

# **Plasmaproteinbindung endogener Glucocorticoesteriode und deren Einfluss auf Haar- und Speichelkonzentrationen**

## **DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor rerum naturalium  
(Dr.rer.nat.)**

Vorgelegt

**der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften  
der Technischen Universität Dresden**

von

**M.Sc. Aniko Krumbholz, geb. Härtling**

Geboren am 12.09.1986 in Bautzen

Eingereicht am 21.12.2016

Gutachter: Prof. Dr. Eike Brunner (Technische Universität Dresden)  
Prof. Dr. Michael Vogeser (Ludwig-Maximilians-Universität München)

Datum der Disputation: 03.05.2017

Die Dissertation wurde in der Zeit von 04/2012 bis 12/2016  
im Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie in Kreischa unter der Betreuung der  
Professur für Bioanalytische Chemie angefertigt.



*„Gedanken wollen oft - wie Kinder-,  
dass man mit ihnen im Freien spazieren geht.“*

Christian Morgenstern



## Danksagung

Eine wesentliche Voraussetzung für das Gelingen dieser Arbeit war die Möglichkeit, welche mir Herr Prof. Dr. Eike Brunner gegeben hat, meine Dissertation extern unter seiner wissenschaftlichen Betreuung anzufertigen. Dafür danke ich Ihm.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Detlef Thieme für die Möglichkeit, das hier vorgestellte, spannende Thema am Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie zu bearbeiten. Ich danke ihm für die hervorragende Betreuung während meiner gesamten Promotionsphase, für die vielen ideenreichen Konsultationen, die aufmunternden Worte und passenden Ratschläge, welche er stets parat hatte.

Meinen Kollegen am IDAS möchte ich für das angenehme Arbeitsklima und die vielen schönen Stunden während als auch nach der Arbeit danken. Aus vielen Arbeitsbekanntschaften sind Freundschaften geworden, die ich nicht mehr missen möchte. Frau Dr. Patricia Anielski danke ich für die Einweisung in die Haaranalytik, welche die Grundsteinlegung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit am IDAS darstellte. Des Weiteren danke ich ihr dafür, dass sie mir als Probandin für die Haaranalytik zur Verfügung stand. Weiterhin wünsche ich all meinen zeitweiligen und dauerhaften Büronachbarn, besonders Florian Logsch, Matthias Schindler, Stefanie Kahl und Pia Bräuer, viel Erfolg für ihre weiteren Lebenswege und bedanke mich für viele inspirierende Gespräche. Herrn Daniel Groba danke ich für die super Zusammenarbeit, geduldiges Zuhören und konstruktive Gespräche, die mir den einen oder anderen Lichtblick gebracht haben.

Frau Dr. Nicole Reisch vom Klinikum der LMU München, Endokrinologie, danke ich für die Bereitstellung der Haarproben für die Bestimmung des endogenen Referenzbereiches sowie der Speichelproben der Referenzgruppe und der AGS-Patienten.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Martin Schönfelder vom Institut für Pathologie der Technischen Universität München für die Bereitstellung der Serum- und Speichelproben zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung der Glucocorticoide.

Mein größter Dank geht an meine Familie, die immer bedingungslos an meiner Seite stand und nie den Glauben an mich verloren hat. Meinem Sohn, der maßgeblich zum wissenschaftlichen Zugewinn dieser Arbeit beigetragen hat, danke ich für die unzähligen Spaziergänge, die zwar eine zeitliche Verzögerung der Fertigstellung verursacht aber auch viele hilfreiche Gedankenansätze in Gang gebracht haben.

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
<b>A Einleitung und Zielstellung .....</b>	<b>1</b>
<b>B Theoretische Grundlagen.....</b>	<b>4</b>
B.1 Corticosteroide.....	4
B.1.1 allgemeine Grundlagen .....	4
B.1.2 Corticosteroide in der Diagnostik.....	6
B.1.2.1 Störungen im Cortisolhaushalt .....	6
B.1.2.2 Cortisol als endogener Stressmarker .....	7
B.1.2.3 Glucocorticosteroide in der Dopinganalytik .....	8
B.2 Untersuchungsmedien .....	10
B.2.1 Blutplasma - Proteinbindung der Glucocorticosteroide .....	10
B.2.1.1 Grundlagen der Proteinbindung .....	10
B.2.1.2 Bestimmung des biologisch aktiven Cortisols in Plasma .....	12
B.2.2 Speichel - Reflektion des Akutzustandes .....	14
B.2.2.1 Speichel als Untersuchungsmedium .....	14
B.2.2.2 Corticosteroide im Speichel.....	17
B.2.3 Haare - Langzeitnachweis für Steroidhormone.....	22
B.2.3.1 Grundlagen der Haaranalytik .....	22
B.2.3.2 Corticosteroide in Haaren .....	25
<b>C Materialien und Methoden.....</b>	<b>31</b>
C.1 Chemikalien und Geräte.....	31
C.1.1 Chemikalien .....	31
C.1.2 Referenzsubstanzen .....	31
C.1.3 Lösungen und Puffer.....	32
C.1.4 HPLC-MS/MS-System .....	32
C.1.5 Geräte zur Probenvorbereitung.....	33

C.2	Studienprotokolle .....	34
C.2.1	Bestimmung der Plasmaproteinbindung der Corticosteroide .....	34
C.2.2	Speichelstudie: Corticosteroide im Speichel .....	35
C.2.3	Haarstudie: Endogene Glucocorticosteroide im Haar .....	36
C.2.4	Schwangerschaftsstudie: Korrelation von Haar, Speichel und Plasma .....	37
C.3	Probenvorbereitung .....	39
C.3.1	Aufarbeitung der Plasmaproben .....	39
C.3.1.1	Bestimmung der freien Steroidkonzentrationen .....	39
C.3.1.2	Bestimmung der Gesamtsteroidkonzentration .....	39
C.3.2	Aufarbeitung der Speichelproben .....	40
C.3.3	Aufarbeitung von Haarproben .....	40
C.3.4	Kalibrierung .....	41
C.3.4.1	Plasmaproben .....	41
C.3.4.2	Speichelproben .....	41
C.3.4.3	Haarproben .....	42
C.4	Messung der Proben mit HPLC-MS/MS .....	43
C.5	Validierung der Analysemethoden .....	44
C.6	Statistische Auswertung .....	44
<b>D</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>45</b>
D.1	Validierungsergebnisse .....	45
D.2	Plasmaproteinbindung der endogenen Glucocorticoide .....	46
D.2.1	Absolute Hormonkonzentration der Corticosteroide .....	46
D.2.2	Basalkonzentrationen und Plasmaproteinbindung der GCs .....	46
D.2.3	Veränderungen der Plasmakonzentrationen und Proteinbindung der Glucocorticosteroide durch exogenen Einflüsse .....	49
D.2.3.1	Physische Belastung via Fahrrad-Ergometer .....	50
D.2.3.2	Transdermale Testosteronapplikation .....	52
D.2.3.3	Kombination der Einflussfaktoren .....	53
D.2.4	Korrelation der Serum- und Speichelkonzentrationen .....	55

D.3	Corticosteroide im Speichel.....	60
D.3.1	Endogene Konzentrationen der Corticosteroide .....	60
D.3.2	Corticosteroide im Speichel während einer Hormonersatztherapie .....	63
D.3.2.1	Endogene Glucocorticosteroide .....	63
D.3.2.2	Synthetische Corticosteroide.....	67
D.4	Haaranalysen - ein retrospektiver Nachweis von Glucocorticosteroiden.....	69
D.4.1	Endogene Referenzbereiche für die GCs.....	69
D.4.2	Veränderung der Konzentrationen während der Schwangerschaft.....	72
D.5	Einfluss der Plasmaproteinbindung auf die Haar- und Speichelkonzentrationen	77
D.5.1	Plasmaanalysen.....	77
D.5.2	Speicheluntersuchungen.....	80
D.5.3	Haaranalysen.....	83
<b>E</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>87</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>89</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>104</b>
	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>107</b>
	<b>Formelverzeichnis .....</b>	<b>109</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>110</b>
	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>122</b>
	<b>Erklärung.....</b>	<b>123</b>

## Abkürzungsverzeichnis

11 $\beta$ -HSD	11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
ABP	Androgen bindendes Protein
ACN	Acetonitril
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
AGS	Adrenogenitales Syndrom
c	Konzentration
CALC	berechnete nichtproteingebundene Konzentration nach COOLENS
CAR	Cortisol-Awakening Response
CBG	Corticosteroid-bindendes Globulin
CE	Kollisionsenergie
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
CS	Cushing's Syndrom
d <sub>4</sub> -F	d <sub>4</sub> -Cortisol
D	Dexamethason
DP	Declustering-Potential
E	Cortison
ED	Gleichgewichtsdialyse
EE	Etherextraktion
EtG	Ethylenglycol
ECLIA	Elektrochemilumineszenz-Immunoassay
EIA	enzymatischen Immunadsorptionsverfahren "Enzym-Immunoassay"
ELISA	"Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay"
ESI	Elektrospray-Ionisation
F	Cortisol
f	freier, nicht proteingebundener Anteil
F/E	Verhältnis Cortisol zu Cortison
FPIA	Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay
FLU	Fludrocortison
g	gesamter Anteil
GTFCh	Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie
HCC	Haarcortisolkonzentration
HPA-Achse	Hypothalamic-Pituitary-Adrenal-Achse (Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse)



HPG-Achse	Hypothalamic-Pituitary-Gonadal-Achse (Hypothalamus-Hypophysen-Keimdrüsen-Achse)
IDAS	Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie
IS	interner Standard
L	Linear
LC	Flüssigchromatographie
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LOD	Nachweisgrenze (Limit Of Detection)
LOQ	Bestimmungsgrenze (Limit Of Quantification)
m	männlich
Max	Maximalwert/Maximalkonzentration
mbmt	Mit Belastung, mit Testosteron
mbot	Mit Belastung, ohne Testosteron
MeOH	Methanol
Min	Minimalwert/Minimalkonzentration
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MRPL	Minimum Required Performance Level
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -Butylether
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
MW-U-Test	Mann-Whitney-U-Test
n	Anzahl
n.u.	nicht untersucht
NNR	Nebennierenrinde
obot	Ohne Belastung, ohne Testosteron
obmt	Ohne Belastung, mit Testosteron
o.C.	Ohne Kontrazeptiva
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PLN	Prednisolon
PN	Prednison
pp	Post partum, nach der Entbindung
PPB	Plasmaproteinbindung
QC	Qualitätskontrolle
RIA	Radio-Immunoassay
rpm	Umdrehungen pro Minute

SD	Standardabweichung
SHBG	Sexualhormon-bindendes Globulin
s/n	Signal-zu-Rauschverhältnis
Sp	Speichel
SPE	Festphasenextraktion
SS	Schwangerschaft
SSW	Schwangerschaftswoche
T/E	Testosteron/Epitestosteron-Quotient
UF	Ultrafiltration
w	weiblich
WADA	Weltantidopingagentur
Wf	Wiederfindungsrate
W-Test	Wilcoxon-Test

## A Einleitung und Zielstellung

Glucocorticosteroide (GC) spielen für viele endogene Prozesse im Organismus eine wichtige Rolle. Sie regulieren die Gluconeogenese sowie den Lipid- und Proteinstoffwechsel. Außerdem sind sie für die Stressregulierung über die Hypothalamus-Nebennierenrinden-Achse verantwortlich. Therapeutisch kommen die GCs wegen ihrer entzündungshemmenden Wirkung zum Einsatz und werden u.a. bei Asthma und Gelenkentzündungen angewandt. Diese Eigenschaft macht sie auch interessant für den Gebrauch im Sportbereich. Dort wird ihre Anwendung über die Weltantidopingagentur reguliert. Ihr oraler, intramuskulärer, intravenöser und rektaler Gebrauch ist im Wettkampf verboten. Diese Einschränkung bzgl. des Applikationszeitraumes und des Applikationsweges erschwert die diagnostische Aussagekraft von Routinedopingproben, welche im Urin durchgeführt werden. Ein Grenzwert von 30 ng/ml soll einen legalen Gebrauch von einem Missbrauch abgrenzen. Die endogenen Glucocorticosteroide stellen hierbei jedoch einen Graubereich dar. Endogen wird Cortisol in einem zirkadianen Rhythmus produziert und die Produktion ist stressinduziert. Somit kommt es zu ausgeprägten intra- und interindividuellen Streuungen der endogenen Produktion. Dadurch bedingt ist eine Abgrenzung der endogenen Produktion von einer legalen Anwendung bzw. einem Missbrauch im Rahmen der Dopingrichtlinien im Urin nicht möglich.

Speziell für den Nachweis von endogenen Substanzen ist es wichtig, eine Methode zu finden, mit der es möglich ist, die endogene Produktion von einer exogenen Bezugsquelle abzugrenzen. Dabei haben sich zwei Wege als hilfreich herausgestellt. Zum einen, wenn die Differenzierung nicht an Hand von Absolutkonzentrationen sondern durch die Anwendung von Analytverhältnissen durchgeführt wird. Zum anderen, wenn ergänzende Matrices, wie Speichel oder Haar, verwendet werden. Beispielsweise wird im Fall von Testosteron der Testosteron-Epitestosteron-Quotient (T/E) in Urinproben gebildet. Die endogene Produktion des Epitestosterons, das 17 $\alpha$ -Isomer des Testosterons, bleibt bei einer exogenen Zufuhr des Testosterons unbeeinflusst, was zu einem Anstieg des T/E-Wertes führt. Für geringdosierte Anwendungen bzw. für Applikationswege wie transdermal, ist diese Bewertung jedoch nicht aussagekräftig und die Medikation bleibt unentdeckt. Auch Speichelanalysen zeigten sich hier als erfolgsversprechend, da nur die biologisch aktiven Anteile aus dem Blut in den Speichel übergehen. (*Thieme et al. 2013*)

Das endogene Glucocorticosteroid Cortisol steht seit der Jahrtausendwende im Blickpunkt vieler Forschungen, welche sich mit dessen Bedeutung für die Stressantwort befassen

und Cortisol u.a. im Speichel und Haar nachweisen. Auffällig ist dabei, dass die ersten Arbeiten fast ausschließlich mittels immunchemischen Nachweisverfahren erfolgten. Erst in den letzten fünf Jahren wurden vermehrt Verfahren verwendet, welche eine chromatografische Trennung und eine massenspektrometrische Detektion (hauptsächlich Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie, LC-MS/MS) kombinieren. Vorteil dieser Methoden ist, dass der Nachweis von Substanzen selektiv erfolgt und Kreuzreaktionen nicht stattfinden. Weiterhin ist es vorteilhaft, dass die Konzentrationen von mehreren Analyten mit einer Messung bestimmt werden können. So ist es zum Beispiel möglich Cortisol und andere Steroide parallel nachzuweisen.

Cortison spielt für die physiologische Wirkung der Glucocorticosteroide im Körper keine Rolle, da es selbst nicht biologisch aktiv ist. Deshalb wurde es in bisherigen Forschungen für diagnostische Aussagen nicht berücksichtigt. Mit Zunahme der Verwendung der LC-MS/MS-Technologie werden jedoch beide endogenen GCs zunehmend nebeneinander bestimmt. Bei der Betrachtung von unterschiedlichen Untersuchungsmedien ist auffällig, dass sich die Konzentrationsverhältnisse Cortisol zu Cortison unterscheiden. Entgegengesetzte Verhältnisse werden ersichtlich, wenn die GC-Konzentrationen im Blut mit denen im Speichel bzw. Haar verglichen werden.

Haar- und Speichelproben zählen zu den ergänzenden Matrices der Routineuntersuchungsmedien Urin und Blut und werden bereits in vielen forensischen und klinischen Laboren für diagnostische Fragestellungen verwendet. Diese Matrices liefern wichtige Hinweise auf den akuten (Speichel) oder chronischen/zurückliegenden (Haar) Gebrauch bzw. Missbrauch von Medikamenten und Drogen. Sowohl die Haar- als auch Speichelmatrix sollen den physiologisch aktiven Anteil von Substanzen im Blut widerspiegeln und somit korrektere Rückschlüsse auf deren Wirksamkeit zulassen. Die beobachtete Konzentrationsverschiebung der GCs widerspricht jedoch dieser Annahme. Bisher wurde dies mit der lokalen Wirksamkeit von Enzymen, welche die Corticosteroide ineinander umwandeln, erklärt.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde folgender Fragestellung für die Nachweisbarkeit der Glucocorticosteroide nachgegangen:

*„Wie hoch ist der Anteil der Plasmaproteinbindung der GCs im Blut und welche Rückschlüsse lassen sich daraus auf die Konzentrationsverschiebung innerhalb der einzelnen Matrices ziehen?“*

Um diese Frage zu beantworten wurden:

- die Konzentrationen der GCs im Blut (gesamt und frei), im Speichel und im Haar bestimmt,
- aus den Blutkonzentrationen die Plasmaproteinbindungen berechnet,
- Korrelationen zwischen den Blut- und Speichelkonzentrationen hergestellt,
- Einflussfaktoren auf die nachweisbaren Konzentrationen untersucht und
- Referenzbereiche für die endogenen GCs definiert.

## **B Theoretische Grundlagen**

### **B.1 Corticosteroide**

#### **B.1.1 allgemeine Grundlagen**

Corticosteroide, auch als Corticoide bezeichnet, stellen eine Untergruppe der Steroidhormone dar. Dabei handelt es sich um eine Hormonklasse des endokrinen Systems, welche zu den wichtigsten Hormonen im menschlichen Körper zählen. Neben den Corticosteroiden gibt es die Gruppe der Gestagene und die Gruppe der Sexual- oder Geschlechtshormone, mit Estradiol und Testosteron als wichtigste Vertreter. (Wilde 1999, Stryer 1994, Silverthorn 2009, Neumann 1992, Karlson 2005) Die Biosynthese der Steroidhormone erfolgt als Teil des Fettstoffwechsels in der Nebennierenrinde, den Keimdrüsen und der Plazenta. (Wilde 1999) Ausgangsstoff für die Synthese ist das Cholesterin, welches entweder mit der Nahrung aufgenommen oder endogen aus Acetyl-Co-A gebildet wird. (Wilde 1999, Stryer 1994) Die einzelnen Schritte der Biosynthese sind in Abbildung B-1 dargestellt.

Die endogen vorkommenden Corticosteroide beim Menschen können an Hand ihrer Wirkungen in zwei Gruppen, die Mineralo- (MC) und die Glucocorticosteroide (GC), eingeteilt werden. Das endogene MC ist das Aldosteron, welche hauptsächlich auf den Mineral- und Wasserhaushalt im Körper wirkt. (Wilde 1999) Die GCs umfassen das Corticosteron, das Cortisol, als biologisch aktive Form, und das Cortison als dessen inaktiver Metabolit. Cortisol wird in einen zirkadianen Rhythmus von der Nebennierenrinde ausgeschüttet, wobei ein Konzentrationsmaximum am Morgen zwischen 3 Uhr und 8 Uhr und ein Minimum am Abend zwischen 18 Uhr und 24 Uhr erreicht wird. (Neumann 1992, Weitzman et al. 1971) Cortisol ist im Blut zu 95 % an Plasmaproteine (Transcortin: 80-90 % und Albumin: 10-15 %) gebunden und ist somit nicht biologisch aktiv. (Lewis et al. 2005) Das freie, sprich nicht proteingebundene Cortisol beeinflusst durch seine physiologische Wirkung viele Bereiche des Körpers, unter anderem den Kohlenhydrathaushalt und den Protein- und Lipidstoffwechsel. Außerdem besitzen GCs antiinflammatorische und immunsuppressive Eigenschaften, welche sie für therapeutische Anwendungen interessant machen. Sie werden für die Behandlung von Atemwegserkrankungen, Rheuma, Allergien und hormonellen Störungen angewandt. Dabei kommen unterschiedliche Applikationswege zum Einsatz, z.B. inhalativ, transdermal, rektal und oral.

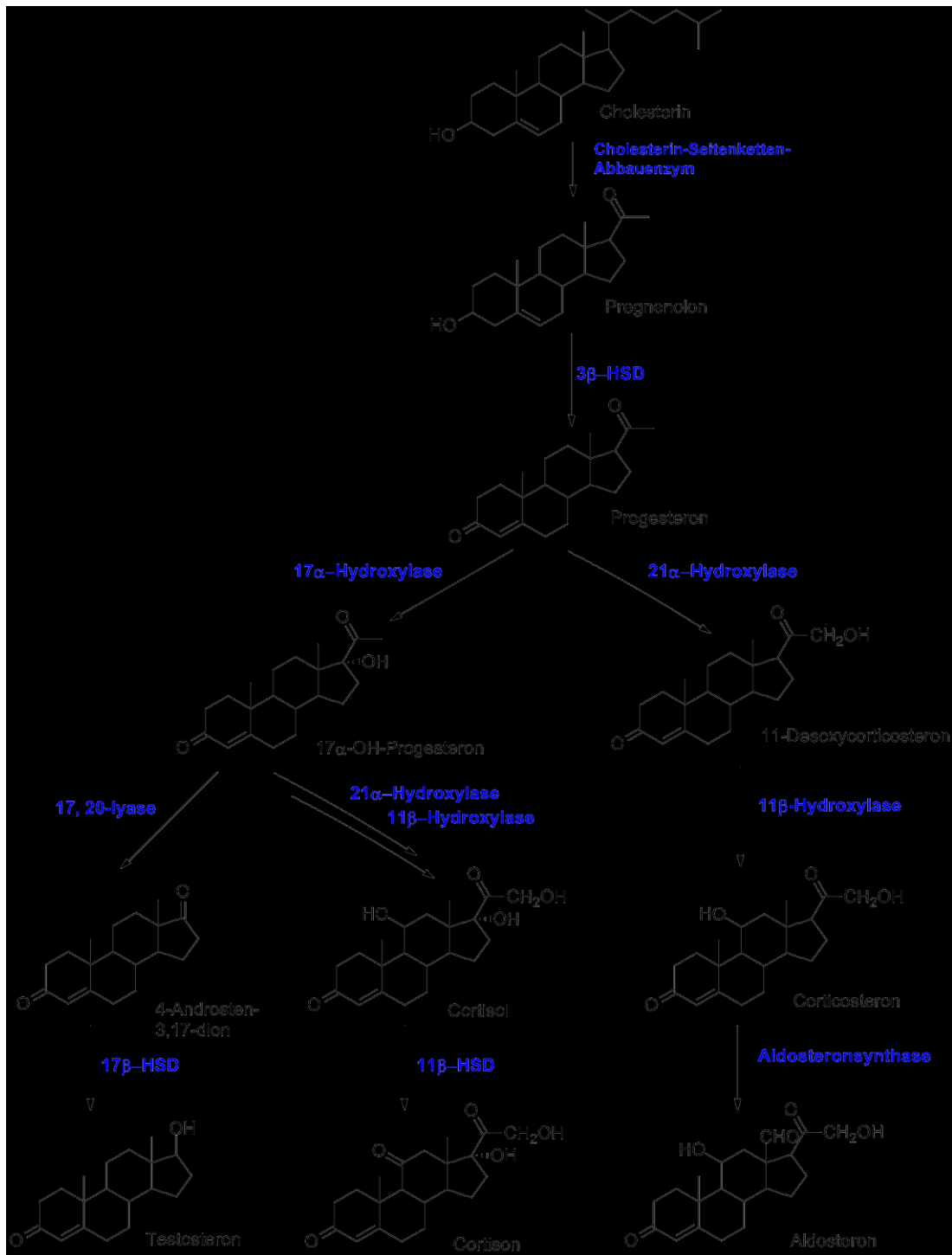


Abbildung B-1: Biosynthese der Steroidhormone ausgehend vom Cholesterin hin zu den Androgenen, Gluco- und Mineralocorticosteroide mit den dafür benötigten Enzymen (HSD: Hydroxysteroiddehydrogenase)

## **B.1.2 Corticosteroide in der Diagnostik**

### *B.1.2.1 Störungen im Cortisolhaushalt*

Ist die endogene Produktion der Corticosteroide gestört, so kommt es zum Hyper- bzw. Hypocortisolismus. Das Cushing's Syndrom (Morbus Cushing, CS) ist dabei die am häufigsten auftretende Krankheit, welche mit einer Cortisolüberproduktion zusammen hängt. Endogene Auslöser dafür sind meist Adenome und Karzinome. (*Siegenthaler 2006*) Typische Anzeichen sind u.a. das „Vollmondgesicht“, eine Stammfettsucht, ein „Stiernacken“ und diabetische Stoffwechsellagen mit erhöhten Glukosekonzentrationen. (*Klingmüller 2001*) Ein Hypercortisolismus kann jedoch auch exogener Natur sein. Zum Beispiel kann eine falsch eingestellte Langzeittherapie mit Corticosteroiden die gleichen Symptome hervorrufen. (*Silverthorn 2009, Klingmüller 2001*) Der Hypocortisolismus lässt sich in mehrere Krankheitsbilder unterscheiden. Zum einen gibt es die primäre und die sekundäre Nebennierenrinden (NNR)-Insuffizienz, zum anderen das Adrenogenitale Syndrom (AGS). Im Gegensatz zur sekundären NNR-Insuffizienz, wo nur die Cortisolproduktion der Nebennierenrinde gestört ist, werden bei der primären NNR- Insuffizienz (auch Addison-Syndrom) weder MCs noch GCs gebildet. Beide Erkrankungen sind dabei lebensbedrohlich und erfordern eine lebenslange Hormonersatztherapie. Die Biosynthese der Corticosteroide bei AGS-Patienten (kongenital) kann auf drei verschiedenen Wegen gestört sein. Die häufigste Form (1:5.000-15.000) ist durch einen Defekt der 21 $\alpha$ -Hydroxylase bedingt. Dies führt dazu, dass die Corticosteroide endogen nicht gebildet werden können, wodurch es zu einer Anreicherung der Synthesestufen kommt. Diese werden in Richtung des Androgenen-Syntheseweges abgebaut und eine verstärkte Biosynthese von Dehydroepiandrosteron (DHEA), 4-Androsten-3,17-dion und Testosteron verursachen (Abbildung B-1). Weiterhin kann ein Defekt der 11 $\beta$ -Hydroxylase (1:100.000) sowie der 17 $\alpha$ -Hydroxylase (sehr selten) zu einer AGS-Erkrankung führen. (*Klingmüller 2001, Siegenthaler 2006, Merke and Cutler 2001, Migeon and Wisniewski 2001*) Klinische Anzeichen eines adrenogenitalen Syndroms sind die intersexuellen äußeren Genitalien bei Mädchen, die unterschiedlich stark ausgeprägt und schon nach der Geburt erkennbar sein können. Wird nicht gleich mit einer Therapie begonnen, führt die dauerhaft verstärkte Produktion von Androgenen schließlich zur Virilisierung, welche sich im Körperbau und der Körperbehaarung widerspiegelt. Bei Jungen kommt es trotz vorzeitig einsetzender Pubertät zu Minderwuchs und Hodenatrophie. (*Frenzel and Dorr 1998*) In Deutschland gehört der Test auf AGS zum routinemäßigen Neugeborenen-Screening. Ein möglicher Enzymdefekt kann somit sofort diagnostiziert und die Substitutionstherapie ab den ersten Lebenstagen begonnen werden. (*Wendel 2009*)



Die benötigten Hormonersatztherapien werden mit *Hydrocortison* (Wirkstoff = Cortisol) oder synthetisch äquivalenten Corticosteroide, mit höheren Wirkungspotentialen, durchgeführt. Verbreitete Beispiele dafür sind Prednison, Prednisolon und Dexamethason. Ein Vorteil dieser synthetischen Glucocorticoide ist die Tatsache, dass sie nur schwache bis gar keine mineralocorticoidale Eigenschaften zeigen und somit unerwünschte Nebenwirkungen, wie die Beeinflussung des Wasser- und Mineralhaushaltes, umgangen werden können. Ist auch eine Substitution des MCs Aldosteron notwendig, so wird dafür Fludrocortison verwendet. (Reisch 2015) Wichtig für eine erfolgreiche Medikation ist, dass die Hormonersatztherapie den zirkadianen Rhythmus gut widerspiegelt und somit endogene Zustände emuliert werden können.

