol and dehydroepiandrosterone in relation to puberty and gender. *Psychoneuroendocrinology* 2004; 29: 125-140.
21. Kirschbaum C, Hellhammer DH. Salivary cortisol in psychobiological research: an overview. *Neuropsychobiology* 1989; 22: 150-169.
22. Santiago LB, Jorge SM, Moreira AC. Longitudinal evaluation of the development of salivary cortisol circadian rhythm in infancy. *Clin Endocrinol* 1996; 44: 157-161.
23. Suzuki K, Maekawa K, Minakuchi H *et al*. Responses of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and pain threshold changes in the orofacial region upon cold pressor stimulation in normal volunteers. *Arch Oral Biol* 2007; 52: 797-802.
24. Kudielka BM, Kirschbaum C. Awakening cortisol responses are influenced by health status and awakening time but not by menstrual cycle phase. *Psychoneuroendocrinology* 2003; 28: 35-47.
25. Edwards S, Evans P, Hucklebridge F *et al*. Association between time of awakening and diurnal cortisol secretory activity. *Psychoneuroendocrinology* 2001; 26: 613-622.
26. Edwards S, Clow A, Evans P *et al*. Exploration of the awakening cortisol response in relation to diurnal cortisol secretory activity. *Life Sci* 2001; 68: 2093-2103.
27. Kudielka BM, Broderick JE, Kirschbaum C. Compliance with saliva sampling protocols: electronic monitoring reveals invalid cortisol daytime profiles in noncompliant subjects. *Psychosom Med* 2003; 65: 313-319.
28. Greabu M, Puzice M, Totan A *et al*. Salivary cortisol marker of stress response to different dental treatment. *Rom J Intern Med* 2006; 44: 49-59.

Correspondence to: Dr. Uwe Baumert, Department of Orthodontics, Munich University Medical Center (LMU), Goethestr. 70, 80336 Munich, Germany. Email: UweBaumert@hotmail.com

## 11. Anhang 2: Fragebogen

### 1) Anamnesebogen

|  |                               |                                    |
|--|-------------------------------|------------------------------------|
| <b>Diurnaler Kortisol-Rhythmus im Speichel gesunder Schulkinder</b>  |                               |                                    |
| <b>Anamnese-Bogen</b>  |                               |                                    |
| Studien-Id.:   | <hr/>                         |                                    |
| Name des Kindes:   | <hr/>                         |                                    |
| Geburtsdatum:  | <hr/>                         |                                    |
| Name und Anschrift der Eltern:   | <hr/> <hr/>                   |                                    |
| Telefon:   | <hr/>                         |                                    |
|  |                               |                                    |
| Leidet Ihr Kind unter chronischen Erkrankungen?  | <input type="checkbox"/> nein | <input type="checkbox"/> ja: <hr/> |
| Nimmt Ihr Kind zur Zeit Medikamente?   | <input type="checkbox"/> nein | <input type="checkbox"/> ja: <hr/> |
| Wird bei Ihrem Kind zur Zeit eine Hormontherapie (Kortisol-Präparate gegen Akne, Ekzeme, etc.) durchgeführt? | <input type="checkbox"/> nein | <input type="checkbox"/> ja: <hr/> |
| Leidet Ihr Kind unter Allergien?   | <input type="checkbox"/> nein | <input type="checkbox"/> ja: <hr/> |
| Wurde kürzlich ein chirurgischer Eingriff bei Ihrem Kind durchgeführt?                                       | <input type="checkbox"/> nein | <input type="checkbox"/> ja: <hr/> |
| Hat Ihr Kind zur Zeit Schmerzen?   | <input type="checkbox"/> nein | <input type="checkbox"/> ja: <hr/> |
| Leidet Ihr Kind zur Zeit unter Zahnfleischbluten?  | <input type="checkbox"/> nein | <input type="checkbox"/> ja: <hr/> |
| Bei Mädchen: Nimmt sie die Pille?  | <input type="checkbox"/> nein | <input type="checkbox"/> ja: <hr/> |
| Status Mundhygiene   |                               |                                    |
| <hr/>  |                               |                                    |
| Letzter Arztbesuch:  |                               |                                    |
| <hr/>  |                               |                                    |
| Letzter Zahnarztbesuch:  |                               |                                    |
| <hr/>  |                               |                                    |
| Sonstiges:   |                               |                                    |
| <hr/> <hr/>  |                               |                                    |
| Regensburg, den .....  |                               |                                    |
| <hr/>  |                               |                                    |
| Befragender Arzt   |                               |                                    |