### B.1.2.2 Cortisol als endogener Stressmarker

Die Aktivierung von Stressreaktionen ist vom Körper eine Art mit auf ihn einfallenden Sinneseindrücken umzugehen. Alle Lebewesen sind sogenannten Stressoren ausgesetzt, welche chemischer, physikalischer, physischer oder auch psychischer Herkunft sein können. Die Stressreaktion wird dabei hauptsächlich über zwei interagierende Wege, die sympathoadrenale Achse und die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (Hypothalamic-Pituitary-Adrenal-Axis, HPA), vermittelt. (Tsigos and Chrousos 2002, Minton 1994) Akute Stressreaktionen aktivieren dabei die sympathoadrenale Achse, was zu einer Freisetzung der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin über das periphere sympathische Nervensystem führt. Diese werden an die Blutbahn abgegeben und gelangen somit in die verschiedenen Organe. Dort bewirken sie z.B. die Erhöhung des Blutdrucks, der Herzkontraktionsfrequenz sowie die Stimulierung der Atmung und die Mobilisierung oxidabler Substanzen wie Glucose. (De Boer et al. 1990, Frankenhaeuser 1982, Silverthorn 2009) Wird die Stressreaktion über die HPA-Achse vermittelt, so kommt es auf Grund der andauernden Aktivierung zur vermehrten Ausschüttung der Glucocorticoide in der Nebennierenrinde. Die Aktivierungskaskade beginnt in dem Hypothalamus, wo das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) sekretiert wird. Dieses stimuliert anschließend die Bildung und Ausschüttung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) in der Hypophyse. Das ACTH seinerseits regt die Nebennierenrinde zur verstärkten Produktion von Cortisol an, welches anschließend über die Blutbahn zu den Zielorganen transportiert wird. Dort wirkt es auf die einzelnen Stoffwechselvorgänge im Körper. Außerdem gelangt es auch in die Hypophyse und aktiviert dort auf Grund des negativen Rückkopplungsmechanismus die Einstellung seiner eigenen Produktion. (Tsigos and Chrousos 2002, Miller, Chen and Zhou 2007)

Die ersten Untersuchungen zur Thematik: 'Stressinduzierter Anstieg der Cortisolwerte im Blut beim Menschen' begannen in den 1980er Jahren. Zu dieser Zeit widersprechen sich die Forschungsergebnisse, denn zum einen wurden signifikante Veränderungen der Cortisolwerte nach psychologischen sowie auch physiologischen Belastungen beobachtet (*Armario et al. 1996, Kemmer et al. 1986, Meyerhoff, Oleshansky and Mougey 1988, Schedlowski et al. 1992*), zum anderen nicht (*Allen et al. 1985, Semple et al. 1988*). Bei aktuellen Literaturrecherchen mit den Schlagwörtern 'Cortisol' und 'Stress' erhält man im "PubMed" rund 12000 Einträge, 1000 davon aus dem Jahr 2015, was ein zunehmendes Interesse an der Thematik zeigt. Die aktuellen Arbeiten sind sich dabei einig, dass ein gesteigertes Wirken von Stressoren zu erhöhten Cortisolkonzentrationen sowohl im Blut als auch im Speichel (*Baba et al. 2015, Umeanuka et al. 2015, Vammen et al. 2014, Wong et al. 2014*) und im Haar (*Dettenborn et al. 2010, Etwel et al. 2014, Gow et al. 2010, Russell et al. 2012, Sharpley, McFarlane and Slominski 2012, Stalder and Kirschbaum 2012, Staufenbiel et al. 2013, Wester and van Rossum 2015*) führt.

### B.1.2.3 Glucocorticosteroide in der Dopinganalytik

Der Gebrauch von GCs im Sport wird durch die Dopingrichtlinien der Welt-Antidopingagentur (WADA) geregelt. In der Verbotliste der WADA (Prohibited-List) stellen sie die Substanzgruppe S9 dar und sind während des Wettkampfes verboten, wenn sie oral, intravenös, intramuskulär oder rektal aufgenommen werden. (*WADA Prohibited List 2016*) Abweichende Applikationswege sowie die Anwendung außerhalb des Wettkampfes werden nicht sanktioniert. Der Fortbestand der Glucocorticosteroide als Substanzgruppe auf der Verbotliste wird von verschiedenen Forschungsgruppen kontrovers diskutiert. (*Duclos 2010, Montalvan and Duclos 2008, Orchard 2008*) Orchard et al. sind der Meinung, dass die GCs nicht auf die Dopingliste gehören, da bis jetzt nicht gezeigt werden konnte, dass sie die Leistungsstärke positiv beeinflussen. Da sie außerdem in der Medizin großen Einsatz finden, kommt es immer wieder zu unzutreffenden Dopingvermutungen. (*Orchard 2008*) Im Gegensatz dazu argumentieren Befürworter des Fortbestandes auf der Dopingliste mit einer ergogenen Wirkung und einer möglichen Gefährdung der Gesundheit des Athleten beim Missbrauch von GCs. (*Duclos 2010, Montalvan and Duclos 2008*) Duclos et al. zeigten in einem Tierversuch an Ratten, dass sowohl eine akute als auch eine chronische/ kontinuierliche Applikation von Corticosteron, dem Cortisol-Analogen in Ratten, zu einer Verbesserung der physischen Leistungsfähigkeit führt. (*Duclos et al. 2009*) Eine langzeitige Anwendung von GCs kann Auswirkungen auf das Knochengewebe (Osteoporose), auf den Metabolismus (Insulinresistenz) und das Herz-Kreislaufsystem (Bluthochdruck, Arterio-

sklerose) haben. (*Montalvan and Duclos 2008*) Weiterhin wurde eine Verringerung der Durchblutung (*Short et al. 2004*) und eine geringer Glucoseproduktion in der Leber (*Davis et al. 1996*) beobachtet.

Im Rahmen von Routinedopingkontrollen werden die GC-Konzentrationen im Urin bestimmt. Gemäß der WADA-Richtlinien gilt für die GCs ein MRPL (Minimum Required Performance Level) von 30 ng/ml. (*WADA Technical Document 2015 MRPL*) Dieser soll dabei helfen, erlaubte Applikationswege und Applikationszeiten von verbotenen abzugrenzen, in dem der MRPL den Metabolismus, die Pharmakokinetik und die Pharmakodynamik der applizierten Substanz berücksichtigt. Für GCs gilt, dass Befunde nur berichtet werden, wenn die Konzentration den MRPL-Wert übersteigt. Dennoch ist es durch die großen individuellen Einflüsse, wie die Biotransformation und die renale Ausscheidung, nicht möglich, an Hand des MRPLs eine Differenzierung zwischen „erlaubt“ und „verboten“ durchzuführen. Matabosch et al. zeigten, dass eine oral und eine topische (transdermale) Anwendung von Methylprednisolon an Hand der Urinprofile (Konzentration von Methylprednisolon und Metaboliten) unterschieden werden können. (*Matabosch et al. 2013a*) Weiterhin untersuchten sie die Urinprofile von Budesonid nach oraler und inhalativer Verabreichung und stellten fest, dass der MRPL von 6 $\beta$ -Hydroxy-Budesonid (Metabolit) auf 20 ng/ml gesenkt werden müsste, um eine eindeutige Differenzierung durchzuführen. (*Matabosch et al. 2013b*) Speziell für die endogenen GCs ist der festgelegte MRPL-Wert nicht aussagekräftig, da die endogene Produktion von vielen Faktoren abhängig ist.

Eine weitere Methode, verschiedene Applikationswege unterscheiden zu können, ist die Verwendung von Speichel als Analysenmatrix, was aktuell jedoch nicht in der Dopinganalytik angewandt wird. Thieme et al. (2013) konnten zeigen, dass eine transdermale Applikation von Testosteron zu einem signifikanten Anstieg der Speichelkonzentration führt. (*Thieme et al. 2013*) Begründet wird dies mit der Annahme, dass nach einer transdermalen Applikation mehr freies, nicht proteingebundenes Testosteron im Plasma vorliegt, welches in den Speichel diffundieren kann. Bedingt durch die ähnliche Struktur wäre dies auch für Glucocorticosteroide denkbar.

## B.2 Untersuchungsmedien

### B.2.1 Blutplasma - Proteinbindung der Glucocorticosteroide

#### B.2.1.1 Grundlagen der Proteinbindung

Das Blut übernimmt die Hauptaufgabe des Stoffaustauschs und des Stofftransports zwischen den einzelnen Verteilungsräumen im menschlichen Körper. Bezogen auf das Körpergewicht eines Erwachsenen enthält er durchschnittlich 8-9 % Blut. Dieses setzt sich aus ca. 55 % Plasma und 45 % zellulären Bestandteilen zusammen. Der Hauptbestandteil des Blutplasmas wiederum ist mit 90 % Wasser. In diesem befinden sich eine Vielzahl niedermolekularer Stoffe wie Salze, Glucose, Harnstoff etc. sowie 6-8 % Plasmaproteine. (Vaupel, Mutschler and Schaible 2015) Über 100 verschiedene Plasmaproteine kommen im menschlichen Plasma vor. Dabei handelt es sich um Albumine oder um Vertreter der Globuline ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). (Mutschler 2001) Sie liegen ungefähr in einem Verhältnis von 60:40 im Blut vor. Plasmaproteine sind im Allgemeinen für die Eigenschaften des Blutes verantwortlich und übernehmen da die Aufgabe des Stofftransports von wasserunlöslichen Substanzen, Hormonen und Enzymen. Für endogene Steroidhormone sind spezielle Transportproteine bekannt, welche mit hohen Affinitäten die jeweilige Substanzklasse binden können. Tabelle B-1 gibt einen kurzen Überblick über die wichtigsten Steroidhormone und ihre spezifischen Plasmaproteine.

**Tabelle B-1: Übersicht der wichtigsten endogenen Steroidhormone mit den dazugehörigen spezifischen Transportproteinen.**

Steroidhormon	Transportprotein
Testosteron	SHBG (Sexualhormon bindendes Globulin) ABP (Androgen bindendes Protein)
Estradiol	SHBG
Cortisol/Cortison	CBG (Corticosteroid bindendes Globulin)

Neben den gruppenspezifischen Transportproteinen steht auch das Albumin als Bindungspartner zur Verfügung. An dieses binden die Steroidhormone mit einer geringeren Affinität aber mit einer höheren Kapazität. Synthetische Steroidhormone binden meist mit einer geringeren Affinität an die gruppenspezifischen Transportproteine als endogene Steroide.

Durch die Plasmaproteinbindung wird die Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen (z.B. Hormone, Arzneimittel) reguliert, denn nur die nicht-proteingebundenen Anteile können aus der Blutbahn durch Biomembranen diffundieren und an den Zielorganen ihre Wirkung entfalten. Sie werden somit als biologisch aktiver Anteil der Substanz bezeichnet. Die proteingebundenen Anteile sind pharmakologisch inaktiv, stellen aber ein Reservoir dar, das den Anteil an freiem Hormon regulieren kann.

Das endogene GC Cortisol bindet mit einer hohen Affinität an das CBG (Corticosteroid bindendes Globulin/Transcortin). Ungefähr 80-90 % des zirkulierenden Cortisols im Menschen (*Westphal, Hammond 1990, Siiteri et al. 1982*) und 90 % des Corticosterons bei Ratten (*Hammond 1990, Henning 1978*) sind an das Transcortin gebunden, welches ein monomeres Glycoprotein ist und zur Gruppe der  $\alpha_1$ -Globuline gehört. Es besteht aus 383 Aminosäuren (*Hammond et al. 1987*) und das Molekulargewicht liegt zwischen 50 und 60 kDa. Das CBG besitzt eine Steroidbindestelle, an welche die Corticosteroide mit hoher Affinität binden. (*Mickelson et al. 1982, Westphal 1986*) Dennoch können an diese Stelle auch andere Steroide, z.B. Progesteron und Testosteron mit geringer Affinität binden. (*Westphal, Hammond, Smith and Underhill 1991*) Im Plasma liegt die CBG-Konzentration bei 30-52 pg/ml und macht einen Massenanteil von 0,05 % aller Plasmaproteine aus. (*Henley and Lightman 2011, Coolens and Heyns 1989, De Moor et al. 1967, De Moor et al. 1966*) Transcortin wird hauptsächlich in der Leber gebildet, jedoch wurden eine Produktion auch in anderen Geweben, wie Niere, Plazenta, Hoden, Lunge und weißem Fettgewebe nachgewiesen. (*Hammond et al. 1987*) Entsprechend der Hypothese der freien Hormone (*Mendel 1989*) wurde in Studien gezeigt, dass die CBG-Konzentration invers mit der Metabolisierung von Cortisol korreliert und durch das Wirken von Stressoren absinkt. (*Henley and Lightman 2011, Siiteri et al. 1982*) Die Expression von CBG kann herunter reguliert werden, was zu einem Anstieg der freien Corticosteroidkonzentrationen führt. (*Fleshner et al. 1995, Neufeld, Breen and Hauger 1994*) Die Konzentration des zirkulierenden CBG ist durch verschiedene Faktoren beeinflussbar. Erhöhte Konzentrationen wurden durch Östrogene und bei Patienten mit einer chronisch aktiven Hepatitis festgestellt. Eine Schwangerschaft und oral eingenommene Kontrazeptiva erhöhen die Werte um das Zwei- bis Dreifache. (*Meulenberg et al. 1987, Lentjes et al. 1993, Ho et al. 2007, Musa, Doe and Seal 1967*)

Da Transcortin nur eine relativ geringe Bindungskapazität besitzt, steht Albumin als weiteres Transportprotein zur Verfügung, welches jedoch eine geringere Bindungsaffinität zu den Corticosteroiden aufweist.

### B.2.1.2 Bestimmung des biologisch aktiven Cortisols in Plasma

Für die Bestimmung der freien, nicht-plasmaproteingebundenen Anteile eines Analyten stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung, dabei kommen indirekte und direkte Bestimmungen zum Einsatz.

Bei der indirekten Bestimmung wird der Anteil des freien Cortisols kalkuliert. Dafür werden die Totalplasmakonzentration sowie die Konzentration der Transportproteine bestimmt und der freie Anteil mit Hilfe der COOLENS-Gleichung (Formel B-1) berechnet. (Coolens and Heyns 1989) Weitere Gleichungen, die verwendet werden können, sind die DORIN's (Dorin et al. 2009) und die NGUYEN's (Nguyen et al. 2014) Gleichung. (Bae and Kratzsch 2015)

**Formel B-1: COOLENS Gleichung zur Berechnung der nicht-proteingebundenen Cortisolanteile im Blutplasma aus der Gesamtkonzentrationen und der CBG-Konzentration.**

$$U^2 \times K(1 + N) + U[1 + N + K(G - T)] - T = 0$$

U=Konzentration des freien Cortisols, T=Konzentration des gesamten Cortisols, G=CBG-Konzentration, K= Bindungsaffinität CBG zu Cortisol bei 37°C (was als konstanter Wert mit  $3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  angenommen wird), N= Verhältnis albumingebundenes zu freiem Cortisol (ebenfalls ein konstanter Wert=1,74) (Coolens, Van Baelen and Heyns 1987)

Kommen für die Bestimmung der CBG- und der Cortisolkonzentration immunchemische Verfahren zum Einsatz, muss hierbei beachtet werden, dass die Ergebnisse bedingt durch Kreuzreaktionen fehlerbelastet sein können. Außerdem wird für die Bindungsaffinität ein konstanter Wert angenommen und individuelle Einflüsse, wie konkurrierende Steroide aus Medikamenten, werden nicht berücksichtigt. Um dies zu umgehen kann die Konzentration des freien Cortisols im Plasma direkt bestimmt werden, wofür unterschiedliche technologische Methoden zum Einsatz kommen. Beispiele dafür sind die Gleichgewichtsdialyse, Ultrafiltration, Ultrazentrifugation, Affinitätschromatographie, Größenausschlusschromatographie und Festphasenmikroextraktion. (Robin, Predine and Milgrom 1978, Hamrahan, Oseni and Arafah 2004, Vogeser, Mohnle and Briegel 2007, Vogeser and Briegel 2007, Kirchhoff, Briegel and Vogeser 2011)

Am häufigsten in Laboren verwendet werden die Gleichgewichtsdialyse und die Ultrafiltration. Die Gleichgewichtsdialyse (ED) wird in einer Dialysekammer, welche eine semipermeable Membran enthält, durchgeführt. Diese Membran trennt das Plasma, mit den darin befindlichen Analyten, Proteinen und Analyt-Proteinkomplexen, von einer isotonischen Pufferlösung. Die nicht-proteingebundenen Analyten können diese Membran passieren wodurch ein Gleichgewicht zwischen beiden Kammern hergestellt wird. Eine Temperierung der Dialysekammern auf 37 °C imitiert dabei die physiologischen Bedingungen. (*Robin et al. 1978*) Für die Ultrafiltration (UF) werden Ultrafiltrationskartuschen, besteht aus einer Membran, welche eine Durchlassgrenze unterhalb des Molekulargewichtes des Proteins aufweist, verwendet. Somit können nur die niedermolekularen Komponenten passieren. Das heißt, die Proteine sowie die Analyt-Proteinkomplexe werden von der Membran zurückgehalten und nur die freien Anteile sind im Filtrat nachweisbar. Um eine schnelle und vollständige Trennung zu erhalten werden die Ultrafiltrationskartuschen meist zentrifugiert. Eine Temperierung der Probe auf Körpertemperatur (37 °C) während der Inkubation und der Filtration führt zu einer Imitation der physiologischen Bedingungen und somit zu einem realitätsnahen Ergebnis bzgl. der Plasmaproteinbindung (PPB). (*Lentjes et al. 1993, Vogeser and Briegel 2007*)

Studien, welche die indirekte und die direkte Bestimmung des freien Cortisols vergleichend betrachten, wurden u.a. von (*Ho et al. 2006, Vogeser, Mohnle and Briegel 2007, Pretorius et al. 2011*) durchgeführt. Vogeser et al. vergleichen in ihrer Studie zwei Ultrafiltrationskartuschen sowie eine Dialysezelle, wobei die ermittelten Cortisolkonzentrationen sehr gut miteinander korrelieren und auch ähnliche Werte liefern ( $ED = 1,2 * UF + 1,41 \text{ ng/ml}$ ), anders als die indirekten Bestimmung. Hier liegen die berechneten Konzentrationen (CALC) ca. 50 % unter den experimentell bestimmten Werten (Median: CALC = 14 ng/ml vs. ED = 29 ng/ml vs. UF = 23 ng/ml) (*Vogeser et al. 2007*) Pretorius et al. (*2011*) verglichen in ihrer Studie ebenfalls die Ultrafiltration mit der Gleichgewichtsdialyse sowie der theoretischen Bestimmung der freien Cortisolkonzentration mittels der COOLENs Gleichung. Die direkt bestimmten Konzentrationen nach UF und ED korrelieren auch hier sehr gut miteinander und weisen nahezu identische Werte auf ( $ED = 0,93 * UF + 1,08 \text{ ng/ml}$ ). (*Pretorius et al. 2011*) Entgegen den Ergebnissen von Vogeser et al. (*2007*) lagen die indirekt bestimmten Konzentrationen im selben Konzentrationsbereich wie die direkt gemessenen ( $UF = 1,12 * CALC - 0,85 \text{ ng/ml}$ ). (*Pretorius et al. 2011*) Tabelle B-2 gibt einen kurzen Überblick auf Forschungsarbeiten, in welchen sowohl die freien und gesamten Cortisolkonzentrationen bestimmt wurden und die dafür angewandten Aufarbeitungs-/Analysemethoden.

**Tabelle B-2: Literaturwerte: Referenzbereiche der Cortisolkonzentrationen im Blutplasma. Angabe der Gesamtkonzentration, des freien Anteils sowie dessen prozentualer Anteil. (w=weiblich; m=männlich, o.C.=ohne Kontrazeptiva)**

Literatur	Aufarbeitung/ Detektion	F (gesamt, ng/ml)	F (frei, ng/ml)	F (frei; %)
Lentjes et al. 1993	UF FPIA	w: 73,0 - 225,0 w(o.C.): 218,0 - 540,0	w: 7,9 (4,4 - 14,1) w(o.C.): 11,5 (4,0 - 19,2)	w: 3,7 - 9,0 w(o.C.): 1,5 - 4,5
Meulenberg et al. 1987	ED RIA	w: 142,8 ± 38,8 w(o.C.): 465,5 ± 114,2	w: 6,6 ± 2,9 w(o.C.): 11,7 ± 3,3	w: ~ 4,6 w(o.C.): ~ 2,5
Perogamvros et al. 2010	UF LC-MS/MS (frei) ECLIA (gesamt)	w: 125,1 ± 44,9 w(o.C.): 204,8 ± 60,9	w: 6,8 ± 3,2 w(o.C.): 8,3 ± 3,5	w: ~ 5,4 w(o.C.): ~ 4,0
Pretorius et al. 2011	UF LC-MS/MS	m: 102,2 (59,1 - 176,9) w: 109,5 (44,6 - 269,3)	m: 2,5 (1,0 - 6,3) w: 2,2 (6,5 - 7,3)	m: 2,5 (1,3 - 4,6) w: 1,9 (0,8 - 5,1)

Die freien Cortisol- und Cortisonkonzentrationen wurde bisher nur von McWhinney et al. (2010) bestimmt. Die ermittelten Gesamtkonzentrationen liegen bei 84,5 ng/ml (36,3 - 286,4 ng/ml) für Cortisol und 19,6 ng/ml (11,2 - 38,1 ng/ml) für Cortison. Die freien Konzentrationen, welche nach einer Ultrafiltration bestimmt wurden, liegen bei 0,9 ng/ml (0,4 - 2,5 ng/ml) für Cortisol und 1,2 ng/ml (0,8 - 2,5 ng/ml) für Cortison. Weiterhin zeigten sie, dass sich das Konzentrationsverhältnis Cortisol zu Cortison in den einzelnen Matrices unterscheidet und in der Reihenfolge Plasma > Ultrafiltrat > Urin > Speichel abnimmt. (McWhinney et al. 2010) Aus den erhaltenen Daten wurden keine Rückschlüsse auf die Plasmaproteinbindungen der beiden endogenen GCs gezogen.

## B.2.2 Speichel - Reflektion des Akutzustandes

### B.2.2.1 Speichel als Untersuchungsmedium

Obwohl dem Speichel 'das Drama des Blutes, die Aufrichtigkeit von Schweiß und die Emotionalität der Tränen fehlt' (übersetzt aus (Mandel 1990)), steigt die Nachfrage nach einer kostengünstigen, nicht-invasiven Methode um Krankheiten zu erkennen, Arzneimittelaufnahmen zu überwachen und den Gebrauch von legalen und illegalen Drogen nachzuweisen. (Aps and Martens 2005, Mandel 1990, Bosker and Huestis 2009, Chiappin et



al. 2007) Speichel oder, korrekter gesagt, die Mundflüssigkeit bieten dafür eine gute Grundlage als Untersuchungsmedium.

Wird die Mundflüssigkeit (oral fluid) als Matrix verwendet, so handelt es sich dabei um ein Gemisch aus Speichel und anderen Bestandteilen, z.B. dem Nasensekret, oral oder inhalativ aufgenommene Stoffe, Zellreste und Bakterien. (Glock et al. 1992) Der Speichel setzt sich dabei aus Wasser, Proteinen, Elektrolyten und Hormonen zusammen und wird in unterschiedlichen Speicheldrüsen produziert. (Aps and Martens 2005) Die kleinen Speicheldrüsen, welche sich im gesamten Mundraum befinden (ca. 750 Stück), übernehmen ca. 7 %, die Ohrspeicheldrüse (Glandula parotis) ca. 21 %, die Unterkieferspeicheldrüse (Glandula submandibularis) ca. 70 % und die Unterzungspeicheldrüse (Glandula sublingualis) ca. 2 % der Produktion. Die genaue Zusammensetzung ist dabei abhängig von der Tageszeit bzw. von der Schlaf- und Wachphase. (Aps and Martens 2005) Insgesamt werden pro Tag 0,5 - 1,5 Liter Speichel produziert, wobei der Speichelfluss zwischen 0,3 - 0,5 ml/min im Ruhezustand liegt. (Aps and Martens 2005, Kidwell, Holland and Athanaselis 1998) Die Speichelproduktion kann sowohl quantitativ als auch qualitativ beeinflusst werden. Dabei spielen z.B. Geruchs- und Geschmacksstimulierungen, Kauen, hormonelle und psychische Befindlichkeiten, das Alter und die Mundhygiene eine Rolle. (Chiappin et al. 2007) Auch die Einnahme von Medikamenten kann sich auf den Speichelfluss auswirken, z.B. kommt es durch Antidepressiva und Diuretika zu einer Reduzierung und durch Parasympathomimetika zu einer Erhöhung der Flussrate. (Aps and Martens 2005) Auch der pH-Wert des Speichels zeigt eine Abhängigkeit von der äußeren Stimulation: im Ruhezustand liegt er bei  $\text{pH} = 5,6 - 7$  und unter Aktivierung bei  $\text{pH} > 8$ . (Anizan and Huestis 2014)

Da Speichel die nicht-proteingebundenen Substanzanteile des Blutes widerspiegelt, kann es auch als „online-Filtrat“ bezeichnet werden. Für den Stofftransport aus dem Blut in den Speichel spielen die physikochemischen Eigenschaften der Substanzen eine wichtige Rolle. Ausschlaggebend ist dabei das Molekulargewicht, die Dissoziationskonstante ( $\text{pK}_a$ ), die Lipophilie und die Proteinbindung der Stoffe. (Anizan and Huestis 2014, Aps and Martens 2005) Als Transportmechanismen sind die Sekretion, die Filtration und die passive Diffusion möglich. Bei der Sekretion handelt es sich um einen aktiven Transportmechanismus, welcher z.B. durch Elektrolytpumpen an Hand von Konzentrationsgradienten erfolgt. Die Filtration steht für Substanzen zur Verfügung, deren Molekulargewicht unter 100 Da liegt wie z.B. Ethanol. Richtungsgebend ist auch hier ein Konzentrationsgefälle sowie der onkotische Druck, welcher zwischen den beiden Medien vorliegt. Die passive Diffusion ist für Moleküle mit einem Molekulargewicht kleiner 500 Da, welche nicht-proteingebunden vorliegen, möglich. (Anizan and Huestis 2014, Haeckel 1989, Kidwell et al. 1998) Weiterhin sind hier

die Lipophilie der Stoffe, je lipophiler desto besser die Diffusion, und der Ionisationsgrad, welcher durch den pH-Wert des Speichels und den pK<sub>a</sub>-Wert der Substanz bestimmt wird, ausschlaggebend. (Haeckel and Hanecke 1996, Kidwell et al. 1998)

Für den Übertritt der Substanzen aus dem Blut in den Speichel ist der pH-Wert des Speichels entscheidend. Für nichtionisierte Stoffe stellt sich dabei immer ein Gleichgewicht ein. Bei geringeren pH-Werten (Ruhespeichel) ionisieren basische Komponenten und es kommt zu einer Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung höherer Speichelkonzentrationen im Vergleich zum stimulierten Speichel. Für neutrale Substanzen sowie Substanzen mit einem pK<sub>a</sub>-Wert < 5,5 oder pK<sub>a</sub>-Wert > 8,5 spielen pH-Wertänderungen eine untergeordnete Rolle. (Anizan and Huestis 2014) Ein theoretischer Speichel/Plasma (S/P)-Quotient kann mit Hilfe der Formel B-2, welche aus der Henderson-Hasselbalch-Gleichung abgeleitet wurde, bestimmt werden. Diese Berechnung bezieht auch die Ionisation und die Proteinbindung mit ein. (Kidwell et al. 1998)

**Formel B-2: Gleichung zur Bestimmung des theoretischen Speichel/Plasma-Quotienten, welcher den Übergang von Substanzen aus dem Plasma in den Speichel charakterisiert.**

$$\text{saure Substanzen: } \frac{c_S}{c_P} = \frac{(1 + 10^{(pH_S - pK_a)})}{(1 + 10^{(pH_P - pK_a)})} \times \frac{f_P}{f_S}$$

$$\text{basische Substanzen: } \frac{c_S}{c_P} = \frac{(1 + 10^{(pK_a - pH_S)})}{(1 + 10^{(pK_a - pH_P)})} \times \frac{f_P}{f_S}$$

c<sub>S</sub> = Substanzkonzentration im Speichel; c<sub>P</sub> = Substanzkonzentration im Plasma; pH<sub>S</sub> = pH-Wert Speichel;  
 pH<sub>P</sub> = pH-Wert Plasma (wird als konstant mit 7,4 angenommen); pK<sub>a</sub> = Dissoziationskonstante der Substanz;  
 f<sub>P</sub> = freier, nicht-proteingebundener Anteil der Substanz im Plasma; f<sub>S</sub> = freier, nicht-proteingebundener Anteil der Substanz im Speichel (wird als 1 angenommen)

Speichel als Analysenmatrix wird bereits in der Überwachung von Medikamentenmissbrauch in klinischen Einrichtungen, am Arbeitsplatz, bei medizinischen Behandlungen und bei Gerichtsverhandlungen sowie zur Diagnostik von Krankheiten routinemäßig verwendet. Die Vorteile bestehen dabei in der einfachen, nicht-invasiven Probenentnahme, welche vom Probanden selbst durchgeführt werden kann. Weiterhin sind die Dominanz der Ausgangssubstanz sowie die Bestimmung der biologisch aktiven Anteile von Vorteil. Im Vergleich zur Bestimmung der Analyten im Blut ist eine vereinfachte Interpretation möglich, da nur die nicht-proteingebundenen Anteile aus dem Blut in den Speichel übergehen. Wichtig ist dies

unter anderem bei Patienten, bei denen die Produktion der Plasmaproteine gestört bzw. die Bindungskapazität reduziert ist. Hier führt die Bestimmung der Gesamtplasmakonzentration zu einer Fehlinterpretation der biologisch aktiven Substanzanteile. (*Brorsson et al. 2014, Hamrahian et al. 2004, Beishuizen, Thijs and Vermes 2001*)

Nachteilig für die Verwendung von Speichel sind jedoch das geringe Probenvolumen, welches z.B. durch einen "trockenen Mund" begünstigt wird, und die mögliche Beeinflussung des Testergebnisses durch Stimulierungen.

Da es sich bei der Speichelentnahme um eine sehr einfache Methode handelt, wird diese meistens durch die Studienteilnehmer selbst durchgeführt. Als Standardprotokoll wird dabei angegeben, dass es wichtig sei darauf zu achten, dass innerhalb der letzten 30 min vor der Probengewinnung keine Zähne geputzt werden, nichts gegessen und getrunken (außer Wasser) sowie kein Kaugummi gekaut wird. (*Chiappin et al. 2007*) Außerdem ist es wichtig, dass vorgegebene Zeitpunkte eingehalten werden. Dies ist besonders bei zyklisch freigesetzten Analyten, wie Cortisol, entscheidend, da es sonst zu größeren Streubreiten bei den Ergebnissen kommt. (*Jacobs et al. 2005, Kudielka, Broderick and Kirschbaum 2003*) Die Gewinnung des Speichels kann dabei auf unterschiedliche Weisen erfolgen. (*Bosker and Huestis 2009*) Zum einen gibt es die direkten Methoden, bei denen der Speichel entweder aktiv (durch Spucken) oder passiv (durch den Abfluss aus der Unterlippe; Sabbern) in ein Sammelbehälter gefüllt wird. Bei den indirekten Methoden kommt ein Probenentnahmesystem zum Einsatz. In den meisten Fällen sind es sterile Baumwoll- oder Kunstfaserröllchen (z.B. Salivetten® von Sarstedt), welche im Mund platziert und unter leichten Kaubewegungen mit Speichel gefüllt werden. (*Chiappin et al. 2007*) Für die Lagerung der Speichelproben ist es wichtig, dass diese schnellst möglich gekühlt, aliquotiert und eingefroren (min. -20 °C) werden. Dadurch werden ein Bakterienwachstum und mögliche Enzymaktivitäten verringert.

### *B.2.2.2 Corticosteroide im Speichel*

Speichel als Untersuchungsmatrix ist geeignet um die aktuellen Hormonkonzentrationen zu bestimmen. Steroide diffundieren aus dem Blut in den Speichel, sind unabhängig von der Flussrate und dem Speichelvolumen und korrelieren gut mit dem freien nicht-proteingebundenen Anteil im Blut. (*Vining and McGinley 1987, Wood 2009*) Die Bestimmung von Steroiden im Speichel wird besonders für klinische Fragestellungen verwendet, z.B. werden 4-Androsten-3,17-dion und Dihydrotestosteron bei Frauen mit Hyperandrogenismus (*Baxendale, Jacobs and James 1983*), 17 $\alpha$ -OH-Progesteron bei AGS-Patienten (*Walker et*

al. 1979a), Progesteron als Marker des weiblichen Zyklus (*Metcalf, Evans and Mackenzie 1984, Walker, Read and Riad-Fahmy 1979b*) und Cortisol bei Cushing's Syndrom-Patienten (*Papanicolaou et al. 2002, Putignano et al. 2003*) bestimmt. (*Lewis 2006*)

Da die Probenabnahme meist durch die Probanden selbst vorgenommen wird, ist es für die Studienverantwortlichen nicht immer möglich, die Compliance der Probenentnahme nach Standardprotokoll zu gewährleisten. Welchen Einfluss eine Nicht-Compliance hat, wurde in unterschiedlichen Studien untersucht.

Laut Standardprotokoll ist es entscheidend, dass direkt vor der Probenentnahme keine Nahrungsmittelaufnahme erfolgt bzw. die Zähne nicht geputzt werden. Es wird eine Wartezeit von min. 30 min empfohlen. Gröschl et al. (2001) untersuchten den Einfluss der Mundhygiene und einer Nahrungsmittelaufnahme (Brot und Milch) unmittelbar vor der Probenentnahme und konnten keine signifikanten Unterschiede in den nachweisbaren Cortisolkonzentrationen feststellen. (*Groschl et al. 2001*)

Tahara et al. (2007) und Tasaka et al. (2014) untersuchten den Einfluss von Kaubewegungen auf die Cortisolkonzentrationen. Dabei wurde nicht das direkte Kauen auf dem Probenentnahmesystem sondern das Kauen vor der Beprobung untersucht. Sie zeigen in ihren Arbeiten, dass Kauvorgänge > 10 Minuten die Cortisolkonzentration senken. Dies begründeten sie damit, dass Kauen eine Möglichkeit ist, um mentalen Stress abzubauen. Schlussfolgernd aus diesen Studien kann gesagt werden, dass die Kauzeit auf den Probenentnahmesystemen jedoch keinen Einfluss auf die Cortisolkonzentrationen haben sollte, da i.d.R. nur 2 Minuten gekaut wird. (*Tasaka et al. 2014, Tahara, Sakurai and Ando 2007*)

Die Verwendung von unterschiedlichen Systemen zur Probengewinnung wurde von Kidd et al. (2009) untersucht. Dabei vergleichen sie die Cortisolkonzentrationen von Speichelproben, welche direkt gewonnen wurden mit denen, die mit Hilfe von Baumwoll- bzw. Polyester-Salivetten gesammelt wurden. Die Proben der indirekten Methoden wiesen durchschnittlich zweieinhalb Mal so hohe Konzentrationen auf wie die direkten Proben ( $9,2 \pm 2,0$  ng/ml (Baumwolle) vs.  $10,1 \pm 3,3$  ng/ml (Polyester) vs.  $3,9 \pm 1,4$  ng/ml (direkt)). (*Kidd et al. 2009*) Begründet wurde dies mit Kreuzreaktionseffekten des verwendeten Immunoassays mit Matrixbestandteilen der Probenentnahmeröllchen. Für HPLC-Messungen wurde diese Beeinflussung nicht beobachtet. Nichtsdestotrotz müssen diese Erkenntnisse beachtet werden, wenn man Forschungsergebnisse von unterschiedlichen Studien bezüglich der Cortisolkonzentrationen vergleichen will. Die Verwendung von Salivetten Systemen hat den Vorteil, dass sauberere, nicht viskose Proben gewonnen werden, da die Probenentnahmeröllchen als Filter agieren und Zellrückstände und andere Fremdkörper adsorbieren. (*Kidd et*

al. 2009) Außerdem sind sie bequemer und vor allem hygienischer für die Handhabung bei der Probenentnahme und der Analyse im Labor. (Groschl 2008)

Das Standardprotokoll sieht nach der Probenentnahme eine gekühlte (+4 °C) oder gefrorene (-20 °C, besser -80 °C) Lagerung der Proben bis zur Analyse vor. Da auch dies nicht immer gewährleistet werden kann, wurden auch in dieser Richtung Studien betrieben. (De Palo et al. 2009, Garde and Hansen 2005, Groschl et al. 2001, Clements and Parker 1998, Aardal and Holm 1995, Chen, Cintron and Whitson 1992) De Palo et al. (2009) zeigen in ihren Untersuchungen, dass die Lagerbedingungen der Salivetten nach der Probenentnahme keinen Einfluss auf die nachweisbaren Corticosteroidkonzentrationen haben. Dabei vergleichen sie die Auswirkung einer Lagerung der Proben vor der Zentrifugation für 24 h bei RT und bei +4 °C, einer Lagerung nach Zentrifugation bei RT und +4 °C für 0 h, 4 h, 8 h und 24 h sowie einer Lagerung bei -80 °C für 1, 2 und 3 Monate. Für alle Untersuchungen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konzentrationen festgestellt. (De Palo et al. 2009) Ergänzend dazu stellten Garde und Hansen (2005) fest, dass eine Lagerung bei +5 °C für 3 Monate sowie eine Lagerung bei -20 °C bzw. -80 °C für ein Jahr zu keinen Veränderungen der Cortisolkonzentrationen führt. Bei RT gibt es jedoch einen Konzentrationsverlust von 9,2 % pro Monat. Viermalige Auftau- und Einfriervorgänge hatten ebenfalls keinen Einfluss auf die nachweisbaren Konzentrationen. (Garde and Hansen 2005)

Durch Krankheiten kann es zu einer geringen Speichelproduktion kommen, welche problematisch für die Probengewinnung ist. Dadurch ist es erforderlich, dass die Speichelproduktion angeregt wird. Dies führt zu Veränderungen des Speichel-pH-Wertes sowie zur Veränderung der Fließgeschwindigkeit, was wiederum einen Einfluss auf die Corticosteroidkonzentrationen haben kann. Brorsson et al. (2014) zeigten mit ihrer Untersuchung an 36 Freiwilligen, dass eine Stimulation mit in Glycerin und Zitronensäure getränkten Probenentnahmeröllchen keinen Einfluss auf die Cortisolkonzentrationen hat ( $5,76 \pm 4,35$  ng/ml vs.  $6,56 \pm 5,22$  ng/ml). (Brorsson et al. 2014) Um die Akzeptanz der Probenentnahme bei Kleinkindern zu steigern untersuchten Clements et al. (2007) eine Kombination von Marshmallows mit dem Probenentnahmeröllchen. Bei erwachsenen Testprobanden konnten sie keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben, welche direkt, und denen, welche mittels Baumwollröllchen mit und ohne Stimulation, gewonnen wurden, feststellen. (Clements et al. 2007)

Den wahrscheinlich größten Einfluss auf die Auswertbarkeit und Vergleichbarkeit von Cortisolspiegelkonzentrationen hat die Compliance der Probenentnahmezeit. Da Cortisol in einem zirkadianen Rhythmus vom Körper synthetisiert wird, ist es wichtig, dass die vom Studienprotokoll vorgeschriebenen Zeiten der Beprobung eingehalten werden. Als ein wichtiger Punkt ist hier die *Cortisol Awakening Response* (CAR) zu nennen. CAR ist Teil des

zirkadianen Rhythmus der Cortisolbiosynthese. Dabei kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Speichelkonzentration von Cortisol innerhalb der ersten 30 - 45 min nach dem morgendlichen Aufwachen. Bei gesunden Erwachsenen liegt dieser Anstieg zwischen 50 % und 156 %. (*Clow et al. 2004*) CAR wurde 1997 erstmals von Pruessner et al. beschrieben. Sie untersuchten in ihrer Studie den Verlauf des morgendlichen Cortisols von Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen und zeigen, dass es bei allen Gruppen zum typischen CAR-Verlauf kommt. (*Pruessner et al. 1997*) CAR ist dabei von unterschiedlichen Prozessen abhängig. Übersichten zur Korrelation von CAR mit psychischen und physischen Fragestellungen sind in den folgenden Reviews zusammengefasst: (*Clow et al. 2004, Chida and Steptoe 2009, Fries, Dettenborn and Kirschbaum 2009*) Weiterhin sind die CAR-Werte abhängig von der Compliance der Probenentnahme der Probanden einer Studie. Hier fehlt es an der Möglichkeit, dieses direkt durch die Studienverantwortlichen überwachen zu können. In ihren Review von 2016 fassten Stalder et al. an Hand der Forschungsergebnisse der letzten 15 Jahre Erfahrungen und Beweise zur methodischen CAR-Beurteilung zusammen und formulierten neue Richtlinien für die Bestimmung und Interpretation von CAR. (*Stalder et al. 2016*)

Kudielka et al. (2003) und Jacobs et al. (2005) untersuchten eine elektronische Überwachung der Compliance des Probenentnahmezeitpunktes. Dafür wurden die Salivetten in elektronische Dosiereinheiten (electronic drug exposure monitor) vorgelegt und ihr Entnahme elektronisch registriert. Die darüber informierte Gruppe wies eine Compliance von 97 % (30 ± 7 min) und die nicht informierte Gruppe von 84 % (125 ± 26 min) auf. Die Nicht-Compliance wirkte sich dabei hauptsächlich auf die Bestimmung (zu niedrig) von CAR aus, der restliche Tageszyklus entsprach annähernd dem der Compliance-Proben. (*Kudielka et al. 2003*) Jacobs et al. (2005) registrierten für eine spontane Probenentnahme nach einem akustischen Signal eine Compliance von 81 % und zeigten, dass Nicht-Compliance-Proben das Cortisoltagesprofil nicht verzerren. (*Jacobs et al. 2005*)

Cortisol und Cortison im Speichel wurden erstmals 1963 durch Greaves und West bestimmt. Dabei zeigten sie, dass die beiden Analyten in einem Verhältnis von 1:4 - 1:5 vorliegen und die Cortisolkonzentration bei Schwangeren erhöht ist. (*Greaves and West 1963*) Erst in den zeitigen 1980er Jahren wurden weitere Studie veröffentlicht, welche sich mit den Steroid-/Glucocorticosteroidnachweis im Speichel beschäftigten. (*Riad-Fahmy, Read and Walker 1980, Umeda et al. 1981, Hiramatsu 1981*) Seit dem rückt die Bestimmung der Cortisolkonzentrationen im Speichel für diagnostische Zwecke immer mehr in den Vordergrund. Zum Beispiel wird die Bestimmung der Cortisolkonzentrationen zwischen 23 Uhr und 24 Uhr genutzt, um das Cushing's Syndrom zu diagnostizieren und zu überwachen. (*Putignano et al. 2003, Nunes et al. 2009, Barrou et al. 1996, Yaneva et al.*

2004, Erickson et al. 2012) Weiterhin kann Speichelcortisol auch für die Diagnostik von Hypocortisolismus genutzt werden. Vergleichend mit den Serumwerten wurde Speichelcortisol bei NNR-Insuffizienz (Deutschbein et al. 2009, Marcus-Perlman et al. 2006, Cetinkaya, Ozon and Yordam 2007) und bei AGS (Groschl, Rauh and Dorr 2002, Hampl et al. 1990) untersucht. Speichelcortisol wird außerdem als Biomarker von Stresssituationen angewandt. An dieser Stelle wird auf zwei Reviews aufmerksam gemacht, welche zum einen alle wichtigen psychologischen und biologischen Einflussfaktoren auf die Speichelkonzentration diskutieren (Hellhammer, Wust and Kudielka 2009) und zum anderen einen Großteil bisheriger Arbeiten auf diesem Gebiet zusammenfassen (An et al. 2015).

Abgesehen von Greaves und West (1963) wird die Möglichkeit der Parallelbestimmung von Cortisol und Cortison im Speichel mittels LC-MS/MS-Technologie erst seit den letzten 7 Jahren betrachtet. (Antonelli et al. 2015, De Palo et al. 2009, Mezzullo et al. 2016, Perogamvros et al. 2009, Vieira, Nakamura and Carvalho 2014) Die nachgewiesenen Referenzwerte dieser Studien sind in Tabelle B-3 zusammengefasst.

**Tabelle B-3: Literaturwerte: tageszeitlich abhängige Referenzkonzentrationen der endogenen Corticosteroide sowie deren Verhältnis zueinander**

Literatur	Cortisol (F, ng/ml)		Cortison (E, ng/ml)		Verhältnis F-E	
	morgens	abends	morgens	abends	morgens	abends
De Palo et al. 2009	4,0 ± 1,5	0,9 ± 0,5	9,5 ± 3,2	1,6 ± 1,1	0,4 ± 0,2	1,0 ± 1,5
Perogamvros et al. 2009	3,0 (1,2 - 5,4)	0,2 (0,2 - 0,7)	12,5 (6,7 - 16,9)	2,1 (1,2 - 6,6)	0,2 (0,1 - 0,4)	0,1 (0,1 - 0,3)
Antonelli et al. 2015	3,1 (1,1 - 7,6)	0,3 (0,2 - 0,9)	9,2 (3,8 - 15,3)	1,7 (0,5 - 4,7)	0,3 (0,2 - 0,6)	0,2 (0,1 - 0,4)
Mezzullo et al. 2016	3,2 ± 0,3	0,5 ± 0,1	13,7 ± 1,0	4,2 ± 0,6	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1

## B.2.3 Haare - Langzeitnachweis für Steroidhormone

### B.2.3.1 Grundlagen der Haaranalytik

Werden Haare als Untersuchungsmedium verwendet, so lassen sich Langzeitnachweise von Substanzen über mehrere Monate bis Jahre retrospektiv durchführen. Für die Nachweisbarkeit von Substanzen sind der Aufbau der Haare, das Haarwachstum, die Art der Inkorporation und das Wirken von äußeren Einflussfaktoren entscheidend.

Die Haare sind pigmentierte Keratinfäden, die aus einer Haarwurzel und einem Haarschaft, welcher über die Hautoberfläche hinausragt, bestehen. Der Haarschaft ist dabei aus drei morphologischen Schichten aufgebaut (Abbildung B-2). Die äußerste Schuppenschicht wird als Cuticula bezeichnet. Die Zellen sind dachziegelartig übereinander angeordnet und bilden dadurch eine ca. 4 µm dicke Schutzschicht. Sie ist verantwortlich für die äußere Erscheinungsform des Haares, z.B. für den Glanz und die Struktur. Die darunterliegende Faserschicht, Cortex, besteht aus parallel angeordneten Proteinfasern, welche die Dicke und die Farbe des Haares bestimmen. Als innerste Schicht schließt sich das Mark, Medulla, an. Dieses besteht aus weniger dicht gepackten Zellen und kann Lufteinschlüsse beinhalten. (Mußhoff 2004, Birbeck and Mercer 1957c, Birbeck and Mercer 1957b, Birbeck and Mercer 1957a, Puccinelli, Caputo and Ceccarelli 1967)

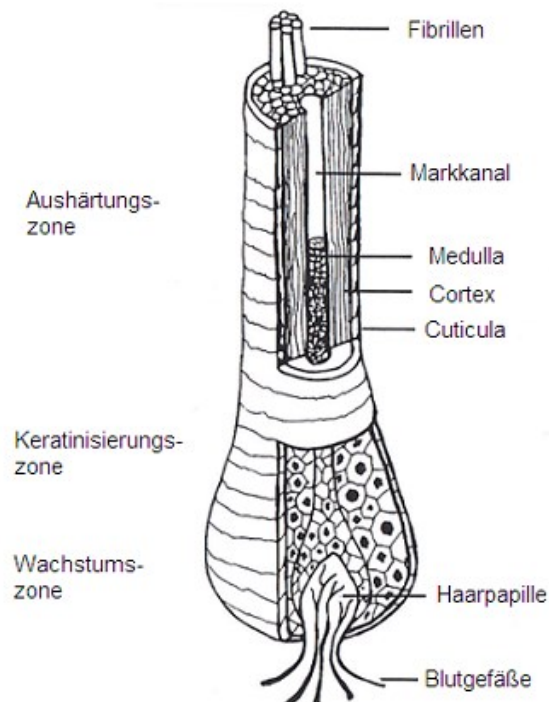


Abbildung B-2: Schematische Darstellung des Haaraufbaus. (nach (Mußhoff 2004))



In der Wachstumszone des Haarfollikels kommt es zur Zellteilung und die Bildung des Haares beginnt. Während der Wachstumsphase nimmt das Volumen der Zellen zu und es kommt anschließend in der Keratinisierungszone zur Synthese von Melanin, dem Haarpigment. Außerdem kommt es zur Verhornung der Zellen und Fibrillen bilden sich aus. In der darauffolgenden Aushärtungszone wird der Zellkern eliminiert und eine Dehydratation erfolgt, wodurch die Zellen absterben. Nach Benetzung des Haarschaftes mit Sebum, dem Sekret der Talgdrüsen, tritt das Haar durch die Hautoberfläche hinaus. (Mußhoff 2004, Pötsch 2004)

Außerhalb der Hautoberfläche durchläuft das Haar einen Wachstumszyklus, welcher sich aus drei Wachstumsphasen, der Anagenphase, der Katagenphase und der Telogenphase, zusammensetzt. (Abbildung B-3) Der Wachstumszyklus verläuft dabei asynchron und variiert mit den Körperregionen. Bei Kopfharen befinden sich 85 - 90 % in der anagenen Phase, 7 - 9 % in der telogenen Phase und 1 - 3 % in der Katagenphase. (Van Scott, Reinertson and Steinmuller 1957, Pötsch 2004) In der Anagenphase wächst das Haar für 5 - 7 Jahre durchschnittlich 1 cm pro Monat. Die angegebene Wachstumsrate der Kopfhare schwankt dabei zwischen 0,28 mm/Tag und 0,57 mm/Tag (Thieme and Sachs 2007, Sachs 1995, Kosuge et al. 1998) und ist abhängig von individuellen Einflüssen, wie z.B. Geschlecht, Alter und Medikamenteneinnahme. In der anschließenden Katagenphase (meist nur wenige Wochen) kommt es zur Einstellung der Keratinisierung und zur Kontraktion des Follikels. Danach ruht das Haar in der Telogenphase für ca. sechs Monate, bevor es von einem neuen Haar aus der Wurzel geschoben wird und ausfällt. (Mußhoff 2004, Kintz 2004) An anderen Körperstellen, wie der Arm-, Bein oder Ohrbehaarung ist der Zyklus meist verkürzt und der Anteil an telogenen Haaren erhöht. (Saitoh, Uzuka and Sakamoto 1970)