## 2) Einverständniserklärung der Eltern



UNIVERSITÄT  
REGENSBURG

KLINIKUM



Klinikum der Universität Regensburg  
93042 Regensburg

Poliklinik für Kieferorthopädie

Prof. Dr. Dieter Müßig  
Direktor

Hausadresse:  
Klinikum der Universität Regensburg  
Franz-Josef-Strauß-Allee 11  
93053 Regensburg  
ÖPNV: RVV Linie 6

Unser Zeichen  
mü/sas

Telefon  
0941/944-8095

Telefax  
0941/944-6169

Datum  
24.03.05

### Einverständniserklärung Eltern

#### Diurnaler Kortisol-Rhythmus im Speichel gesunder Schulkinder

Name des Kindes: ..... Geb.-Datum: .....

ich wurde von Dr. ..... vollständig über das Wesen sowie die Bedeutung dieser Studie aufgeklärt und bestätige mit meiner Unterschrift, dass ich mit der Teilnahme meines Kindes einverstanden bin.

Die gesetzlichen Datenschutzbestimmungen werden eingehalten.

Regensburg, den.....

Regensburg, den.....

Unterschrift Eltern\* oder  
Der/Die Personensorgeberechtigte/n  
(Studienaufklärung erhalten)

\* unterschreibt ein Elternteil alleine, so erklärt er mit seiner Unterschrift, dass ihm das Sorgerecht allein zusteht oder dass er im Einverständnis mit dem anderen Elternteil handelt.

Unterschrift Arzt  
(bei Bedarf Fragen beantworten)

### 3) Informationen für Eltern



UNIVERSITÄT

REGENSBURG

KLINIKUM

Klinikum der Universität Regensburg  
93042 Regensburg

Poliklinik für Kieferorthopädie

Prof. Dr. Dieter Müßig  
Direktor

Hausadresse:  
Klinikum der Universität Regensburg  
Franz-Josef-Strauß-Allee 11  
93053 Regensburg  
ÖPNV: Rvv Linie 6

Unser Zeichen  
mü/sas

Telefon  
0941/944-8095

Telefax  
0941/944-6169

Datum  
09.03.2005

#### Eltern-Information

##### Diurnaler Kortisol-Rhythmus im Speichel gesunder Schulkinder

Sehr geehrte Eltern,

Im Rahmen dieses wissenschaftlichen Projekts untersuchen wir die Kortisol-Konzentration im Speichel gesunder Kinder. Untersuchungen bei gesunden Erwachsenen zeigten, dass die Kortisol-Konzentration im Speichel im Verlaufe eines Tages sich dramatisch ändert: ca. 3-4 Stunden nach dem Aufstehen erreicht diese ihren Höhepunkt, nimmt dann über den Tag kontinuierlich ab und erreicht am Abend das Minimum. Ein ähnlicher Verlauf wird bei Kindern vermutet.