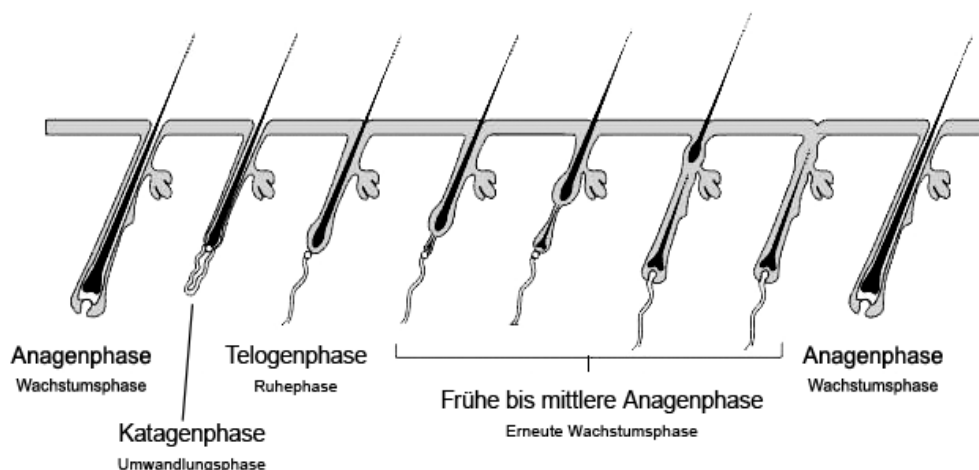
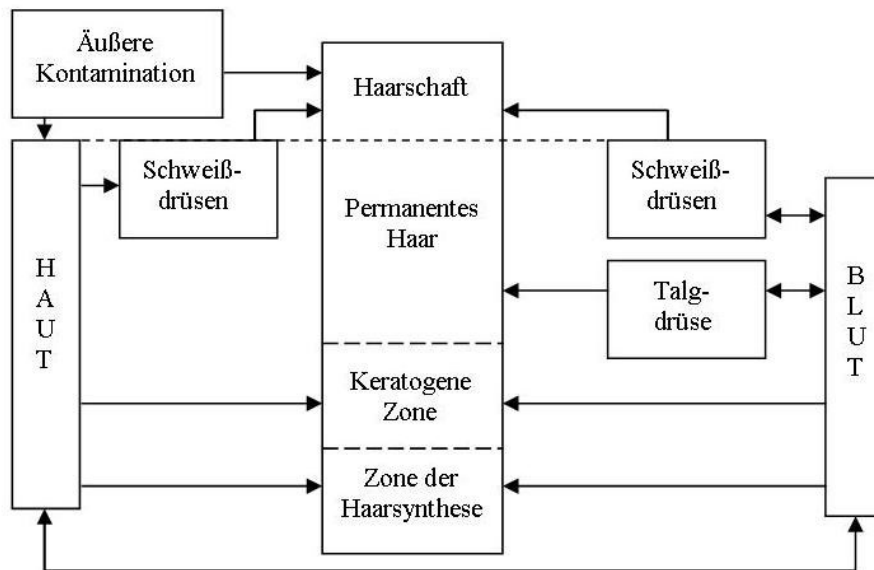


Abbildung B-3: schematische Darstellung des Lebenszyklus eines Haares mit Anagen-, Katagen- und Telogenphase (modifizierte Darstellung nach (Randall 2004))

Die Inkorporation von Substanzen in das Haar kann auf zwei Wegen erfolgen. Zum einen kann eine systematische Exposition während des Keratinisierungsprozesses in der Wachstumsphase dazu führen, dass Stoffe, welche über die Blutkapillare oder über das Flüssigkeitssystem der Haut zu den Haarwurzeln gelangen, von diesen aufgenommen und in das Haar eingelagert werden. Zum anderen kann das bereits fertig keratinisierte Haar durch den äußeren Kontakt mit Flüssigkeiten oder Gasen Substanzen aufnehmen. (Henderson 1993, Pötsch 2004, Kintz 2004) (Abbildung B-4)



**Abbildung B-4: Inkorporationsmechanismen: Die Einlagerung von Substanzen ins Haar kann über verschiedene Wege erfolgen. Die direkte Einlagerung aus dem Blut stellt für viele Substanzen die Hauptquelle der Inkorporation dar. Jedoch müssen auch die Einflüsse der Haut, der Drüsensekrete und von äußeren Kontaminationen beachtet werden. (modifizierte Darstellung nach (Henderson 1993))**

Für den Einbau von Substanzen aus der Blutlaufbahn ist es wichtig, dass die Stoffe einen pH-Gradienten zwischen dem Blut (pH 7,4) und dem Haarfollikel (pH 3 - 5) passieren müssen. Dies führt dazu, dass basische Stoffe eine höhere Membranpermeabilität aufweisen als saure oder neutrale Stoffe. Für Steroide, welche eher unpolar sind, sind die lipophilen Eigenschaften für die erfolgreiche Diffusion aus dem Blut in die Haarmatrix entscheidend. Weiterhin können Schweiß und Sebum als Inkorporationsquellen in Frage kommen, denn auch in ihnen sind Substanzen wie beispielsweise Steroide enthalten. Fehlerhafte Analyseergebnisse, welche nicht die physiologischen Bedingungen widerspiegeln, können durch Substanzein-/anlagerungen aus externen Verunreinigungen verursacht werden. Möglichkeiten einer Kontamination bestehen z.B. durch den Kontakt mit Feststoffen/Stäuben,

Rauch/Gas und Lösungen/Sekrete und sind besonders für den Drogennachweis im Haar zu beachten.

Für die qualitative und quantitative Ausprägung der Inkorporation von Substanzen in das Haarmaterial sind somit die folgenden Faktoren entscheidend:

- Substanzeigenschaften (Lipophilie, Basizität und Melaninaffinität)
- Konzentrationen im Blut/Sebum/Schweiß
- Pharmakokinetik (Plasmaproteinbindung, Metabolismus)
- Haarbeschaffenheit und Körperregion
- Umwelteinflüsse wie z.B. kosmetische Behandlungen

Die Verwendung von Haaren als Untersuchungsmedium bietet gegenüber den anderen Materialien, wie Blut, Speichel und Urin, den Vorteil, dass Aussagen über einen längeren Zeitraum getroffen werden können. Bedingt durch das Wachstum der Haare und die relativ stabile Inkorporation von Substanzen, können diese auch Wochen und Monate nach ihrer Einlagerung nachgewiesen werden. Weiterhin ist es von Vorteil, dass hauptsächlich die Ausgangssubstanzen und nicht die Metaboliten eingelagert werden, auch dadurch sind spezifischer Aussagen möglich. Ein Vorteil aber gleichzeitig auch ein Nachteil ist es, dass die Haarkonzentrationen Durchschnittswerte darstellen. Vorteilhaft ist, dass sie dadurch unbeeinflusst von tageszeitlichen Schwankungen, wie z.B. bei Cortisol, sind. Nachteilig ist, dass spontane Ereignisse, wie eine Einzeldosis eines Medikaments oder eine akut erhöhte Cortisolkonzentration, in den meisten Fällen nicht nachweisbar sind.

### *B.2.3.2 Corticosteroide in Haaren*

Der Inkorporationsmechanismus der Corticosteroide in den Haarschaft ist nicht vollständig aufgeklärt. Das Modell der Cortisolinkorporation geht davon aus, dass die Einlagerung aus dem Blut in den Haarschaft während des Haarwachstums die Hauptquelle darstellt. Somit spiegelt jeder Zentimeter Haar die durchschnittliche Plasmakonzentration für einen Monat wider. Jedoch werden auch Schweiß und Sebum als mögliche Einlagerungswege diskutiert. Russel et al. (2014) bestimmten als erste die Cortisolkonzentrationen im Schweiß und untersuchten eine mögliche Beeinflussung der Haarcortisolkonzentration (HCC) durch den Kontakt mit Schweiß. Die Cortisolkonzentrationen im Schweiß lagen bei  $74,6 \pm 41,5$  ng/mL (8,2 - 141,7 ng/ml), wobei die höchsten Werte morgens und die niedrigsten Werte abends

gemessen wurden. Die Schweißkonzentrationen korrelierten mit den mitbestimmten Speichelwerten. Was darauf hindeutet, dass auch der Schweiß nur die nicht-proteingebundenen Anteile des Blutes widerspiegelt. Weiterhin konnten sie zeigen, dass ein Kontakt von Haar mit cortisolhaltigen Lösungen (phosphatgepufferte Salzlösung als Schweißimitat, *in vitro*) zu einer Steigerung der Cortisolwerte führt, welche abhängig von der Kontaktzeit ist und mit einem Waschschrift nicht eliminiert werden kann. (Russell et al. 2014) Entgegen dieser Studie zeigten Grass et al. 2015, dass akuter Schweiß nicht zu Veränderungen der HCC führt. In zwei Studien, bei welchen starkes Schwitzen induziert wurde (Sport und Sauna), konnten sie nachweisen, dass HCC nicht durch das aktive Schwitzen beeinflusst wird. (Grass et al. 2015)

Corticosteroide wie auch andere Steroidhormone weisen keine Melaninaffinität auf und werden somit nicht fest an das Haarpigment gebunden. Dadurch sind sie anfällig für so genannte Auswaschvorgänge. Dies bedeutet, dass es nach der Einlagerung der Substanz in das Haar zu einer kontinuierlichen Reduzierung der Konzentration kommt, da äußere Einflüsse auf das Haar wirken. Dazu gehören kosmetische Haarbehandlungen (z.B. Waschen, Färben, Trocknen, Haarprodukte (Hamel et al. 2011, Li et al. 2011, Hoffman et al. 2014) aber auch Umwelteinflüsse wie UV-Strahlungen (Li et al. 2011). Der Auswascheffekt für Cortisol wurde unter anderem bei (D'Anna-Hernandez et al. 2011, Dettenborn et al. 2010, Kirschbaum et al. 2009, Gao et al. 2010, Zhang et al. 2013, Noppe, 2015) beobachtet, jedoch nicht bei (Manenschijn et al. 2011, Thomson et al. 2010). Eine systematische Untersuchung führten Li et al. (2011) durch. Die Arbeitsgruppe untersuchte das Auswaschverhalten von Cortisol in Abhängigkeit von der Waschzeit, der verwendeten Waschlösung und der Temperatur des Wassers. Mit zunehmender Länge des Waschvorganges und steigender Temperatur des Wassers sinkt die nachweisbare Cortisolkonzentration signifikant. Beispielsweise beträgt die Verlustrate für einen Waschvorgang von 16 h mit Wasser bei 40 °C  $61,9 \pm 9,0 \%$ , bei 65 °C  $79,7 \pm 9,3 \%$  und bei 80 °C  $91,2 \pm 4,6 \%$ . Für den Waschvorgang mit Shampoozusatz (4 h, 40 °C) kann die Arbeitsgruppe einen Substanzverlust von  $75,5 \pm 27,4 \%$  nachweisen. Weiterhin untersuchen sie die Wirkung von ultravioletter (UV) Strahlung auf die Cortisolkonzentration im Haar. Die neun stündige Bestrahlung von 12 Haarproben mit UV-Licht (254 nm) führt zu einem durchschnittlichen Konzentrationsverlust von  $26,5 \pm 20,9 \%$ . (Li et al. 2011) Auch Hoffmann et al. (2014) zeigten, dass es zu einer signifikante Reduzierung der Cortisolkonzentration nach 15 bzw. 30 Waschzyklen sowie nach Bleichen und semipermanenten Färbungen kommt. (Hamel et al. 2011, Li et al. 2011, Hoffman et al. 2014) Somit kann gesagt werden, dass die Anwendung von kosmetischen Behandlungen sowie die Wirkung von Umwelteinflüssen dazu führen, dass die eingelagerten Cortisolkonzentrationen während der Haaralterung abnehmen. Dieser Aspekt muss bei der Interpretation von retrospektiven Analysen über

mehrere Haarsegmente hinweg beachtet werden. Eine systematische Untersuchung dazu wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführt und 2013 veröffentlicht. (*Krumbholz et al. 2013*)

Studien zu Corticosteroiden in Haaren begannen im Jahr 2000, als *Cirimele et al.* klinische und forensische Haarproben auf zehn verschiedene endogene und synthetische Corticoide mittels HPLC analysieren. Dabei konnte die Arbeitsgruppe Prednison in den Haarproben von Patienten, welche damit nach einer Nierentransplantation behandelt wurden, nachweisen. Ebenso war der Nachweis von Beclomethason nach einer Asthmabehandlung erfolgreich. (*Cirimele et al. 2000*)

Der Nachweis des endogen produzierten GCs Cortisol rückte in den letzten Jahrzehnten immer mehr in den Vordergrund, dabei können die Forschungsarbeiten drei unterschiedlichen Kategorien zugeordnet werden: i) Cushing's Syndrom, ii) Überwachung von Hormonersatztherapien und iii) chronischer Stress. (*Wester and van Rossum 2015*) *Manenschijn et al. (2012)* und *Thomson et al. (2010)* nutzten die Haaranalyse für die Diagnostik des Cushing's Syndrom. CS-Patienten zeigten dabei signifikant erhöhte HCC im Vergleich zu Kontrollprobanden (399 pg/mg vs. 27 pg/mg bzw. 679 pg/mg vs. 116 pg/mg). (*Manenschijn et al. 2012, Thomson et al. 2010*) Bei retrospektiven Untersuchungen über den Haarstrang hinweg, konnten erhöhte Konzentrationen klinischen Ereignissen, wie einem zyklisch auftretenden CS, zu geordnet werden. (*Manenschijn et al. 2012*) Auch die Überwachung von Hormonsubstitutionstherapien wird mit Hilfe von Haaruntersuchungen durchgeführt. Dabei wurden bereits Studien bei erwachsenen NNR-Insuffizientpatienten und bei Kindern durchgeführt. (*Staufenbiel et al. 2015a, Gow et al. 2011, Noppe et al. 2014*) Auffällig bei diesen Studien ist, dass die NNR-Insuffizient-Patienten signifikant höhere HCC aufweisen als Kontrollgruppen. Bei den Kindern wurden für das proximale Haarsegment (0-3 cm) HCC von 13,3 pg/mg (10,3 - 17,2 pg/mg) für Patienten und für die Kontrollen von 8,2 pg/mg (5,9 - 11,3 pg/mg) bestimmt. (*Noppe et al. 2014*) Diese Ergebnisse widersprechen der Theorie der Hormonersatztherapie, denn diese soll die endogenen Bedingungen bestmöglich emulieren. Ob die erhaltenen Ergebnisse eine mögliche Übertherapie mit Hydrocortison widerspiegeln, oder ob andere individuelle endogene Parameter dazu führen, dass Cortisol während einer Hormonersatztherapie qualitativ und/oder quantitativ anders in das Haar eingebaut wird als bei gesunden Probanden, ist dabei fraglich.

Wie bereits im Absatz B.1.2.2 beschrieben zeigt Cortisol eine stressinduzierte Veränderung seiner Biosynthese. Im Fall von chronischem Stress ist bekannt, dass die Cortisolproduktion dauerhaft erhöht ist und somit als diagnostisches Hilfsmittel genutzt werden kann. Eine Einzelbeprobung bzw. das Sammeln von Proben (Blut, Urin oder Speichel) über einen Tag ist für die Diagnose oft nicht ausreichend. Deshalb werden auch hier Haaruntersuchungen

durchgeführt, um retrospektive Aussagen treffen zu können. Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass erhöhte Cortisolkonzentrationen mit Stress und Depressionen korreliert sind. ((*Yamada et al. 2007, Van Uum et al. 2008, Dettenborn et al. 2010, Karlen 2011, Dettenborn et al. 2012, Wei et al. 2015*); Reviews: (*Russell et al. 2012, Staufenbiel et al. 2013*))

Auch eine Schwangerschaft wird als chronische Stressbelastung diskutiert. Dabei handelt es sich nicht nur um eine psychische sondern auch um eine physische Belastung, welche eine Stressantwort hervorruft. Blutuntersuchungen haben gezeigt, dass es zu einer gesteigerten Biosynthese von Cortisol während der Schwangerschaft besonders im dritten Trimester kommt. (*Abou-Samra et al. 1984, Mastorakos and Ilias 2000, Carr et al. 1981, Smith, Nolan and Jubiz 1980*) Weiterhin steigt der Anteil an freiem Cortisol im Verlauf der Schwangerschaft an. (*Abou-Samra et al. 1984, Smith et al. 1980*) Die Konzentrationen sind in Tabelle B-4 wiedergegeben.

**Tabelle B-4: Literaturwerte: Veränderung der Blutkonzentrationen von Cortisol im Verlauf einer Schwangerschaft**

<b>Schwangerschafts-status</b>	<b>Gesamtcortisol (Carr et al. 1981)</b>	<b>Gesamtcortisol (Smith et al. 1980)</b>	<b>Freies Cortisol (Smith et al. 1980)</b>
1. Trimester	149 ± 34 ng/ml	130 ± 27 ng/ml	12 ± 3 ng/ml
2. Trimester	352 ± 90 ng/ml	210 ± 15 ng/ml	16 ± 2 ng/ml
3. Trimester	706 ± 148 ng/ml	267 ± 42 ng/ml	24 ± 5 ng/ml

Diese Untersuchungsergebnisse wurden als Ausgangspunkt genutzt, um auch Cortisol in Haaren während/nach einer Schwangerschaft nachzuweisen. (*Kalra et al. 2007, Kramer et al. 2009, Kirschbaum et al. 2009, D'Anna-Hernandez et al. 2011, Krumbholz et al. 2013, Braig et al. 2015*) Die mittels immunchemischen Verfahren bestimmten Cortisolwerte für das letzte Schwangerschaftstrimester liegen zwischen 40 pg/mg und 50 pg/mg. D'Anna-Hernandez et al. (2011) zeigen in einer viermaligen Beprobung (15 Schwangerschaftswoche (SSW), 26 SSW, 36 SSW und 3 Monate nach Entbindung) derselben Probanden, dass die Cortisolkonzentration im Verlauf der Schwangerschaft ansteigt und dann postpartum wieder absinkt. (*D'Anna-Hernandez et al. 2011*) Braig et al. (2015) wiesen in den Haarproben von 768 Frauen, welche direkt nach der Entbindung entnommen wurden, Cortisolkonzentrationen zwischen 0,3 pg/mg und 80,3 pg/mg ( $9,4 \pm 10,6$  pg/mg) für das proximale Haarsegment nach. (*Braig et al. 2015*) Die monatliche Veränderung der Cortisol- und Cortison-

konzentration im Verlauf einer Schwangerschaft wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation in zwei Follow-up-Studien untersucht und die Ergebnisse der ersten Studie 2013 veröffentlicht. (Krumbholz et al. 2013)

Die mittels immunchemischen Verfahren bestimmten Cortisolkonzentrationen liegen stets über denen, welche mittels Flüssigchromatographie (LC)-Tandemmassenspektrometrie (MS/MS) bestimmt werden. Im Jahr 2015 wurden von Russel et al. und von Slominski et al. zwei Studien veröffentlicht, welche sich damit beschäftigten. (Russell et al. 2015, Slominski, Rovnaghi and Anand 2015) In einem Ringversuch zeigen Russel et al., dass die Cortisolkonzentrationen, welche mittels LC-MS/MS bestimmt werden, eine hohe Korrelation mit den immunchemisch bestimmten aufweisen ( $r^2$  zwischen 0,88 und 0,97;  $P < 0,0001$ ). Für Forschungsgruppen, welche ausschließlich immunchemische Verfahren für die Cortisolbestimmung verwenden, wäre es somit möglich, speziell für ihren Assay einen Umrechnungsfaktor zu bestimmen, um ihre Werte mit LC-MS/MS-Werten vergleichen zu können. Die Cortisolkonzentrationen unterscheiden sich dabei für jede Methode und die immunchemisch bestimmten Konzentrationen liegen ausnahmslos höher als die LC-MS/MS-Werte. (Russell et al. 2015) Slominski et al. (2015) bestätigten diese Ergebnisse speziell für ihren verwendeten Immunoassay. Ein Nachteil der immunchemischen Verfahren stellen immer noch die möglichen Kreuzreaktionen (abhängig von den verwendeten Assays) mit anderen Steroiden dar. Dadurch können die gemessenen Konzentrationen fehlerbelastet sein. Besonders bei Situationen, welche zu großen hormonellen Veränderungen führen, wie eine Schwangerschaft, kann es zu Fehlinterpretationen kommen. Während einer Schwangerschaft steigt z.B. die Konzentration von Progesteron im Blut kontinuierlich an. Diese lässt schlussfolgern, dass Progesteron auch verstärkt in das Haar eingelagert wird. Cortisolimmunoassays weisen unterschiedlich stark ausgeprägte Kreuzreaktionen mit Progesteron auf (0,5 - 7,5 %), was zu einer fälschlichen Erhöhung der gemessenen Cortisolkonzentration führt. Ein weiterer Nachteil der immunchemischen Verfahren ist, dass zusätzliche Analyten wie Metaboliten qualitativ und quantitativ nicht mitbestimmt werden können. Dies ist aber mit einer massenspektrometrischen Bestimmung möglich. Hier stellt die Parallelbestimmung von Cortison als inaktiver Metabolit des Cortisols keine Schwierigkeit dar. Aus diesen Gründen ist für die letzten fünf Jahre festzustellen, dass immer mehr Forschungsgruppen von den immunchemischen Verfahren auf die Detektion mittels LC-MS/MS-Methodik umsteigen. In der folgenden Tabelle B-5 sind Referenzwerte der endogenen Corticosteroidkonzentrationen aus verschiedenen Studien der letzten Jahre zusammengefasst.

**Tabelle B-5: Literaturwerte: Referenzdaten für die endogenen Haarkonzentrationen der GC Cortisol und Cortison im proximalem Haarsegment (n.u.: nicht untersucht)**

Literatur	Haarsegment	Methode	Cortisol (pg/mg)	Cortison (pg/mg)
Raul et al. 2004	0-2 cm	LC-MS/MS	19,0 (5,2-91,0)	70,0 (12,0-163,0)
Gao et al. 2010	0-1 cm	HPLC-FLU	11,8 ± 6,0 (3,3-24,8)	n.u.
Stalder & Kirschbaum 2012	0-3 cm	LC-MS/MS	M: 5,5 (1,4-77,0) W: 5,2 (1,1-70,6)	M: 21,1 (2,7-109,8) W: 18,3 (5,4-108,0)
Gao et al. 2013	0-3 cm	LC-MS/MS	7.1 (1,6-17,6)	25,2 (6,1-52,7)
Zhang et al. 2013	0-1 cm	LC-MS/MS	14,2 ± 8,6	52,9 ± 26,7
Chen et al. 2013	0-1 cm	LC-MS/MS	5,1 (2,0-27,8)	62,1 (18,9-189,2)
Kuehl et al. 2015	0-3 cm	LC-MS/MS	M: 6,1 ± 1,4 W: 3,3 ± 0,7	M: 28,8 ± 4,9 W: 14,6 ± 2,1
Grass et al. 2015	0-2 cm	LC-MS/MS	ca. 3,0 <i>(abgeschätzt aus der Abbildung)</i>	Studie I: 9,5 ± 5,3 Studie II: 9,3 ± 7,4
Staufenbiel et al. 2015b	0-3 cm	LC-MS/MS	M: 3,6 (2,4-7,9 ) W: 2,9 (2,1-5,2)	M: 11,6 (8,5-18,3) W: 10,2 (7,0-14,3)
Quinete et al. 2015	0-3 cm	LC-MS <sup>3</sup>	12,7 ± 14,0 (1,9-72,2)	41,6 ± 42,0 (5,7-202,0)
Sauve et al. 2007	<i>nicht angegeben</i>	ELISA	46,1 (17,7-153,2)	n.u.
Thomson et al. 2010	0-1 cm	EIA	116,0 ± 54,0 (26,0-204,0)	n.u.
Gow et al. 2011	0-2 cm	EIA	184,7 (57,7-1479,0)	n.u.
Wei et al. 2015	0-1 cm	ECLIA	4890,0 ± 1584,0 (13,53 ± 4,37 pmol/mg)	n.u.
Staufenbiel et al. 2015a	0-3 cm	ELISA	10,1 (3,5-17,8)	n.u.