An dieser Studie können Schulkinder im Alter zwischen 10 und 14 Jahren beiderlei Geschlechtes teilnehmen. Sie dürfen sich zur Zeit nicht in zahnärztlicher Behandlung befinden, an keiner chronischen Erkrankung leiden oder keine Hormontherapie erhalten. Gute Zahnhygiene und kein Zahnfleischbluten sind ebenfalls wichtige Kriterien. Sie bekommen von uns Probengefäße, eine Kurz-Anleitung und eine Versandbox mit nach Hause. An einem Wochenende oder in den Schulferien bitten wir Sie, nach dem Aufstehen zu bestimmten Zeiten über den Tag verteilt Speichelproben ihres Sohnes/Tochter mit den Probengefäßen zu sammeln. Die Röhrchen für die Speichel Sammlung sind für die Anwendung bei Erwachsenen zugelassen. Die Speichel Sammlung dauert ins gesamt mit Vorbereitung weniger als 3 Minuten. Sie verursacht selbstverständlich keinerlei Schmerzen und Nebenwirkungen sind nicht bekannt.

⇒ Eine Teilnahme Ihres Kindes gegen seinen Willen ist grundsätzlich nicht möglich, da die Messungen nur in entspannter Ruhe möglich sind. Ablehnung oder gar Gegenwehr würde die Kortisol-Konzentration negativ beeinflussen. Sie sehen, die Freiwilligkeit bzw. Akzeptanz von Seiten Ihres Kindes hat obersten Vorrang.

Wenn Sie und Ihr Kind an dieser Studie teilnehmen möchten, bitten wir sie, Ihre Telefonnummer unten anzugeben. Wir nehmen mit Ihnen Kontakt auf, um Vorgesprächs-Termin zu vereinbaren. Die Speichel-Sammlung selbst finden bei Ihnen zu Hause statt.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg geprüft und genehmigt. Die gesetzlichen Datenschutzbestimmungen werden eingehalten.

Für weitere Fragen und Erläuterungen stehe ich Ihnen gerne zur Verfügung.

Frau Christina Tzortzi  
Poliklinik für Kieferorthopädie  
Klinikum der Universität Regensburg  
Franz-Josef-Strauß-Allee 11, 93053 Regensburg  
Tel. 0941/944-6091

---

Regensburg, den..... Regensburg, den.....

---

Unterschrift Eltern oder  
Der/Die Personensorgeberechtigte/n  
(Studienaufklärung erhalten)

Unterschrift Arzt  
(bei Bedarf Fragen beantworten)

Tel. .....

#### 4) Einverständniserklärung Kinder



UNIVERSITÄT  
REGENSBURG  
KLINIKUM

Klinikum der Universität Regensburg  
93042 Regensburg

Poliklinik für Kieferorthopädie

Prof. Dr. Dieter Müßig  
Direktor

Hausadresse:  
Klinikum der Universität Regensburg  
Franz-Josef-Strauß-Allee 11  
93053 Regensburg  
ÖPNV: RVV Linie 6

Unser Zeichen  
mü/sas

Telefon  
0941/944-8095

Telefax  
0941/944-8169

Datum  
24.03.05

#### Einverständniserklärung Schulkinder

Diurnaler Kortisol-Rhythmus im Speichel gesunder Schulkinder

##### **Einwilligung:**

Ich, ..... geboren am .....  
habe verstanden, worum es bei dieser Studie geht und habe mich entschlossen, mitzumachen.

Regensburg, den..... Regensburg, den.....

Unterschrift Kind

Unterschrift Arzt

## 5) Infoblatt für Kinder



Klinikum der Universität Regensburg  
93042 Regensburg

Poliklinik für Kieferorthopädie

Prof. Dr. Dieter Müßig  
Direktor

Hausadresse:  
Klinikum der Universität Regensburg  
Franz-Josef-Strauß-Allee 11  
93053 Regensburg  
ÖPNV: RVV Linie 6

Unser Zeichen  
mü/sas

Telefon  
0941/944-8095

Telefax  
0941/944-6169

Datum  
24.03.05

### Studieninformation für Schulkinder

#### **Diurnaler Kortisol-Rhythmus im Speichel gesunder Schulkinder**

Liebe .....;  
Lieber .....