## **C Materialien und Methoden**

### **C.1 Chemikalien und Geräte**

#### **C.1.1 Chemikalien**

AccoGENE<sup>®</sup>, 10 x PBS, Lonza, Rockland, ME, USA

Acetonitril, gradient grade, J.T.Baker, Deventer, Niederlande

Ammoniak (25%), reinst zur Analyse, Th.Geyer, Renningen, Deutschland

Ammoniumacetat, NH<sub>4</sub>AC, Merck, Darmstadt, Deutschland

Essigsäure, 99,5 %, Th.Geyer, Renningen, Deutschland

Ethylenglycol, reinst zur Analyse, J.T. Baker, Deventer, Niederlande

Kaliumcarbonat, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Methyl-*tert*-Butyl-Ether, MTBE, reinst zur Analyse, Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Methanol, MeOH, reinst zur Analyse, J.T.Baker, Deventer, Niederlande

Natiumhydrogencarbonat, NaHCO<sub>3</sub>, J.T.Baker, Deventer, Niederlande

Reinstwasser, gradient grade, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

#### **C.1.2 Referenzsubstanzen**

Cortison, Sigma, St.Louis, MO, USA

Cortisol, Merck, Darmstadt, Deutschland

Cortisol-d<sub>4</sub>, CIL, Andover, MA, USA

Dexamethason, Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Fludrocortison, Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Prednisolon, LGC, Teddington, UK

Prednison, LGC, Teddington, UK

### C.1.3 Lösungen und Puffer

*SPE-Waschlösung:*

Basisches Methanol (MeOH / 2%ige NH<sub>4</sub>OH-Lösung [v:v 40:60])

*SPE-Elutionslösung:*

Methanol / Wasser (v:v 90:10)

*Carbonat-Festpuffer (pH = 9):*

Der Festpuffer besteht aus einem Gemisch von 84 g NaHCO<sub>3</sub> und 138 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

*LC-Puffer:*

Puffer A2 (Wasser/Acetonitril (v:v 95:5), 2 mmol NH<sub>4</sub>Ac, 0,1 % Essigsäure)

Puffer B2 (Wasser/Acetonitril (v:v 5:95), 2 mmol NH<sub>4</sub>Ac, 0,1 % Essigsäure)

*PBS-phosphatgepufferte Salzlösung:*

Verdünnung von AccoGENE<sup>®</sup> 1:10 mit Reinstwasser

Zusammensetzung AccoGENE<sup>®</sup>: 0.017 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 M NaCl; pH = 7,4

### C.1.4 HPLC-MS/MS-System

Für die HPLC-MS/MS-Analysen wurde der Flüssigchromatograph 1200 Series (Agilent Technologies) mit online Degasser, binärer Pumpe, beheizbarem Säulenofen und Autosampler, sowie das Massenspektrometer Q-Trap 5500 (AB Sciex) verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der Software Analyst 1.5.1 von AB Sciex.

*Geräteparameter HPLC*

Vorsäule:	Zorbax Eclipse XDB-C8; 2.1 mm * 12.5 mm; 5 µm
Säule:	
Haare:	Thermo Hypersil Gold C18; 2.1 mm * 100 mm; 3 µm
Speichel/Plasma:	Thermo Hypersil Gold C18; 2.1 mm * 50 mm; 3 µm
Solvent A:	Puffer A2
Solvent B:	Puffer B2
Fließgeschwindigkeit:	0,3 ml/min

Linearer Gradient	-3 min	90 % Puffer A2 / 10 % Puffer B2
	1 min	90 % Puffer A2 / 10 % Puffer B2
	3 min	0 % Puffer A2 / 100 % Puffer B2
	7 min	0 % Puffer A2 / 100 % Puffer B2
	8 min	90 % Puffer A2 / 10 % Puffer B2

Säulentemperatur: 25 °C

Injektionsvolumen: 2 µl (Speichel/Plasma) bzw. 5 µl (Haar)

### *Geräteparameter MS*

Ionisation: ESI, positiv

Quellentemperatur: 550 °C

### **C.1.5 Geräte zur Probenvorbereitung**

Analysenwaage, RC210D, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Kolbenhubpipetten, Labsystem, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Metallblockthermostat, Evaporator, Liebisch, Bielefeld, Deutschland

Pipettierautomat, Aspec XL4, Gilson, Middleton, USA

Reagenzglasschüttler/Vortexer, Reax2000, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland

Schwingmühle, MM 301, Retsch, Haan, Deutschland

Tischzentrifuge, Centrifuge 5702, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tischzentrifuge, Centrifuge 5430, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Überkopfschüttler, Reax 2, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland

Ultraschallbad, Sonorex Super 10P, Bandelin, Berlin, Deutschland

## **C.2 Studienprotokolle**

### **C.2.1 Bestimmung der Plasmaproteinbindung der Corticosteroide**

#### Projektbeschreibung

Untersuchungen von GCs im Blut, Speichel und Haar haben gezeigt, dass die beiden endogenen Glucocorticoide in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander in diesen Matrices vorliegen. Meist wird hier mit einer Metabolisierung von F zu E beim Übergang aus dem Blut in die jeweilige Matrix argumentiert. Die Plasmaproteinbindungen der GCs bleiben dabei unberücksichtigt. Um ihren Einfluss auf die Verhältnisverschiebung zu überprüfen, wurden Plasmaproben im Rahmen eines vom Bundesinstitut für Sport geförderten Projektes (Projektnummer: IIA1-070302/14, Ethikvotum:1777/07) gewonnen. Die Probandenbetreuung, die Durchführung der Experimente sowie die Probennahme erfolgten an der Technischen Universität München in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie.

Das Projekt kann in vier Telexperimente untergliedert werden.

*1.Experiment:* Bestimmung der Basalwerte an vier Zeitpunkten (obot)

*2.Experiment:* Bestimmung der Werte nach physischer Beanspruchung (1 h Intensivtraining am Fahrradergometer, 5 h nach Experimentbeginn, sprich 13:00 Uhr; mbot)

*3.Experiment:* Bestimmung der Werte nach Testosteronapplikation (transdermal via Testosteronpflaster (TESTOPATCH® 2,4 mg/24 h, Pierre Fabre Pharma, Freiburg, Deutschland), appliziert zum Zeitpunkt t=0 h; obmt)

*4.Experiment:* Bestimmung der Werte nach physischer Beanspruchung (siehe mbot) und Testosteronapplikation (siehe obmt) (mbmt)

Während der Experimente wurden von jedem Probanden Serumproben und Speichelproben entnommen (Tabelle C-1). Da Blankproben (obot) für alle Tageszeiten zur Verfügung standen, war jeder Proband seine eigene Kontrolle.

**Tabelle C-1: Speichel-und Serumproben der Probanden während der vier o.a. Experimente (durchnummerierte Proben) mit den dazugehörigen Entnahmezeiten**

Probenentnahmezeit nach Experimentbeginn	Tageszeit	Experiment			
		obot	mbot	obmt	mbmt
0h	08:00 Uhr	1	5	12	19
3h	11:00 Uhr	2	6	13	20
6h	14:00 Uhr	3	7	14	21
9h	17:00 Uhr	4	8	15	22
24h	08:00 Uhr		9	16	23
48h	08:00 Uhr		10	17	24
72h	08:00 Uhr		11	18	25

### Probanden, Probenentnahme und Bereitstellung

Bei den Probanden handelt es sich um neun männliche Freizeitsportler ( $30 \pm 8$  Jahre), welche freiwillig an diesem vierstufigen Projekt teilnahmen. Die Blutabnahme erfolgte am liegenden Probanden mit Standardblutabnahmesystemen (Vacuette® Serum Z Clot Activator, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich). Nach einer Gerinnungsphase von 45 min wurden die Blutserumröhrchen zentrifugiert (25 °C, 2020 g, 30 min). Das gewonnene Serum wurde aliquotiert und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

Die Speichelentnahme erfolgte über die direkte Probengewinnung mittels Sali Tubes® (DRG Instruments GmbH, Marburg, Deutschland). Die Proben wurden bis zu Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

## **C.2.2 Speichelstudie: Corticosteroide im Speichel**

### Projektbeschreibung

Die Speichelanalytik bietet die Möglichkeit, die biologisch aktiven Substanzanteile im Körper beurteilen zu können, ohne eine invasive Probenentnahme vorzunehmen. Dies ist für den Nachweis von Glucocorticosteroiden von Vorteil, da die Auswirkungen einer akuten Stresssituation bedingt durch die Probenentnahme vermindert werden. Im Rahmen dieses Projektes sollte das Potential von Speichelproben für die Differenzierung zwischen einer legalen und einer verbotenen Anwendung von GCs überprüft werden. Für den Sport ist der Gebrauch von GCs durch die Richtlinien der WADA reguliert. Die orale, rektale, intramuskuläre und intravenöse Anwendung von GCs während eines Wettkampfes ist

verboten. Mit den Routineanalysen im Urin ist es jedoch nur unzureichend möglich Differenzierung vorzunehmen. Als Ausgangshypothese steht die Behauptung, dass sich die Konzentrationen der GCs bzw. deren Verhältnisse zueinander im Speichel unterscheiden, wenn die GCs endogen produziert bzw. oral eingenommen werden. Dieses Forschungsprojekt wurde von der US-Antidopingagentur (Partnership for clean competition) unterstützt und finanziert.

### Probanden und Probenbereitstellung

Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit dem Klinikum der Ludwig Maximilians Universität (LMU) München, Bereich Endokrinologie, wurden Speichelproben von AGS-Patienten sowie von Kontrollprobanden untersucht.

Für die Patientengruppe wurden 82 männliche Probanden rekrutieren, welche einer Dauermedikation mit GCs unterliegen. Die Proben wurden von den Patienten an fünf Abnahmezeitpunkten (ca. 6, 10, 16, 20 und 24 Uhr) selbstständig gesammelt, um ein Tagesprofil zu erstellen. Die Speichelproben wurden mit Hilfe des Salivetten® Speichelentnahmesystems gewonnen, von der LMU München aliquotiert, hinsichtlich ihrer Medikation und der Abnahmezeit anonymisiert und bis zur Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

Als Kontrollgruppe wurden 59 gesunden Probanden ausgewählt, von welchen je eine Speichelprobe am Morgen (ca. 08:00 Uhr) und am Abend (ca. 20:00 Uhr) genommen wurde. Die Kontrollgruppe setzte sich aus 25 weiblichen (36 ± 17 Jahre) und 34 männlichen (30 ± 16 Jahre) Probanden zusammen. Diese mittels Salivetten® gewonnenen Proben wurden ohne weitere Bearbeitung von der LMU tiefgefroren und für die Analyse bereitgestellt.

### **C.2.3 Haarstudie: Endogene Glucocorticosteroide im Haar**

#### Projektbeschreibung:

Untersuchungen von Corticosteroiden in Haaren haben gezeigt, dass die Konzentrationen der endogenen GCs im Haar entgegengesetzt den Blutkonzentrationen sind. Die Nachweisbarkeit von GCs ist von unterschiedlichen Parametern, wie physischen, physikalischen und chemischen Veränderungen, beeinflusst. In einer Vorstudie wurde gezeigt, dass die endogenen Corticosteroidkonzentrationen entlang des Haarschaftes abnehmen. Die durchschnittliche Abnahme zwischen benachbarten Segmenten (je 3 cm) lag bei 42,8 % (3,1-84,1%) für Cortison und 48,3 % (8,8-72,8 %) für Cortisol. An Hand der einmaligen Probenentnahme bei diesen Probanden konnte keine eindeutige Aussage über

die Ursache dieser Reduzierung getroffen werden. (Krumbholz 2012) Ziel dieser Studie war es deshalb, den Einfluss dieser Faktoren mit Hilfe mehrmaliger Probenentnahmen zu untersuchen und für eine Bewertung von proximalen Segmentkonzentrationen Referenzbereiche festzulegen. Teile dieser Studie wurden bereits veröffentlicht. (Krumbholz et al. 2013)

### Proband und Probennahme

Im Rahmen der Zusammenarbeit mit der Endokrinologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München wurden gesunde Kontrollprobanden rekrutiert, welchen je eine Haarprobe entnommen wurden. Insgesamt wurden 94 Probanden beprobt, davon 45 weibliche im Alter von  $34,7 \pm 18,1$  Jahren und 49 männliche Probanden ( $32,0 \pm 15,3$  Jahre).

Weiterhin wurde im Rahmen einer Follow-up-Studie einer Probandin (weiblich, 35 Jahre) über einen Zeitraum von 10 Monaten monatlich eine Haarprobe entnommen. Die Probenentnahme begann am 10.09.2011. Zu diesem Zeitpunkt befand sich die Probandin in der 6. SSW. Weitere Proben wurden in der 12, 17, 21, 25, 30, 34 und 38. SSW sowie 1, 5 und 9 Wochen nach der Entbindung (pp) gewonnen. Die letzte Probenentnahme erfolgte am 06.07.2012. Nach einer Selbstauskunft veränderte die Probandin während dieser Zeit weder ihr Haarwaschverhalten, noch verwendete Haarprodukte. Es wurde keine permanente Haarbehandlung (Färbung, Bleichung etc.) durchgeführt.

### **C.2.4 Schwangerschaftsstudie: Korrelation von Haar, Speichel und Plasma**

Während einer weiteren Follow-up-Studie wurden von einer Probandin (27 Jahre) sowohl Haar- als auch Speichel- und Serumproben zu äquivalenten Zeitpunkten gesammelt. Aus den Ergebnissen sollten zusammenführende Erkenntnisse für die drei vorrausgehenden Studie gewonnen werden. Um möglichst hohe endogene Variationen zu erzielen, erfolgte die Studie im Rahmen einer Schwangerschaft. Eine Auflistung der Proben ist in Tabelle C-2 zusammengestellt.

Nach einer Selbstauskunft veränderte die Probandin während dieser Zeit weder ihr Haarwaschverhalten, noch verwendete Haarprodukte. Es wurde auch keine Haarbehandlung (Färbung, Bleichung etc.) durchgeführt. Am 29.01.2014 wurde die Resthaarsträhne (ca. 1,5 cm), welche nach der ersten Probenentnahme (30.12.2013) am Hinterkopf verblieb (ca. 0,5 cm) sowie bereits nachgewachsen war, gebleicht. Diese Markierung wurde genutzt, um die Wachstumsrate des Haares bestimmen zu können. Aus diesem Grund wurde die Länge dieser Strähne bei jeder neuen Probennahme gemessen.

Die Plasmaproben wurden im Rahmen von Routineuntersuchungen während der Schwangerschaft gewonnen. Die Proben wurden zeitnah (innerhalb von 30 min) zentrifugiert, das Plasma abgenommen, aliquotiert und bis zur Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

Die Speichelproben wurden mit dem Salivetten®-System ca. 10 min vor der Blutentnahme gewonnen (außer SSW 16+5). Sie wurden ebenfalls zentrifugiert, aliquotiert und bis zur Bearbeitung bei -20 °C gelagert. Weiterhin wurden im 2. Trimester (17. SSW und 23. SSW), im 3. Trimester (29. SSW und 33. SSW) sowie 13 Monate postpartum Speicheltagesprofile gesammelt.

**Tabelle C-2: Zusammenstellung der gesammelten Haar-, Speichel- und Plasmaproben während und nach der Schwangerschaft der Probandin. Es ist das Datum und die Uhrzeit der Probenentnahme mit dem dazugehörigen Schwangerschaftsstatus aufgelistet.**

Nr.	Entnahme	Datum	Länge der gefärbten Haarsträhne	Entnahmezeit	
				Plasma	Speichel
0	Vor der SS	-	-	./.	./.
1	SSW 07+4	30.12.2013	-	./.	./.
2	SSW 12+0	30.01.2014	Ca. 1,5 cm	08:00 Uhr	07:50 Uhr
3	SSW 16+5	04.03.2014	Ca. 2,5 cm	11:00 Uhr	07:30 Uhr
4	SSW 20+1	28.03.2014	Ca. 3,5 cm	07:30 Uhr	07:20 Uhr
5	SSW 24+1	25.04.2014	Ca. 4,5 cm	07:15 Uhr	07:05 Uhr
6	SSW 29+5	03.06.2014	Ca. 6,0 cm	07:30 Uhr	07:20 Uhr
7	SSW 33+5	01.07.2014	Ca. 7,0 cm	07:30 Uhr	07:20 Uhr
8	SSW 37+6	30.07.2014	Ca. 8,0 cm	08:00 Uhr	07:50 Uhr
9	2 Wochen pp	29.08.2014	Ca. 9,0 cm	./.	07:30 Uhr
10	6,5 Wochen pp	30.09.2014	Ca. 10,0 cm	./.	08:00 Uhr
11	12 Wochen pp	05.11.2014	Ca. 11,5 cm	08:00 Uhr	07:30 Uhr
12	6 Monate pp	05.02.2015	Ca. 14,5 cm	08:00 Uhr	07:50 Uhr
13	13 Monate pp	16.09.2015	Ca. 22,0 cm	08:00 Uhr	07:40 Uhr



## **C.3      Probenvorbereitung**

### **C.3.1     Aufarbeitung der Plasmaproben**

#### *C.3.1.1    Bestimmung der freien Steroidkonzentrationen*

Für die Bestimmung der freien Steroidkonzentrationen im Plasma musste die Ultrafiltrationsmethode an die aktuelle Fragestellung angepasst werden. Dies erfolgte mit den Schritten: „Prekonditionierung des Filters“, „Waschen des Filtrerrückstandes“, „Auswahl der Filterporengröße“ und „Verdünnen des Plasmas“. Die Beschreibungen dieser Schritte sowie deren Ergebnisse sind im Anhang 1 aufgeführt.

Als optimale Methode etablierte sich die Ultrafiltration mit 30 kDa-Filter (Amicon® Ultra-0,5, MerckMillipore, Darmstadt, Deutschland). Nach einer Prekonditionierung mittels 0,5 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, 15 min, 37 °C, 6500 rpm) wurden 250 µl Plasma zur Äquilibration (37 °C, 15 min) auf den Filter aufgetragen. Die Ultrafiltration wurde für 40 min bei 37 °C und 6500 rpm durchgeführt. Vom erhaltenen Filtrat wurden 125 µl entnommen und 250 µl PBS sowie interner Standard (IS) d<sub>4</sub>-Cortisol (d<sub>4</sub>-F) = 2,5 ng zugegeben. Nach pH-Werteinstellung (pH = 9, ca. 20 mg Carbonat-Festpuffer) wurden die Proben mittels Methyl-*tert*-Butyl-Ether (MTBE, 2 x 2,5 ml, 15 min) extrahiert. Nach anschließender Zentrifugation (3500 rpm, 10 min) wurden die Etherphasen abgetrennt, vereinigt und nach Zugabe von 30 µl Ethylenglycol unter Stickstoffstrom bei 60 °C eingedampft.

#### *C.3.1.2    Bestimmung der Gesamtsteroidkonzentration*

Für die Bestimmung der Gesamtkonzentrationen der GCs im Plasma wurde eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mittels MTBE durchgeführt. Dafür wurde ein Aliquot (250 µl) der Plasmaproben mit 250 µl PBS verdünnt und nach Zusatz von d<sub>4</sub>-F (2,5 ng) extrahiert. Die Etherextraktion erfolgte nach Einstellung des pH-Wertes auf 9 (Zugabe von ca. 20 mg Carbonat-Festpuffer) zweimalig mit je 2,5 ml MTBE für je 15 min im Überkopfschüttler. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (3500 rpm, 10 min), die Etherphasen abgetrennt, vereinigt und nach Zugabe von 30 µl Ethylenglycol unter Stickstoffstrom bei 60 °C eingedampft.

### **C.3.2 Aufarbeitung der Speichelproben**

Mit Ausnahme der bereits aliquotierten Patientenproben wurden die Speichelproben noch im Probenentnahmeröhrchen (Salivetten) befindlich zur Verfügung gestellt. Für die Gewinnung des Speichels wurden diese bzw. die Speichelaliquote über Nacht bei 5 °C aufgetaut und anschließend zentrifugiert (15 min, 3500 rpm). Von allen Proben wurde ein 250 µl-Aliquot für die weitere Bearbeitung verwendet. Diese wurden mit 250 µl Reinstwasser verdünnt und nach Zugabe des IS d<sub>4</sub>-F (500 pg) erfolgte die Abtrennung der Steroide aus der Speichelmatrix bei pH 9 (Zugabe von ca. 20 mg Carbonat-Festpuffer) durch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit MTBE (2,5 ml, 15 min). Nach der Zentrifugation (5 min, 3500 rpm) wurde die organische Phase abgenommen und der Extraktionsschritt wiederholt. Die beiden erhaltenen Etherfraktionen wurden vereinigt und nach Zugabe von Ethylenglycol (30 µl) unter Stickstoffstrom bei 60 °C eingedampft.

### **C.3.3 Aufarbeitung von Haarproben**

Die Aufarbeitung der Haarproben erfolgte nach der 2012 am Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie etablierten und validierten Methode zur Bestimmung von Corticosteroiden in Haaren. (*Krumbholz et al. 2013*)

Die Probenentnahme erfolgte den Richtlinien der *Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie* (GTFCh) und *Society of Hair Testing* entsprechend am Hinterkopf der Probanden (*vertex posterior*). Es wurde eine ca. bleistiftdicke Haarsträhne kopfhautnah entnommen und bis zur Analyse in Aluminiumfolie gewickelt, trocken bei RT gelagert. Für die Bearbeitung der Proben wurden diese in die zu untersuchenden Abschnitte segmentiert und anschließend mittels Schere zerkleinert (Länge < 1 mm). Die Segmentierung erfolgte dabei problemorientiert. Die Schwangerschaftsproben wurden in 2-cm-Segmente und die Kontrollproben in 3-cm-Segmente geschnitten.

Soweit vorhanden wurden 50 mg Haarmaterial eingewogen. Nach Zugabe von d<sub>4</sub>-F = 2,5 ng wurde die Methanolextraktion (2,5 ml, 4 h, 50 °C, Ultraschallbad) durchgeführt. Nach der Zentrifugation wurde die Methanolphase abgenommen und nach Zugabe von 30 µl Ethylenglycol unter Stickstoffstrom bei 60 °C eingedampft. Die Rückstände wurden mit 0,5 ml Reinstwasser aufgenommen und mittels Festphasenextraktion (SPE) gereinigt. Dies erfolgte teilautomatisch am Pipettierautomaten. Die Konditionierung der SPE-Kartuschen (BondElut Plexa, 3 ml, 60 mg, Agilent) erfolgte mit Methanol (3 ml) und Reinstwasser (1 ml). Nach dem Auftragen der Probe wurde mit 3 ml SPE-Waschlösung gewaschen um nichtbindende Matrixbestandteile zu entfernen. Die Elution der Analyten erfolgte mit 3 ml der

SPE-Elutionslösung und nach erneuter Zugabe von Ethylenglycol (30 µl) wurden die SPE-Eluate unter N<sub>2</sub>-Strom bei 60 °C eingedampft.

### C.3.4 Kalibrierung

#### C.3.4.1 *Plasmaproben*

Da kein GC-freies Plasma existiert, wurde eine Lösungsmittelkalibrierung mit PBS (500 µl) angewandt (Tabelle C-3). Die Kalibrierungsproben sowie eine Plasma-QC-Probe wurden äquivalent zu den Probenreihen mittels Ultrafiltration und Etherextraktion aufgearbeitet.

**Tabelle C-3: Kalibrierungsproben zur quantitativen Bestimmung von F und E im Ultrafiltrat (UF) und Etherextrakt (EE)**

Probe	Analytkonzentration (ng/ml) für UF		Analytkonzentration (ng/ml) für EE	
	F	E	F	E
Blank	0,0	0,0	0	0
Cal 1	0,8	0,2	8	2
Cal 2	2,0	0,5	20	5
Cal 3	4,0	1,0	40	10
Cal 4	8,0	2,0	80	20
Cal 5	20,0	5,0	200	50
Cal 6	40,0	10,0	400	100

#### C.3.4.2 *Speichelproben*

Für jedes Probenbatch wurden eine Qualitätskontrollprobe, zwei Blankproben und sechs Kalibrierungsproben mitgeführt. Diese umfassten, abhängig von der Fragestellung, sowohl die endogenen Steroide Cortisol (F) und Cortison (E) als auch die synthetischen Corticosteroide Prednison (PN), Prednisolon (PLN), Dexamethason (D) und Fludrocortison (FLU). Die jeweiligen Konzentrationen sind in der Tabelle C-4 wiedergegeben. Die Kalibrierungen wurden im wässrigen Medium (500 µl Reinstwasser) durchgeführt. Lagen die analysierten Konzentrationen von einzelnen Proben deutlich über diesem Kalibrierbereich, so wurde eine alternative Kalibrierung, fallspezifisch, durchgeführt. Konzentrationen zwischen Limit Of Detection (LOD) und Limit Of Quantification (LOQ) wurden semiquantitativ bestimmt.

Tabelle C-4: Kalibrierungsproben für die Bestimmung der Steroidkonzentrationen im Speichel

Probe	Analytkonzentration (ng/ml)		
	E	F	PN/PLN/D/FLU
Blank	0,0	0,0	0,0
Cal 1	0,2	0,1	0,2
Cal 2	0,5	0,25	0,5
Cal 3	1,0	0,5	0,8
Cal 4	2,0	1,0	1,0
Cal 5	5,0	2,5	2,0
Cal 6	20	10	5,0
Cal 7	50	25	10

#### C.3.4.3 Haarproben

Für jede Probenaufarbeitungsserie wurde sowohl eine Matrixkalibrierung als auch eine Lösungsmittelkalibrierung mitgeführt. Als Blankhaarmatrix wurde der Haarspitzenschnitt einer 54-jährigen Probandin verwendet, in welchem auf Grund der langjährigen Haarbleichung keine endogenen Steroidhormone (E, F) nachweisbar waren. Die Kalibrierpunkte wurden den zu erwartenden Konzentrationsbereichen (2 - 50 pg/mg) angepasst. Lagen die quantifizierten Konzentrationen oberhalb des Bereiches wurde eine weitere Kalibrierreihe aufgearbeitet. Konzentrationen zwischen LOD und LOQ wurden semiquantitativ bestimmt.

## C.4 Messung der Proben mit HPLC-MS/MS

Für die qualitative und quantitative Bestimmung der Steroidkonzentrationen in den Proben wurden diese mittels HPLC-MS/MS analysiert (Geräteparameter: siehe Kapitel C.1.4). Dafür erfolgte die Wiederaufnahme der Proben mit 30 µl LC-Puffer A2. Einen Überblick über die substanzspezifischen Parameter gibt die Tabelle C-5.

**Tabelle C-5: Übersicht zu den LC-MS/MS-Parametern der Zielanalyten. Bei den angegebenen MRM-Übergängen (Multiple-Reaction-Monitoring, Q1 zu Q3) dient der erste der Quantifizierung und der zweite der Identifizierung.**

Analyt	t <sub>R</sub> (min)	MS/MS-Parameter			
		Q1 (Da)	DP (V)	Q3 (Da)	CE (eV)
Cortisol (F)	3,73	363,2	90	309	24
				267	27
Cortison (E)	3,75	361,2	55	163	33
				121	43
Dexamethason (D)	3,86	393,2	120	355	16
				373	13
Fludrocortison (FLU)	3,74	381,2	160	325	29
				343	30
Prednison (PN)	3,72	359,2	35	171	35
				147	43
Prednisolon (PLN)	3,72	361,2	41	343	15
				147	31
d <sub>4</sub> -Cortisol (d <sub>4</sub> -F)	3,73	367,2	85	121	31

## C.5 Validierung der Analysenmethoden

Entsprechend der Richtlinien der GTFCh wurde an drei Tagen eine Doppelbestimmung der Validierungspunkte durchgeführt. Die Methoden wurden bezüglich ihrer Sensitivität (LOD, LOQ), ihrer Linearität, ihrer Intraday- und Interday-Stabilität und ihrer Wiederfindungsrate ausgewertet. Die Konzentrationsniveaus der einzelnen Analyten sowie das verwendete Matrixmaterial sind in Tabelle C-6 aufgeführt.

Da für die Erstellung der Validierungsreihen im Speichel und im Plasma kein natürliches Blankmaterial zur Verfügung stand, wurden Alternativen verwendet, deren Anwendbarkeit im Rahmen von Voruntersuchungen getestet wurde.

**Tabelle C-6: Zusammenfassung der Validierungsparameter bzgl. der verwendeten Matrices und der Kalibrierungsbereiche für die GCs**

	<b>Haar</b>	<b>Speichel</b>	<b>Plasma/ UF</b>	<b>Plasma/ EE</b>
Matrix	„Blankhaar“ (w 54 J.)	Reinstwasser	PBS	PBS
Cortison	2-100 pg/mg	0,5-50 ng/ml	0,2-10 ng/ml	2-100 ng/ml
Cortisol	2-100 pg/mg	0,25-25 ng/ml	0,8-40 ng/ml	8-400 ng/ml

## C.6 Statistische Auswertung

Für die statistischen Auswertungen der erhaltenen Daten wurde die Software SPSS 21 genutzt. Als Signifikanzniveau  $\alpha$  wurde, wenn nicht anders angegeben,  $\alpha = 0,05$  gewählt. Da es sich bei den einzelnen Parametern meist um nicht normalverteilte Daten handelte, wurden Nicht-Parametertests für Gruppenvergleiche angewandt. Lagen paarweise verbundene Daten vor, so wurde der Wilcoxon-Test (W-Test) verwendet. War dies nicht der Fall, wurde der Mann-Whitney-U-Test (MW-U-Test) durchgeführt. Die Vergleiche erfolgten stets mit den Einzelwerten der jeweiligen Probanden und nicht mit den Mittelwerten oder Medianen. Die Korrelationen zwischen den unterschiedlichen Matrices bzw. zwischen den Analyten wurden mittels Spearman-Korrelation überprüft.

## D Ergebnisse und Diskussion

### D.1 Validierungsergebnisse

Um statistisch sichere Ergebnisse zu erzielen wurden die Untersuchungsmethoden hinsichtlich ihrer quantitativen Bestimmungsgrenzen (LOD, LOQ), Intraday- und Interday-Stabilitäten und der Wiederfindung (Wf) validiert. Die erhaltenen Ergebnisse für die einzelnen Untersuchungsmatrizes sind in der Tabelle D-1 zusammengefasst.

**Tabelle D-1: Parameter für die quantitative Bestimmung von Cortisol und Cortison im Haar, Speichel und Plasma (L = linear)**

	LOD	LOQ	Regression	Intraday CV (%)	Interday Bias (%)	Wf (%)
<i>Haar</i>						
Cortisol	1,6 pg/mg	3,1 pg/mg	L; 0,998	7,1	8,7	88
Cortison	2,1 pg/mg	3,7 pg/mg	L; 0,998	7,0	7,6	105
<i>Speichel</i>						
Cortisol	0,08 ng/ml	0,16 ng/ml	L; 0,999	6,1	-1,8	96
Cortison	0,09 ng/ml	0,15 ng/ml	L; 0,999	7,5	-3,6	93
<i>Plasma/UF</i>						
Cortisol	0,11 ng/ml	0,30 ng/ml	L; 0,997	9,3	7,9	79
Cortison	0,12 ng/ml	0,25 ng/ml	L; 0,998	6,9	8,1	82
<i>Plasma/EE</i>						
Cortisol	2,13 ng/ml	3,24 ng/ml	L; 0,993	2,7	3,9	97
Cortison	0,54 ng/ml	1,81 ng/ml	L; 0,995	4,1	4,6	102

## **D.2 Plasmaproteinbindung der endogenen Glucocorticoide**

Wie alle Steroidhormone binden auch die GCs an Plasmaproteine um im Körper transportiert zu werden. Als Bindungspartner stehen das CBG und das Albumin zur Verfügung. Für Cortisol wird die Plasmaproteinbindung mit ca. 96 % angegeben, d.h. nur 4 % der gesamten Cortisolkonzentration liegen frei, nicht-proteingebunden im Plasma vor und sind somit biologisch aktiv und können von den Zellen aufgenommen werden. Bisherige Untersuchungen geben keinen Aufschluss über die Plasmaproteinbindung für Cortison. Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, diese zu bestimmen und Faktoren zu untersuchen, welche Einfluss auf die Intensität der Proteinbindung der GCs haben können.

### **D.2.1 Absolute Hormonkonzentration der Corticosteroide**

Im Rahmen dieses Projektes wurden Serumproben von neun männlichen Probanden hinsichtlich ihrer Gesamtkonzentration an GCs sowie den nicht-proteingebundenen Anteilen untersucht. Die Hormonkonzentration der GCs sowie die daraus berechneten PPB und Analytverhältnisse Cortisol/Cortison in den einzelnen Untersuchungsmedien sind in der Tabelle in Anhang 2 wiedergegeben. Grundsätzlich betrachtet zeigen sich für alle Konzentrationen sowie für die PPB und Analytverhältnisse große interindividuelle Streubreiten.

### **D.2.2 Basalkonzentrationen und Plasmaproteinbindung der GCs**

Für die Bestimmung der Basalkonzentrationen der GCs im Plasma werden die Proben verwendet, welche im Experiment 1 (obot) gewonnen wurden. Da diese an vier Zeitpunkten genommen wurden, kann der Einfluss der tageszeitabhängigen zyklischen Sekretion der Corticosteroide dargestellt werden. Tabelle D-2 gibt die gemittelten Konzentrationen sowie das Analytverhältnis wieder.



**Tabelle D-2: Gesamtkonzentrationen, freier Anteil und Analytverhältnis der GCs in Abhängigkeit von der Tageszeit.**

Probenentnahmezeit	08:00 Uhr	11:00 Uhr	14:00 Uhr	17:00 Uhr
<b>freier, nicht-proteingebundener Anteil</b>				
<b>Cortison (ng/ml)</b>	5,9 ± 2,3	3,9 ± 1,0	3,6 ± 0,8	2,8 ± 1,1
<b>Cortisol (ng/ml)</b>	9,1 ± 5,8	3,0 ± 1,2	2,6 ± 1,1	2,0 ± 1,0
<b>Cortisol/Cortison</b>	1,4 ± 0,6	0,8 ± 0,3	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,1
<b>Gesamtkonzentration</b>				
<b>Cortison (ng/ml)</b>	25,1 ± 11,5	24,1 ± 7,6	24,4 ± 4,6	20,8 ± 9,7
<b>Cortisol (ng/ml)</b>	125,1 ± 81,9	72,5 ± 26,7	84,1 ± 28,1	67,3 ± 38,7
<b>Cortisol/Cortison</b>	4,9 ± 1,5	3,1 ± 0,6	3,4 ± 0,9	3,2 ± 0,6

Für die Cortisolkonzentrationen sind signifikante Unterschiede (Abnahmen) nur zwischen den ersten beiden Probenentnahmezeiten zu erkennen (W-Test:  $P(\text{UF}) = 0,008$ ;  $P(\text{EE}) = 0,021$ ). Zwischen den weiteren Proben liegen keine signifikanten Unterschiede vor. Die Cortisonkonzentrationen unterscheiden sich nur in den freien Anteilen der ersten beiden Entnahmezeiten signifikant (W-Test:  $P(\text{UF}) = 0,021$ ).

Weiterhin ist zu erkennen, dass die Konzentrationen für E tageszeitlich weniger schwanken als für F. Die Absolutkonzentration an freiem E sinkt zwischen 8 Uhr und 17 Uhr um  $50,7 \pm 9,2\%$  ab, wohingegen sich die freie F-Konzentration um  $71,9 \pm 16,2\%$  reduziert. Für die Gesamtkonzentrationen sind Abnahmen von  $23,3 \pm 10,8\%$  (E) bzw.  $47,5 \pm 16,1\%$  (F) nachzuweisen. Die Konzentrationen der GCs korrelieren dabei schwach bis mäßig (Anhang 3) und lassen sich mit den Gleichungen der Formel D-1 beschreiben.

**Formel D-1: Beschreibung der Korrelationen der GCS und der Matrices untereinander**

$$[E_{\text{frei}}] = 0,086 \times [E_{\text{gesamt}}] + 2,037 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$$

$$[F_{\text{frei}}] = 0,055 \times [F_{\text{gesamt}}] - 0,589 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$$

$$[F_{\text{gesamt}}] = 4,969 \times [E_{\text{gesamt}}] - 30,003 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$$

$$[F_{\text{frei}}] = 2,635 \times [E_{\text{frei}}] - 4,08 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$$

An Hand der Konzentrationen der freien GCs und den Gesamtkonzentrationen lässt sich die Plasmaproteinbindung nach der Formel D-2 berechnen.

**Formel D-2: Gleichung zur Berechnung der Plasmaproteinbindung der Corticosteroide**

$$PPB(A) = \frac{([A_{gesamt}] - [A_{frei}])}{[A_{gesamt}]} \times 100\%$$

[A<sub>frei</sub>] = Konzentration im Ultrafiltrat; [A<sub>gesamt</sub>] = Konzentration im Etherextrakt

**Tabelle D-3: durchschnittliche PPB der GCs in Abhängigkeit von der Tageszeit**

Probenentnahmezeit	08:00 Uhr	11:00 Uhr	14:00 Uhr	17:00 Uhr
PPB Cortison (%)	75,5 ± 8,6	82,6 ± 5,6	84,3 ± 5,3	84,8 ± 6,5
PPB Cortisol (%)	92,8 ± 3,2	95,3 ± 2,5	96,6 ± 1,5	96,8 ± 1,3

Der Vergleich der Plasmaproteinbindungen der GCs (Tabelle D-3) zeigt, dass es zu einem leichten Anstieg der gebundenen Anteile im Verlaufe des Tages kommt. Jedoch ist dieser nur für den direkten Vergleich der ersten beiden Probenentnahmezeiten signifikant (W-Test: P(E) = 0,008; P(F) = 0,015). Zwischen den einzelnen Probanden unterscheiden sich die plasmaproteingebundenen Anteile nicht signifikant voneinander, wobei Proband 3 immer den geringsten Startwert aufweist.

Die Ergebnisse für Cortisol bestätigen bisherige Forschungen, dass F mit durchschnittlich 96 % proteingebunden im Plasma vorliegt. Die PPB von Cortison wurde erstmals bestimmt und liegt bei durchschnittlich 85 % und ist somit geringer als für F. Dadurch gleichen sich die Analytverhältnisse F zu E von ca. 3:1 im Gesamtanteil auf ca. 1:1 für die freien Anteile an. Somit stehen für den Übergang in andere Medien vergleichbare Konzentration von F und E im Plasma zur Verfügung. Ob und wie sich die Plasmaproteinbindungen der GCs beeinflussen lassen, wurde mit den Experimenten 2-4 untersucht und wird in den folgenden Abschnitten diskutiert.

### D.2.3 Veränderungen der Plasmakonzentrationen und Proteinbindung der Glucocorticosteroide durch exogenen Einflüsse

Die endogene Produktion der GCs verläuft in einem zirkadianen Rhythmus und ist von unterschiedlichen Faktoren, wie dem Alter, dem Gesundheitszustand und Hormonspiegel, abhängig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde getestet, wie sich die GC-Produktion und die PPB verändern, wenn eine physische Beanspruchung stattfindet oder ein Eingriff in den Hormonhaushalt via transdermale Testosteronapplikation durchgeführt wird.

Um den Einfluss von exogenen Parametern eindeutiger beurteilen zu können, ist es notwendig, den Faktor der tageszeitlichen Schwankungen aus der Betrachtung heraus zurechnen. Aus diesem Grund werden in den folgenden Abschnitten die relativen Veränderungen der Konzentrationen sowie der PPB im Vergleich zu den Basalwerten betrachtet. Dazu werden die prozentualen Relationen zu den entsprechenden Zeitkontrollen (obot) berechnet (Formel D-3). Als Bezugsgrundlage für die erhobenen Werte nach 24 h, 48 h und 72 h dienen die Basalwerte bei t = 0 h, da diese zur gleichen Uhrzeit (08:00 Uhr) entnommen wurden. Bei den in den Diagrammen gekennzeichneten Daten (\*) liegen signifikante Unterschiede (P < 0,05) zwischen den Basalwerten und denen der jeweiligen Experimente vor.

**Formel D-3: Bestimmung der relativen Veränderungen der Experimentdaten zu den Basalwerten**

$$rel. \text{Veränderung (\%)} = \frac{[A_{\text{Experiment}}]}{[A_{\text{basal}}]} * 100\%$$

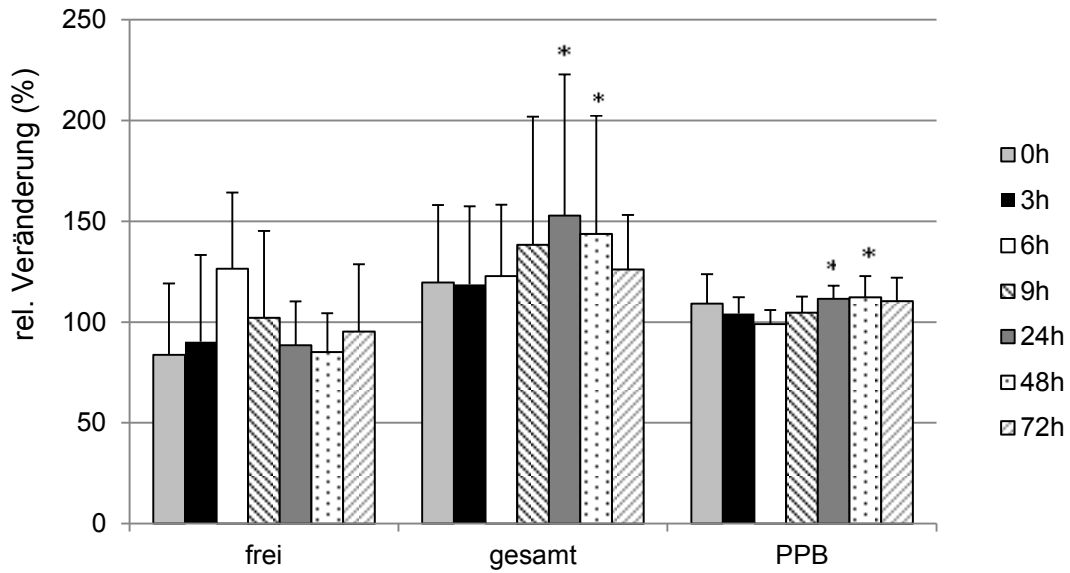
### D.2.3.1 *Physische Belastung via Fahrrad-Ergometer*

Für die Auswertung dieses Experiments muss beachtet werden, dass die Gesamtkonzentrationen (absolut) der GCs über denen des Basalexperiments liegen. Wohingegen die freien Anteile unter den Basalwerten liegen. Dies deutet darauf hin, dass unterschiedliche Stressbelastungen abseits des jeweiligen Experimentes (z.B. familiär oder beruflich) vorliegen, was die Konzentrationen unabhängig vom eigentlichen Experiment erhöht oder vermindert.

Nichtsdestotrotz ist bei den relativen Betrachtungen ein signifikanter Anstieg der freien Cortisol- und Cortisonkonzentrationen in der Probe, welche unmittelbar nach der Belastung gewonnen wurde ( $t = 6$  h) zu erkennen. Die zum Basalwert relativen Konzentrationsveränderungen im Ultrafiltrat verdreifachen sich für Cortisol von  $69,5 \pm 35,6\%$  ( $t=0$  h) auf  $204,6 \pm 126,1\%$  ( $t=6$  h). Für Cortison ist eine Erhöhung um den Faktor 1,5 zu beobachten ( $83,8 \pm 35,6\%$  vs.  $126,4 \pm 37,8\%$ ). Die Probenpaare 3 h-6 h und 6 h-9 h unterscheiden sich signifikant voneinander (W-Test: E (3 h-6 h):  $P=0,036$ ; E (6 h-9 h):  $P=0,036$ ; F (3 h-6 h):  $P=0,011$ ; F (6 h-9 h):  $P=0,015$ ). In der darauffolgenden Probe ( $t=9$  h) sind die Konzentrationen wieder auf Basalniveau abgesunken.

Auch für die Gesamtkonzentration an F ist ein Anstieg, welcher jedoch nicht signifikant ist, für die Probe  $t = 6$  h nachzuweisen, wohingegen die E-konzentration nahezu unverändert bleibt. Die Plasmaproteinbindungen unterscheiden sich zwischen den Probenentnahmezeiten ( $t = 3/6/9$  h) nicht signifikant voneinander, sind aber in den Proben bei  $t = 6$  h am geringsten (Abbildung D-1). Dies zeigt, dass für die akute Stressbewältigung nach der Beanspruchung mehr freies Cortisol vom Körper zur Verfügung gestellt wird als unter normalen Bedingungen.

A) Cortison



B) Cortisol

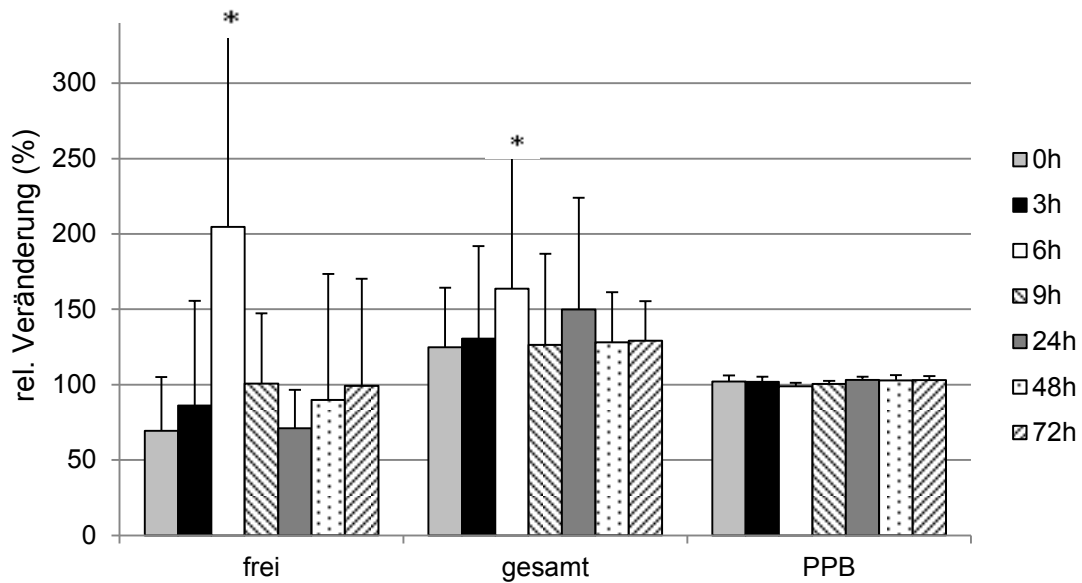
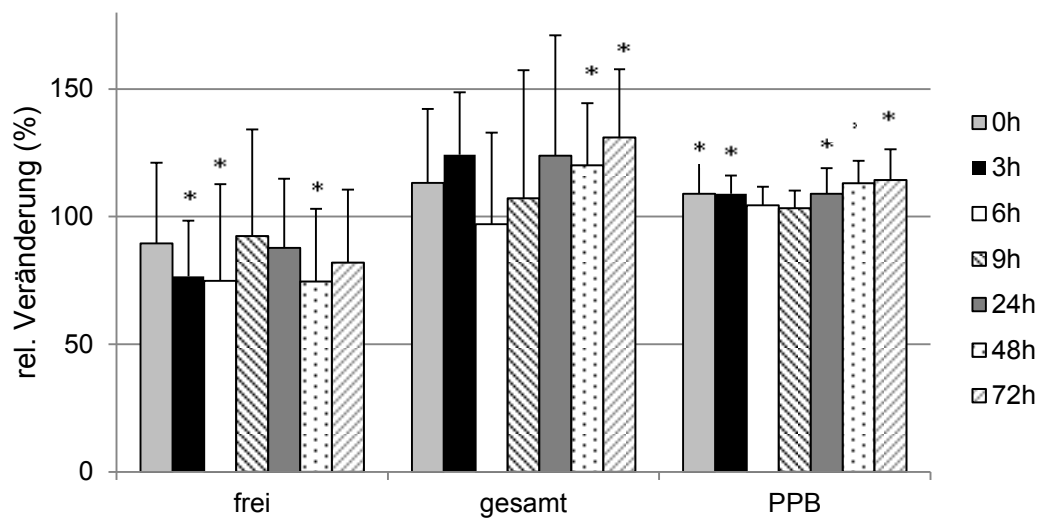


Abbildung D-1: Verlauf der relativen Veränderungen der Konzentrationen und PPB nach einer einstündigen physischen Belastung

D.2.3.2 *Transdermale Testosteronapplikation*

Nach einer transdermalen Testosteronapplikation werden im Vergleich zu den Basalkonzentrationen signifikant verringerte freie F- und E-Konzentrationen nachgewiesen. Die Gesamtkonzentrationen sind dabei jedoch nahezu unverändert. Was dazu führt, dass die PPBs erhöht sind. Die GCs sind während/nach einer Testosteron-applikation stärker an die Plasmaproteine gebunden (Abbildung D-2). Für den relativen Verlauf der Konzentrationen im Rahmen dieses Experimentes wurden keine signifikanten Veränderungen festgestellt.

A) Cortison



B) Cortisol

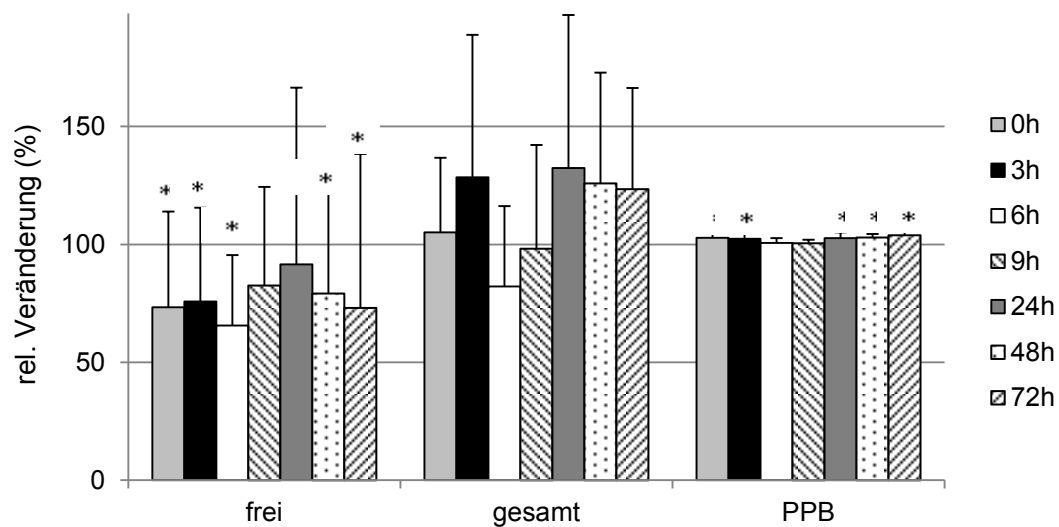


Abbildung D-2: Verlauf der relativen Veränderungen der Konzentrationen und PPB nach einer transdermalen Testosteronapplikation

Durch eine Testosteronapplikation wird in den endogenen Steroidhaushalt der Probanden eingegriffen, was Auswirkungen auf die Biosynthese der Steroidhormone hat. Cortisol und Testosteron sind im Biosyntheseweg über die gleiche Vorläufersubstanz, das  $17\alpha$ -OH-Progesteron, miteinander verbunden. Studien haben gezeigt, dass eine Hormontherapie mit Cortisol zu einer inversen negativen Korrelation mit Testosteron führt. (*Cumming, Quigley and Yen 1983, Bambino and Hsueh 1981*) Für eine Behandlung mit Testosteron wurde diese inverse Beziehung ebenfalls gezeigt. Eine intramuskuläre Applikation von Testosteronenantat (200 mg) führt zu einer signifikanten Absenkung des Cortisols nach CHR-Stimulierung. (*Rubinow et al. 2005*) Es wird davon ausgegangen, dass die beiden Aktivierungsachsen, die HPA-Achse und die Hypothalamus-Hypophysen-Keimdrüsen-Achse (HPG; Hypothalamic-Pituitary-Gonadal) miteinander interagieren. Die Aktivität der HPA-Achse scheint dabei von dem Vorhandensein von Sexualhormonen abhängig zu sein. Während Östrogene die HPA-Funktion verbessern, wirkt Testosteron hemmend. (*Viau 2002, Stephens et al. 2016, Handa et al. 1994*) Für den Menschen ist es bis jetzt nicht aufgeklärt, wie ausgeprägt diese Interaktion stattfindet. Die transdermale Testosteronapplikation scheint ebenfalls eine Verringerung der Cortisol- und Cortisonkonzentration zu bewirken, jedoch reduzieren sich nur die freien Anteile und die Gesamtkonzentrationen bleiben unverändert.