Du wurdest gefragt, ob Du an einer wissenschaftlichen Studie teilnehmen möchtest. Alles wird auf den folgenden Seiten sorgfältig erklärt.

#### **Wer sind wir?**

Wir, das sind Frau Christina Tzortzi, Zahnärztin am Universitätsklinikum Regensburg, und Prof. Dr. Müßig, Direktor der Poliklinik für Kieferorthopädie am Universitätsklinikum Regensburg.

#### **Worum geht es eigentlich?**

In Deinem Speichel gibt es ein natürliches Hormon, das Kortisol. Dieses ist im Laufe eines Tages in sehr unterschiedlichen Mengen nachweisbar. Dieses „Auf und Ab“ möchten wir mit Deiner Hilfe bestimmen.

#### **Was hast Du zu tun?**

Du bekommst eine Anzahl von Probengefäßen mit. An einem Wochenende oder in den Schulferien bitten wir Dich, nach dem Aufstehen bis zum Schlafen gehen zu bestimmten Zeiten in ein solches Gefäß zu spucken. Das Hormon wird dann in unserem Labor gemessen.

Aufklärungsbogen Kortisol (Schulkind)

Version 2 vom 24.03.2005; Seite 1/2

**Ist die Untersuchung schmerhaft oder kann sonst irgend etwas dabei passieren?**

Wir haben es Deinen Eltern bereits erklärt: **Die Untersuchung ist nicht schmerhaft, passieren kann dabei ebenfalls nichts. Selbstverständlich kannst Du jederzeit ohne Nachteile abbrechen.**

Wenn Du noch Fragen hast, werden wir sie Dir gerne beantworten. Ansonsten bitten wir Dich nun, zu überlegen, ob Du mitmachen möchtest oder nicht. Falls Du an unserer Studie teilnehmen möchtest, bitten wir Dich mit Deinem Namen zu unterschreiben.

**Vielen Dank für Deine Aufmerksamkeit!**

---

Regensburg, den..... Regensburg, den.....

---

Unterschrift Kind

---

Unterschrift Arzt

## 6) Patienten Informationen über die Speichelsammlung

**Zurück an den Projektleiter!**

### Speichel-Sammlung/Protokollbogen

| Datum:     |                                | Name:          |  |
|------------|--------------------------------|----------------|--|
| Proben-Nr. |                                | Genaue Uhrzeit | Bemerkung<br>(z. B. Nahrungsaufnahme, körperliche Aktivitäten, Stress, etc.) |
| 1          | unmittelbar nach dem Aufwachen |                |  |
| 2          | 20 min nach dem Aufwachen      |                |  |
| 3          | 40 min nach dem Aufwachen      |                |  |
| 4          | 60 min nach dem Aufwachen      |                |  |
| 5          | 80 min nach dem Aufwachen      |                |  |
| 6          | 100 min nach dem Aufwachen     |                |  |
| 7          | 120 min nach dem Aufwachen     |                |  |
| 8          | 140 min nach dem Aufwachen     |                |  |
| 9          | 160 min nach dem Aufwachen     |                |  |
| 10         | 180 min nach dem Aufwachen     |                |  |
| 11         | 4 Stunden nach dem Aufwachen   |                |  |
| 12         | 5 Stunden nach dem Aufwachen   |                |  |
| 13         | 6 Stunden nach dem Aufwachen   |                |  |
| 14         | 7 Stunden nach dem Aufwachen   |                |  |
| 15         | 8 Stunden nach dem Aufwachen   |                |  |
| 16         | 9 Stunden nach dem Aufwachen   |                |  |
| 17         | 10 Stunden nach dem Aufwachen  |                |  |
| 18         | 11 Stunden nach dem Aufwachen  |                |  |
| 19         | 12 Stunden nach dem Aufwachen  |                |  |
| 20         | 13 Stunden nach dem Aufwachen  |                |  |