### D.2.3.3 Kombination der Einflussfaktoren

Bei einer Kombination der beiden Einflussfaktoren, sprich einer transdermalen Testosteronapplikation zum Zeitpunkt  $t = 0$  h und einer physischen Belastung zu  $t = 5$  h, führt auch zu einer Kombination der erhaltenen Effekte (Abbildung D-3). Zum einen ist der signifikante Anstieg der freien Cortisol- und Cortisonkonzentration zum Zeitpunkt  $t = 6$  h deutlich zu erkennen (W-Test: E(3 h-6 h):  $P=0,015$ ; E(6 h-9 h):  $P=0,028$ ; F(3 h-6 h):  $P=0,008$ ; F(6 h-9 h):  $P=0,011$ ). Die Werte für Cortisol vervierfachen sich von  $64,9 \pm 33,3$  % ( $t=0$  h) auf  $210 \pm 128,7$  % ( $t=6$  h). Bei Cortison kommt es zu einer Verdopplung von  $77,3 \pm 28,4$  % auf  $130 \pm 51$  %. Auch für die Plasmaproteinbindungen können zu diesen Zeitpunkten geringe, aber signifikante Unterschiede nachgewiesen werden (W-Test: E(3 h-6 h):  $P=0,02$ ; F(3 h-6 h):  $P=0,008$ ; F(6 h-9 h):  $P=0,015$ ). Hier kommt es zu Verringerungen der relativ gebundenen Anteile von Cortison ( $113 \pm 14$  % vs.  $100 \pm 6$  %) und Cortisol ( $104 \pm 3$  % vs.  $99 \pm 2$  %). Zum anderen sind signifikante Unterschiede der Absolutkonzentrationen zu den Basalwerten ersichtlich. Auffällig ist hierbei, dass sich speziell die PPBs und die Gesamtkonzentrationen an Cortison unterscheiden.

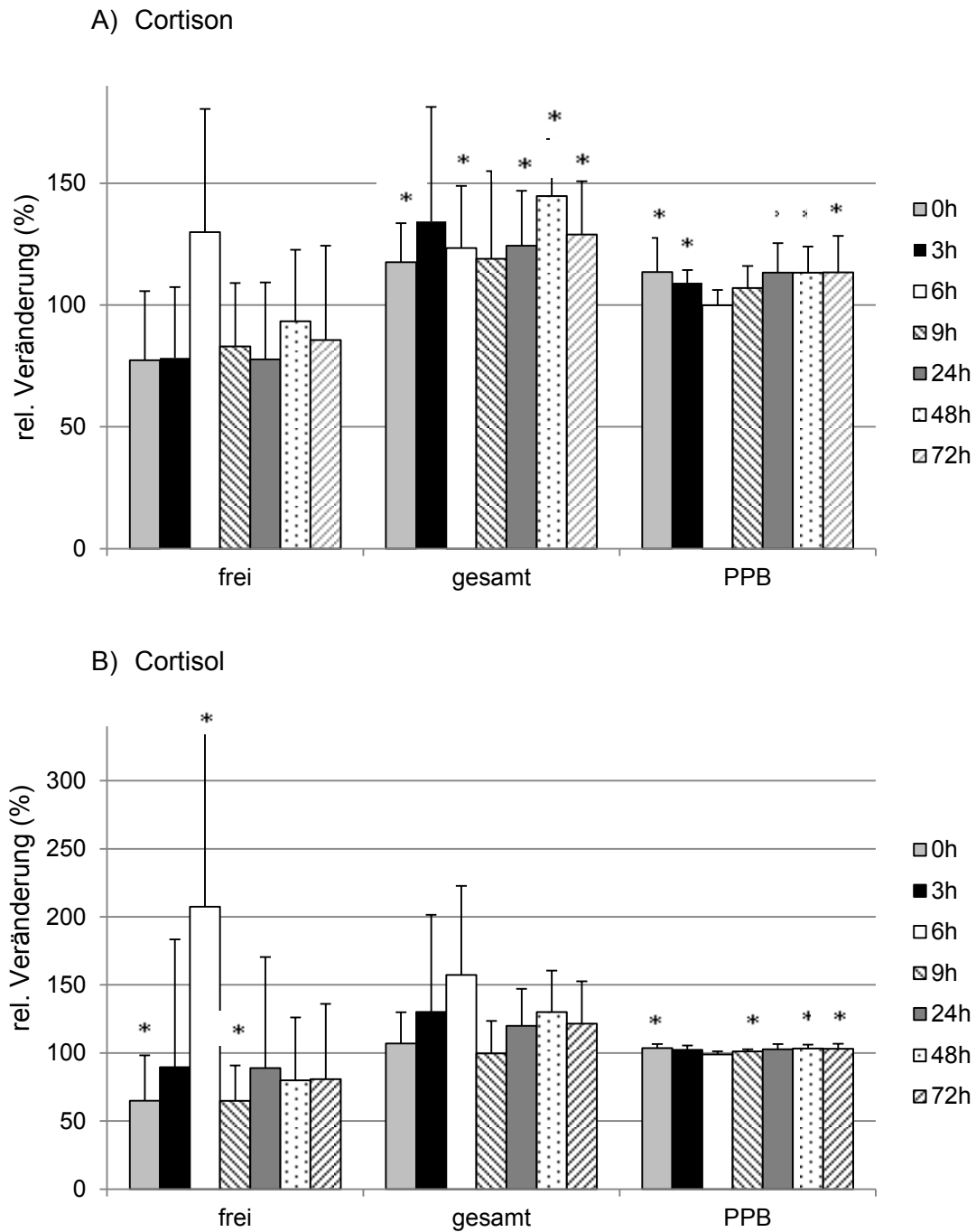


Abbildung D-3: Verlauf der relativen Veränderungen der Konzentrationen und PPB nach einer einstündigen physischen Belastung und einer transdermalen Testosteronapplikation

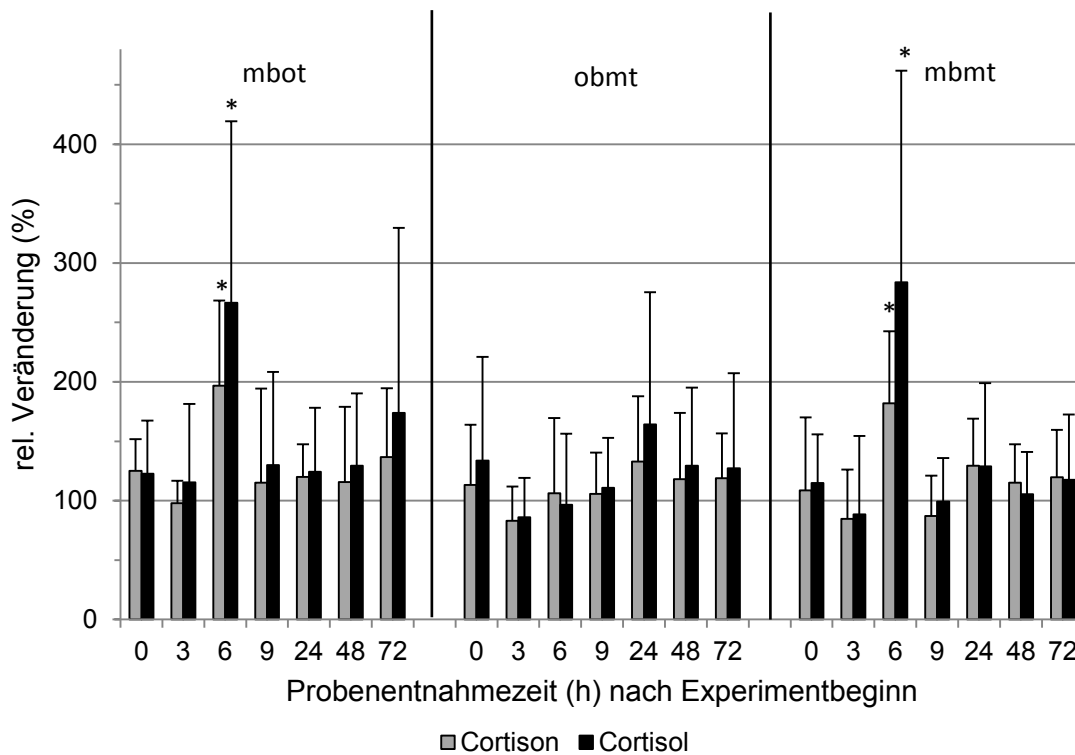


#### D.2.4 Korrelation der Serum- und Speichelkonzentrationen

Für die Beurteilung von diagnostischen Fragestellungen ist es wichtig, den Akutzustand von Hormonkonzentrationen bewerten zu können. Dies lässt sich, wie in den vorherigen Abschnitten gezeigt, durch die Untersuchung von Blutproben realisieren. Bei der Blutentnahme handelt es sich jedoch um einen invasiven Eingriff, welcher vom einem Arzt bzw. geschultem Personal durchgeführt werden muss. Dies bedeutet einen erhöhten personellen und zeitlichen Aufwand für alle Studienbeteiligte. Deshalb rückt die nicht invasive Methode der Speicheluntersuchung immer weiter in den Vordergrund. Speichel stellt das Filtrat des Blutes dar und für viele Substanzen spiegeln die Speichelkonzentrationen eine bessere Konzentrations-Wirkungs-Korrelation wider als Blutproben, da nur die nicht-proteingebundenen und damit physiologisch aktiven Anteile in den Speichel übergehen.

Um die Verwendung von Speichelproben für den Nachweis der biologisch aktiven Anteile der Glucocorticosteroide zu überprüfen, wurden ergänzend zu den Serumproben auch die korrespondierenden Speichelproben der Probanden genommen und analysiert. Abbildung D-4 gibt die Konzentrationsverläufe der Speichelkonzentrationen der GCs als relative Veränderungen zu den Basalwerten wieder. Äquivalent zu den Serumproben ist auch im Speichel nach einem 60-minütigen Ausdauertraining am Fahrradergometer ein signifikanter Anstieg der Cortison- und Cortisolkonzentrationen (Faktor 1,7 bzw. 2,5) nachzuweisen. Die Werte der 6 h-Proben unterscheiden sich signifikant von denen der davor bzw. danach gewonnenen Proben (W-Test: mbot: E (3 h-6 h):  $P=0,036$ , E (6 h-9 h):  $P=0,008$ ; F (3 h-6 h):  $P=0,038$ , F (6 h-9 h):  $P=0,028$ ; mbmt: E (3 h-6 h):  $P=0,042$ , E (6 h-9 h):  $P=0,0368$ ; F (3 h-6 h):  $P=0,028$ , F (6 h-9 h):  $P=0,036$ ).

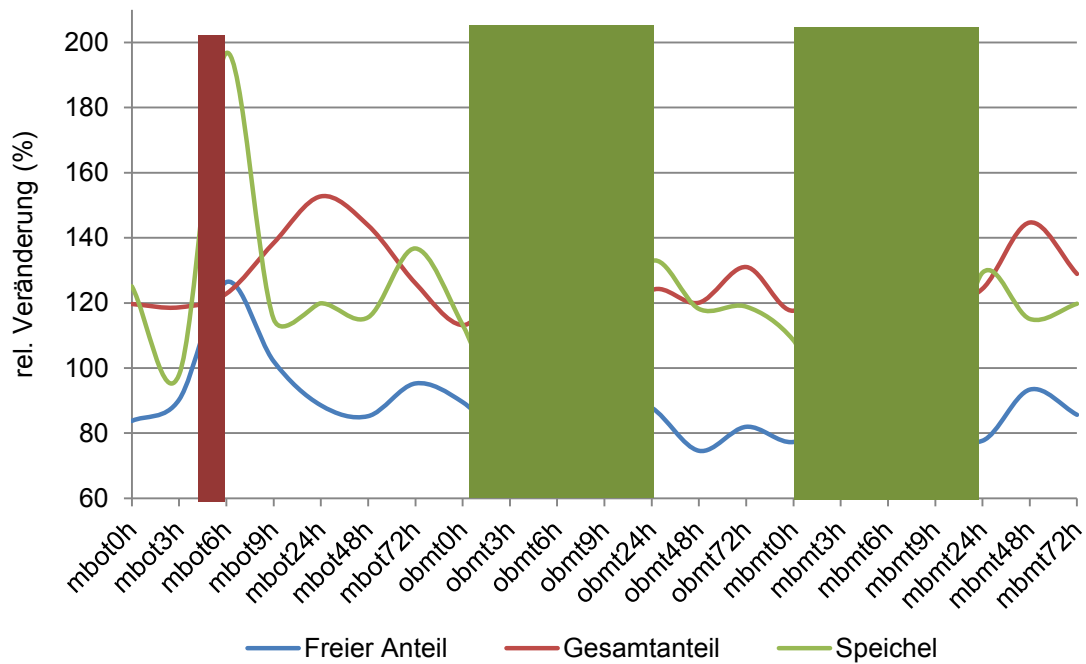
Für Cortisol bestätigen diese Ergebnisse bisherige Forschungen. (*del Corral et al. 1994, Di Luigi et al. 2006, O'Connor and Corrigan 1987, Passelergue, Robert and Lac 1995, Port 1991, Stupnicki and Obminski 1992*) Cortison wurde dabei erstmals berücksichtigt. Eine transdermale Testosteronapplikation induziert keine Veränderung der GC-Konzentrationen im Speichel. Auch die Absolutkonzentrationen der einzelnen Experimente unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Ausnahme  $t = 6$  h bei mbot und mbmt).



**Abbildung D-4: Verlauf der relativen Veränderungen der Speichelkonzentrationen der Corticosteroide während der Studienexperimente**

Eine grafische Darstellung der relativen Veränderungen der Corticosteroidkonzentrationen im Plasma und im Speichel über den Verlauf der drei Experimente hinweg zeigt Abbildung D-5. Besonders in den Nach-Belastungsproben sind die Korrelationen der GCs deutlich zu erkennen. Für F steigen die Konzentrationen in allen drei Matrices an (Speichel: 2,3; Plasma(frei): 2,4; Plasma(gesamt): 1,3). Dies verdeutlicht, dass Cortisol für die akute Stressreaktion gebildet wird und der Anstieg in allen drei Medien, wenn auch unterschiedlich stark ausgeprägt, nachweisbar ist. Für Cortison kann dies nicht beobachtet werden, hier erhöhen sich nur die Speichelkonzentrationen sowie die nicht-proteingebundenen Anteile (Faktor 2 bzw. 1,5). Die Gesamtkonzentration bleibt unverändert. Eine Erklärung dafür ist, dass der Organismus bestrebt ist, die PPB des Cortisols konstant zu halten. Mit der erhöhten Cortisolproduktion werden auch mehr Plasmaproteine für die Bindung benötigt. Da Cortison als inaktives GC weder im protein-gebundenen noch im freien Zustand eine biologische Aktivität ausweist, wird dieses aus seiner PPB verdrängt und die freiwerdenden Transportproteine stehen für das Cortisol zur Verfügung. Nach der Stressregulation kommt es zu einer Inaktivierung des Cortisols. Dies führt zu einem zeitversetzten Anstieg der Gesamtcortisonkonzentration.

A) Cortison



B) Cortisol

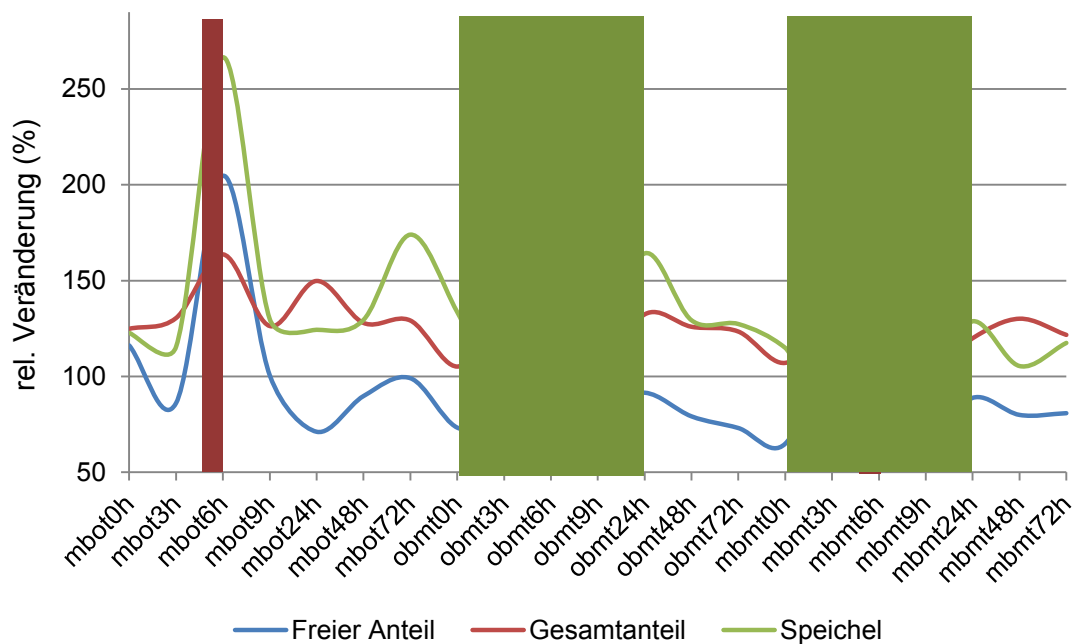


Abbildung D-5: Gegenüberstellung der relativen Veränderungen der GC-Konzentrationen der einzelnen Probenentnahmezeitpunkten. Die grün hinterlegten Bereiche signalisieren den Zeitraum der Testosteronapplikation (24 h ab t = 0 h) und die rot hinterlegten die Belastung via Fahrradergometer (1 h ab t = 5 h).

Ein Vergleich der Speichelkonzentrationen mit den Konzentrationen an freien und gesamten GCs zeigt, dass signifikante Korrelationen nach Spearman vorliegen, welche sich jedoch in ihrer Ausprägung zwischen schwach korreliert ( $\rho \leq 0,5$ ) bis stark korreliert ( $0,7 < \rho \leq 0,9$ ) unterscheiden (Tabelle D-4).

**Tabelle D-4: Spearman-Korrelation ( $\rho$ ) und dazugehörige Signifikanzlevels (P) der absoluten Hormonkonzentrationen zwischen Plasma (frei und gesamten) und Speichel**

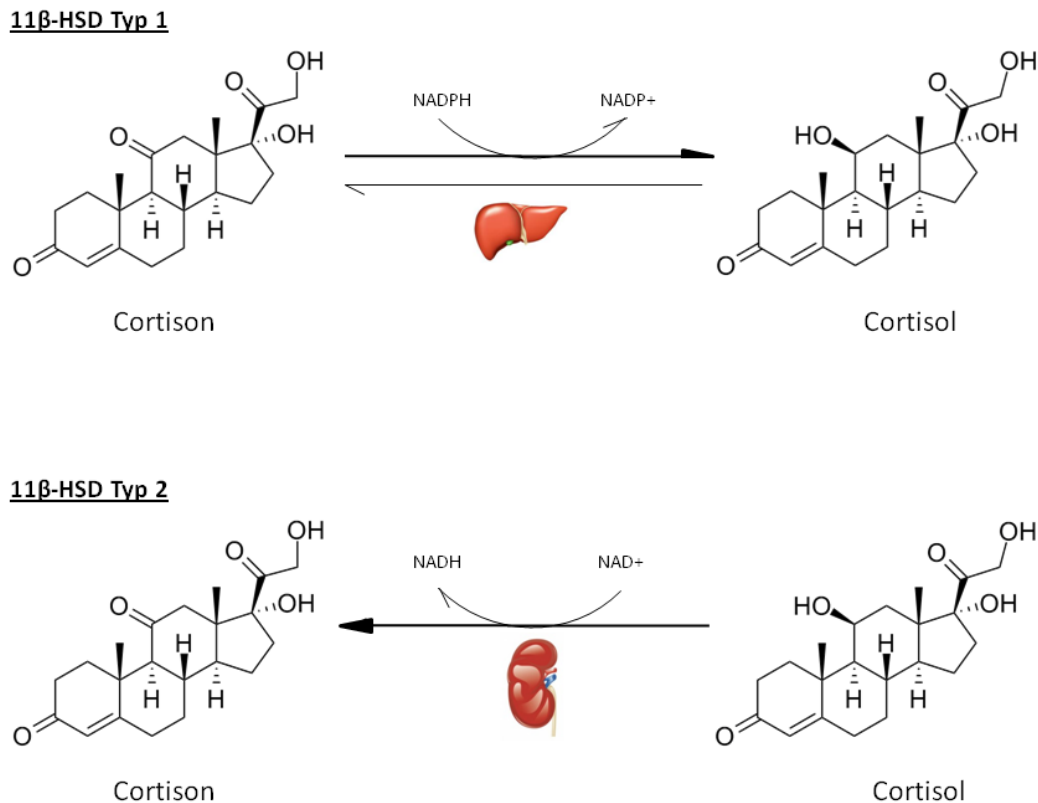
Spearman		E <sub>frei</sub>	E <sub>gesamt</sub>	E <sub>Speichel</sub>	F <sub>frei</sub>	F <sub>gesamt</sub>	F <sub>Speichel</sub>
E <sub>frei</sub>	rho	1	0,368	0,572	0,858	0,583	0,663
	P		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
E <sub>gesamt</sub>	rho	0,368	1	0,263	0,254	0,699	0,234
	P	0,000		0,000	0,000	0,000	0,001
E <sub>Speichel</sub>	rho	0,572	0,263	1	0,638	0,513	0,813
	P	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000
F <sub>frei</sub>	rho	0,858	0,254	0,638	1	0,691	0,812
	P	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000
F <sub>gesamt</sub>	rho	0,583	0,699	0,513	0,691	1	0,653
	P	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000
F <sub>Speichel</sub>	rho	0,663	0,234	0,813	0,812	0,653	1
	P	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	

Der Vergleich der Speichelkonzentrationen und der nicht-proteingebundenen Anteile zeigt, dass Cortison überproportional in den Speichel übergeht und dort in Konzentrationen von ca. 140 % der freien Anteile nachweisbar ist. Entgegengesetzt ist dies beim Cortisol. Hier liegt ein unterproportionaler Übergang vor, denn nur ca. 30 % der freien Plasmakonzentrationen sind auch im Speichel nachweisbar.

Unterschiedliche Mechanismen sind dabei für die erhöhten Speichelkonzentrationen von E verantwortlich. Zum einen spielt die Inaktivierung von F in den Speicheldrüsen durch die dort lokalisierte 11 $\beta$ -HSD des Typs 2 eine Rolle.

In der Peripherie werden die endogenen GCs Cortisol und Cortison durch die zwei Subtypen der 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (11 $\beta$ -HSD), welche der Enzymklasse der Oxidoreduktasen zugeordnet sind, ineinander umgewandelt (Abbildung D-6). Diese Enzymreaktionen dienen somit der Aktivitätsregulation des Cortisols. Die 11 $\beta$ -HSD Typ 1 arbeitet dabei bidirektional und katalysiert sowohl die Aktivierung von E als auch die

Inaktivierung von F. Lokalisiert sind die 11 $\beta$ -HSD Typ 1 hauptsächlich in Leber, Lunge, Fettgewebe und Gehirn. Die 11 $\beta$ -HSD Typ 2 katalysiert nur die Inaktivierung des Cortisol und ist in den Nieren, der Plazenta, ekkrinen Schweißdrüsen und den Speicheldrüsen lokalisiert. (Tannin et al. 1991, Ferrari 2010, Quinkler and Stewart 2003, Edwards et al. 1988, Smith et al. 1996)



**Abbildung D-6: Schematische Darstellung der Enzymreaktionen der 11 $\beta$ -HSD**

Durch die 11 $\beta$ -HSD des Typs 2 wird bei der Sekretion aus den Speicheldrüsen F zu E inaktiviert, was zu einer Verringerung der Cortisol- und zu einem Anstieg der Cortisonkonzentration im Speichel führt. Dies kann damit bestätigt werden, dass sich die Korrelationen zwischen freiem und gesamtem Cortisol ( $\rho = 0,691$ ) und zwischen gesamtem Cortisol und Speichelcortisol ( $\rho = 0,652$ ) unterscheiden. Außerdem korrelieren die freien Cortisonanteile schwächer mit dem Speichelcortisol ( $\rho = 0,572$ ) als das für Cortisol der Fall ist ( $\rho = 0,812$ ). Dies zeigt, dass die Speichelkonzentration von E eine Summe aus der freien Cortisonkonzentration und dem oxidierten Anteil des freien Cortisols im Plasma darstellt. Nichtsdestotrotz korrelieren beide GCs im Speichel stark miteinander

( $\rho = 0,813$ ) und zeigen eine lineare Abhängigkeit ( $R^2 = 0,736$ ). Somit kann gesagt werden, dass für diagnostische Zwecke auch Cortison als Marker verwendet werden kann, da dieses in höheren Konzentrationen vorliegt und somit besser nachweisbar ist. Perogamvros et al. zeigten in ihrer Studie ebenfalls, dass Speichelcortisol als Marker für das nicht-proteingebundene Cortisol im Plasma verwendet werden kann. (Perogamvros et al. 2010) Neben einer starken Korrelation zwischen freiem Cortisol und Speichelcortisol zeigten sie, dass sich nach einer akuten adrenalen Stimulierung mit ACTH auch das Speichelcortisol äquivalent zu den freien Anteilen des Cortisols verhält.

Zum anderen ist die Diffusion von Stoffen aus dem Blut in den Speichel abhängig von der Lipophilie der Stoffe. Bedingt durch die unterschiedlichen Substituenten an der C-11-Position unterscheiden sich die beiden GCs hinsichtlich ihrer Lipophilie. Cortison mit einer C-11-Keto-Gruppe ist lipophiler als Cortisol. Dies verdeutlicht sich auch an Hand des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten. Dieser liegt für Cortison bei  $K_{OW} = 1,81$  und für Cortisol bei  $K_{OW} = 1,62$ . (Hansch, Leo and Hoekman 1995) Somit kann Cortison besser in den Speichel diffundieren als Cortisol.

### **D.3 Corticosteroide im Speichel**

Sowohl endogene als auch synthetische Corticosteroide sind im Speichel nachweisbar und werden u.a. für diagnostische Zwecke verwendet. Wie die Ergebnisse des vorherigen Projektes verdeutlichen, korrelieren die Speichelkonzentrationen der GCs mit den nicht-proteingebundenen Anteilen im Blutplasma und können somit für die Bewertung von Stresszuständen und Erkrankungen genutzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass eine physische Beanspruchung zu einem Anstieg der Cortisolkonzentrationen führt, da eine akute Stressreaktion aktiviert wird. Eine Testosteronapplikation führt dagegen zu einer Verringerung der freien GC-Konzentrationen. In den folgenden Abschnitten werden Fragestellungen bzgl. der Konzentrationsverhältnisse der endogenen Corticosteroide sowie der Möglichkeit zur Differenzierung zwischen endogener Produktion und oraler Zufuhr näher diskutiert.

#### **D.3.1 Endogene Konzentrationen der Corticosteroide**

Für die Bestimmung der Referenzkonzentrationen der GCs wurden 118 Speichelproben von Kontrollprobanden analysiert. Die Konzentrationen liegen nicht normalverteilt vor ( $P < 0,001$ ) und es existieren keine signifikanten Unterschiede (MW-U-Test:  $P(F) = 0,803$ ,  $P(E) = 0,402$ )

zwischen den Geschlechtern (Tabelle D-5). Deshalb werden diese im Folgenden auch nicht mehr unterteilt sondern als Gesamtheit weitergeführt.

**Tabelle D-5: GC-Konzentrationen im Speichel: Für beide GCs wurde der zirkadiane Rhythmus mit hohen Konzentrationen am Morgen und geringen Konzentrationen am Abend nachgewiesen. Die Konzentrationen zeigen dabei keine Geschlechtsabhängigkeit.**

	männliche Probanden	weibliche Probanden	Gesamtheit
Anzahl	34 (58 %)	25 (42 %)	59
<i>Speichelcortison (ng/ml)</i>			
Morgens			
Median (Min-Max)	9,4 (3,4 - 17,2)	10,1 (1,5 - 15,6)	9,6 (1,5 - 17,2)
Mittelwert ± SD	9,8 ± 3,2	9,7 ± 3,7	9,8 ± 3,4
Abends			
Median (Min-Max)	1,5 (0,5 - 5,4)	1,8 (0,6 - 6,8)	2,1 (0,5 - 6,8)
Mittelwert ± SD	1,6 ± 0,9	2,1 ± 1,3	1,8 ± 1,1
<i>Speichelcortisol (ng/ml)</i>			
Morgens			
Median (Min-Max)	2,3 (0,1 - 9,1)	1,9 (0,2 - 4,8)	1,6 (0,1 - 9,1)
Mittelwert ± SD	2,6 ± 1,8	2,2 ± 1,3	2,4 ± 1,6
Abends			
Median (Min-Max)	0,2 (0,1 - 2,8)	0,2 (0,1 - 1,3)	0,2 (0,1 - 2,8)
Mittelwert ± SD	0,3 ± 0,5	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,4

Der für die Corticosteroide typische Tagesrhythmus mit hohen Konzentrationen am Morgen und niedrigen am Abend kann für beide GCs gezeigt werden, dabei unterscheiden sich die Werte signifikant voneinander (MW-U-Test:  $P(F/E) < 0,001$ ). Interindividuell schwanken diese Unterschiede mit einem Faktor  $6,6 \pm 3,2$  für E (Median: 6,1; Spannweite: 1,4 - 8,2) und  $14,4 \pm 10,9$  für F (Median: 11,8; Spannweite: 1,2 - 57,1). Auch intraindividuell unterscheiden sich diese beiden Faktoren, jedoch ist bei allen Probanden die verhältnismäßige Konzentrationsabnahme für Cortisol größer als die Reduzierung des Cortisons, was eine Abnahme des Cortisol-Cortison-Verhältnisses bewirkt. Die Verhältnisse (F zu E) sinken von 0,23 (0,08 - 0,71) am Morgen auf 0,12 (0,04 - 0,51) am Abend ab.

Die Normalwerte von Cortisol und Cortison korrelieren mit einem Spearmanfaktor  $\rho = 0,942$  ( $P < 0,001$ ) stark miteinander. Die Charakterisierung dieser Korrelation kann mit den Gleichungen der Formel D-4 erfolgen. Unter Berücksichtigung eines 95 %igen

Vertrauensintervalls können die Grenzen für noch als normal anzusehende Konzentrationswerte beschrieben werden.

**Formel D-4: Korrelation der Speichelkonzentrationen von Cortisol und Cortison.**

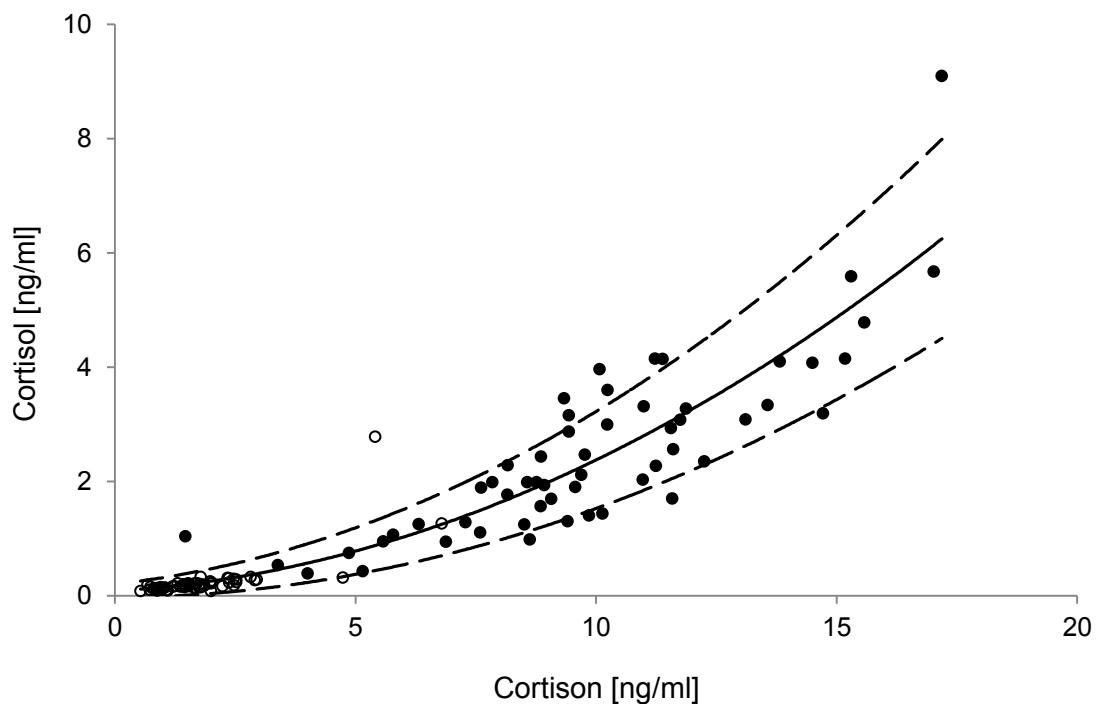
**Gleichung (1) = Medianwert; Gleichung (2) = Untergrenze; Gleichung (3) = Obergrenze**

$$[F] = 0,018 \frac{ml}{ng} [E]^2 + 0,049[E] + 0,086 \frac{ng}{ml} \quad (1)$$

$$[F] = 0,021 \frac{ml}{ng} [E]^2 + 0,092[E] + 0,204 \frac{ng}{ml} \quad (2)$$

$$[F] = 0,015 \frac{ml}{ng} [E]^2 + 0,006[E] - 0,032 \frac{ng}{ml} \quad (3)$$

Die einzelnen Konzentrationspaare der Probanden sowie der ermittelte Bereich für die Normalkonzentrationen sind in Abbildung D-7 dargestellt. Die Linien geben den statistisch zu erwartenden Bereich wieder, welcher eine Normalkonzentration darstellt. Dabei steht die durchgezogene Linie für den Medianwert und die gestrichelten für die Grenzwerte.



**Abbildung D-7: Endogene GC-Konzentrationen: Die Konzentrationen am Morgen (schwarze Punkte) sind signifikant höher als die Abendkonzentrationen (weiße Punkte).**



Die endogenen GCs liegen im Speichel in einem Verhältnis von ca. 1:5 (F zu E) vor und spiegeln somit nicht das Verhältnis der Gesamtblutkonzentrationen (3:1) wider. Durch die unterschiedlich stark ausgeprägten PPB gleicht sich das Konzentrationsverhältnis in den freien Anteilen auf ca. 1:1 an. Somit stehen vergleichbare Konzentrationen an F und E für die Diffusion in den Speichel zur Verfügung. Dennoch kommt es zu einer weiteren Konzentrationsverschiebung zu Gunsten des Cortisons, welcher durch die unterschiedlichen Diffusionseigenschaften und die Inaktivierung des Cortisol in den Speicheldrüsen bewirkt wird (siehe D.2.4).

Die Festlegung des Normalbereiches basiert auf die Morgen- und Abendwerte der Kontrollprobanden, welche ohne Berücksichtigung der Tageszeit in die Beschreibung des Referenzbereiches eingingen. Für die Interpretation von realen Speichelproben ist es jedoch essentiell die Entnahmezeit zu kennen und zu berücksichtigen. Denn hohe Cortisol- und Cortisonkonzentrationen am Abend sind in jeder Hinsicht auffällig und bedürfen weiteren Untersuchungen, auch wenn sie im Normalbereich liegen.

### **D.3.2 Corticosteroide im Speichel während einer Hormonersatztherapie**

Speziell für den Nachweis von endogenen Substanzen ist es wichtig, eine Methode zu entwickeln, mit der es möglich ist, die endogene Produktion von einer exogenen Bezugsquelle abzugrenzen. Dies bedeutet, dass überprüft werden muss, ob sich die Analytkonzentrationen, deren Verhältnis zueinander oder die zirkadianen Variationen im Speichel durch eine exogene Aufnahme verändern und somit eine Differenzierung möglich ist. Für die Bestimmung der Corticosteroide im Speichel während einer Langzeittherapie standen 408 Proben von 82 AGS-Patienten zur Verfügung. Von diesen konnten jedoch 29 Proben nicht untersucht werden, da ein zu geringes Probenvolumen (<50 µl) vorhanden war. Bei den anderen Proben konnten die Hormonsubstituenten Cortisol (*Hydrocortison*), Prednison und Prednisolon (*Decortin H*), Dexamethason und Fludrocortison (*Astonin H*) nachgewiesen werden.

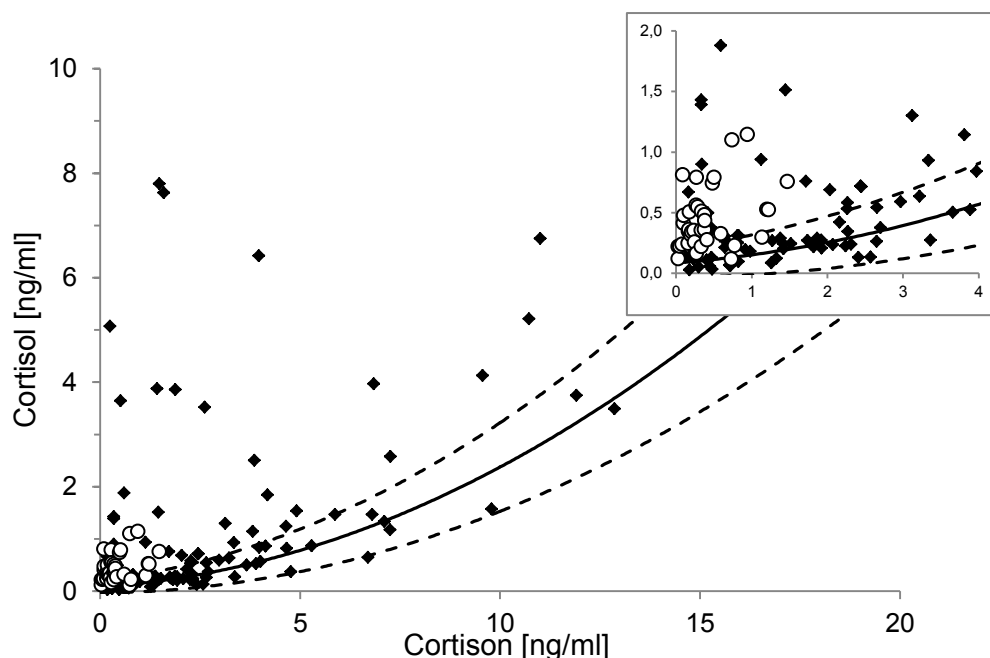
#### *D.3.2.1 Endogene Glucocorticosteroide*

Cortisol und/oder Cortison konnte in 136 Speichelproben von 31 AGS-Patienten, welche *Hydrocortison* als Medikament erhalten haben, nachgewiesen werden. Die Speichelkonzentrationen sowie das Verhältnis Cortisol zu Cortison sind in Tabelle D-6 zusammengefasst.

**Tabelle D-6: Speichelkonzentrationen der endogenen Corticosteroide sowie deren Verhältnis zueinander, wenn Hydrocortison als Medikament eingenommen wird.**

	<b>Cortison [ng/ml]</b>	<b>Cortisol [ng/ml]</b>	<b>F/E</b>
Anzahl	n=134	n=111	n=109
Median (Min-Max)	1,5 (0,1 - 26,2)	0,6 (0,1 - 662,3)	0,3 (0,1 - 105,5)
Mittelwert ± SD	3,0 ± 4,1	14,2 ± 75,7	2,2 ± 10,5

In zwei Proben waren sehr hohe Cortisolkonzentrationen (435,9 ng/ml und 662,3 ng/ml) aber kein korrespondierendes Cortison nachweisbar, was mutmaßlich durch noch vorhandene Medikamentenreste im Mundraum während der Probenentnahme verursacht wurden ist. Da auch bei geringeren Konzentrationen nicht ausgeschlossen werden kann, dass Rückstände der Medikation im Speichel mit bestimmt werden, kann die Bestimmung des Speichelcortisol nach oraler Aufnahme von *Hydrocortison* fehlerbelastet sein. Die Verwendung des Quotienten F/E bzw. von Speichelcortisol scheint zuverlässiger, da Cortison als Biotransformationsprodukt aus der Peripherie stammt. Weiterhin wurde in 25 Proben von 15 Patienten nur Cortison (Konzentration zwischen LOD und LOQ) aber kein Cortisol nachgewiesen.



**Abbildung D-8: Nachgewiesene Speichelkonzentrationen der GCs bei AGS-Patienten (schwarze Punkte: mit HC; weiße Punkte: mit PLN/PN) im Vergleich zu den Referenzkonzentrationsbereich der Kontrollprobanden (Linien).**

Im Vergleich mit der im Absatz D.3.1 formulierten Gleichung zum endogenen Referenzbereich der Konzentrationsverhältnisse, liegen nur 45 % der Patientendaten innerhalb dieses Bereiches (Abbildung D-8). Die anderen 55 % fallen mit zu hohen Cortisolkonzentrationen aus der Funktion heraus und sind somit im Rahmen von diagnostischen Untersuchungen auffällig. Obwohl bei den Probanden die Hormonersatztherapie der endogenen Produktion in der Quantität und im zirkadianen Rhythmus nachempfunden ist, sind diese Unterschiede nachweisbar. Dies spricht dafür, dass es zu einer Veränderung der Biotransformation kommt. Gröschl et al. (2002) zeigten, dass eine orale Verabreichung von Cortisol (10 mg) bei Patienten mit gestörter GC-Biosynthese zu einem starken Anstieg der Speichelcortisolkonzentration (bis ca. 90 ng/ml) führt, welcher innerhalb von vier Stunden auf ein Normalniveau absinkt. Für gesunde Probanden wurden Halbwertszeiten von 94,5 min bestimmt. (Gröschl et al. 2002) Dies lässt sich dadurch erklären, dass es nach der Applikation zu einem Überschuss an F in der Peripherie kommt, welcher nicht durch das CBG abgefangen werden kann. Dadurch sind die Konzentrationen der nicht-proteingebundenen Anteile im Blut erhöht und somit eine verstärkte Diffusion in den Speichel möglich.

Da *Hydrocortison* während einer Hormonersatztherapie zwei- bis dreimal täglich eingenommen wird, variiert auch die Metabolisierungsrate. Die pulsatile Einnahme führt zu einem Überschuss an Cortisol direkt nach der Verabreichung, was zu einer Aktivierung der 11 $\beta$ -HSD des Typs 2 führt, welches F inaktiviert. Bis zur nächsten Medikation kommt es zu einer Gleichgewichtseinstellung zwischen E und F, welche anschließend durch den erneuten Überschuss an F wieder gestört wird. Somit ist nach einer externen Zufuhr von F sowohl das Gleichgewicht zwischen proteingebundenem und freiem Cortisol als auch der Verhältnis zwischen Cortisol und Cortison im Körper gestört. Was zu veränderten Verhältnissen im Speichel führt. Für diagnostische Fragestellungen, z.B. für die Aufklärung eines Gebrauchs oder Missbrauchs von *Hydrocortison*, ist es somit hilfreich nicht nur die Cortisolkonzentration zu betrachten, sondern auch das Verhältnis zu seinem Metaboliten Cortison. Dies sollte besonders dann aufschlussreich sein, wenn *Hydrocortison* nicht nach dem endogenen zirkadianen Rhythmus eingenommen wird.

Cortisol und Cortison sind auch in 112 bzw. 37 Proben neben den synthetischen GCs PN und PLN nachweisbar. Dabei liegen die Konzentrationen für F zwischen 0,1 ng/ml und 1,6 ng/ml und für E zwischen 0,1 ng/ml und 1,5 ng/ml und fallen ebenfalls aus den Referenzbereich heraus (Abbildung D-8). Die Glucocorticosteroide PLN und PN unterscheiden sich von F und E lediglich in der C1-C2-Doppelbindung im A-Ring des Steroidgrundgerüsts. Durch verschiedene Enzyme können die vier GCs ineinander umgewandelt werden. (Abbildung D-9)

Die beiden Typen der  $11\beta$ -HSD sind dabei für Aktivierung bzw. Inaktivierung der Corticosteroide zuständig und stellen die endogenen Hauptreaktionen dar. Wie bei den endogenen GCs gibt es auch bei den synthetischen GCs eine biologisch aktive (PLN) und eine inaktive (PN) Form.

Für die Umwandlung der endogenen in die synthetischen Formen ist die  $[\Delta^1]$ -Steroid-Dehydrogenase zuständig. Bei vielen Mikroorganismen konnte eine  $\Delta^1$ -SDH-Aktivität nachgewiesen werden. (*Charney W and Herzog 1967, Bredehoff et al. 2012*) Bisher wurde gezeigt, dass die  $\Delta^1$ -SDH für die enzymatische Umwandlung von Testosteron zu Boldenon verantwortlich ist (*Sgoifo Rossi et al. 2004, Pompa et al. 2006*) und auch die GCs als Substrate in Frage kommen (*Bredehoff et al. 2012, Hayano et al. 1961*). Bredehoff et al. konnten jedoch in über 700 untersuchten Urinen von Sportlern und Krankenhauspatienten keine Bakterien mit  $\Delta^1$ -SDH-Aktivität nachweisen. (*Bredehoff et al. 2012*) Nichtsdestotrotz ist diese Umwandlung möglich und muss bei Interpretationen berücksichtigt werden.

Die entgegengesetzte Richtung, d.h. die Reduktion der C1-C2-Doppelbindung, wird durch eine Steroidhydrogenase katalysiert. Für Ratten wurde gezeigt, dass Cortisol als Metabolit aus einer Prednisolonapplikation resultiert. (*Vermeulen and Caspi 1958*) Für humane Urinproben konnte dies nicht nachgewiesen werden. (*Vermeulen 1957, Vermeulen 1956, Gray et al. 1956*) Bei AGS-Patienten ist die Synthese der endogenen GCs vollständig gestört. Dennoch sind im Speichel E und F nach einer PLN/PN-Medikation nachweisbar. Dies kann durch zwei mögliche Theorien erklärt werden. Zum einen ist eine Biotransformation der Medikation mit einer  $\Delta^1$ -Steroid-Hydrogenase-Aktivität nicht ausschließbar und bedarf weiterer systematischer Untersuchungen. Zum anderen sind Verunreinigungen der Medikamente (PLN/PN) mit den endogenen Analoga F/E denkbar. Werden die Medikamente nach den Richtlinien der „Guten Herstellungspraxis“ (Good Manufacturing Practice) hergestellt, sind Verschleppungen von 10 ppm oder 0,1 % der therapeutischen Dosis tolerierbar. (*PIC 2007, Helmlin et al. 2016*)

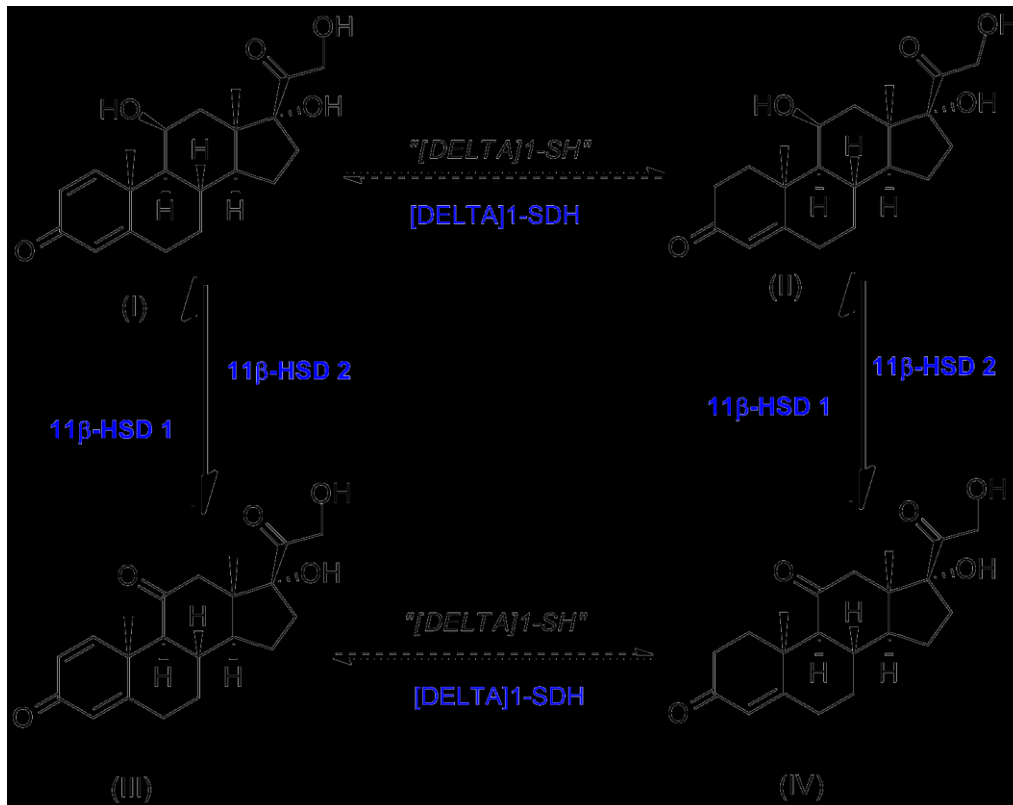


Abbildung D-9: enzymatische Umwandlung der GCS PLN (I), F (II), PN (III), E (IV) durch die zwei Typen der 11β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD), die Δ1 Steroid-Dehydrogenase (SDH) und die „Δ1 Steroid-Hydrogenase“ (SH)

### D.3.2.2 Synthetische Corticosteroide

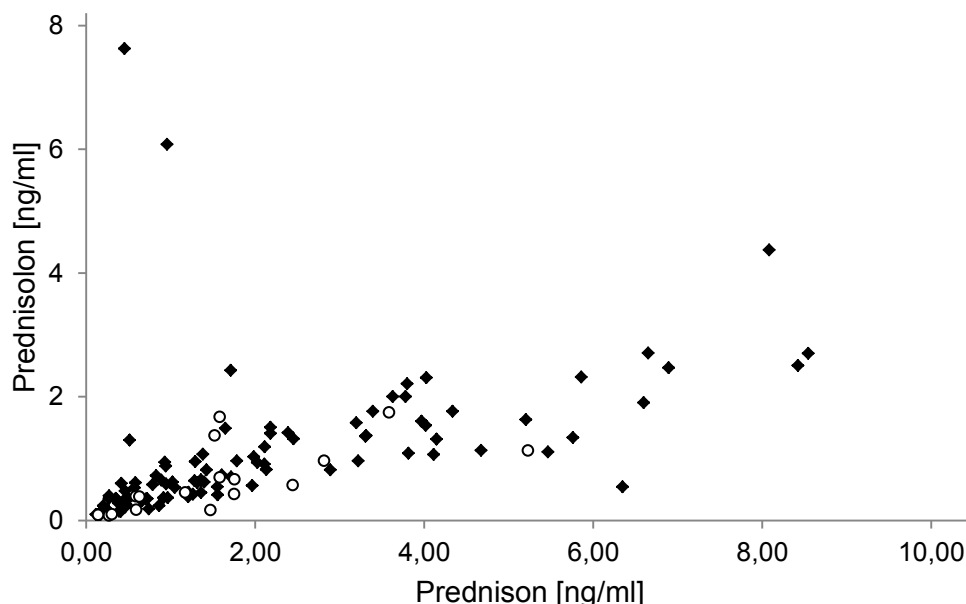
Erfolgt die Hormonersatztherapie der AGS-Patienten nicht mit *Hydrocortison* sondern mit synthetischen GCs, so kommen als Wirkstoffe Prednison, Prednisolon und Dexamethason zum Einsatz, welche ebenfalls in den Speichelproben nachweisbar sind. In den Speichelproben von 39 Patienten konnte PN und/oder PLN detektiert werden. Weiterhin wurde für 20 Patienten DEXA nachgewiesen und 18 Patienten zusätzlich positiv auf FLU als Mineralocorticosteroid getestet. Die Konzentrationen sind in Tabelle D-7 zusammengefasst. Der Nachweis von synthetischen Corticosteroiden im Speichel bestätigt deren Anwendung im Rahmen der Hormonersatztherapie. Bedingt durch ihr höheres Wirkungspotential im Vergleich zu F werden die synthetischen Corticosteroide in geringeren Konzentrationen und nur ein- bis zweimal täglich eingenommen. (Speiser et al. 2010) Die richtig-positiv oder richtig-negativ Bestimmungen für die synthetischen GCs lagen bei 95 %. Lediglich für Fludrocortison muss eine hohe Falsch-Negativ-Rate (ca. 45%) beachtet werden. Dies lässt sich darin begründen, dass die Medikation mit FLU in einer Einzeldosis mit 0,05 mg bis 0,1 mg am Abend erfolgt. (Speiser et al. 2010) Da die nächste Probenentnahme erst am

darauffolgenden Morgen stattfand, ist davon auszugehen, dass das FLU schon metabolisiert und somit nicht mehr im Speichel nachweisbar ist.

**Tabelle D-7: Übersicht der nachgewiesenen Speichelkonzentrationen der synthetischen Corticosteroide.  $n_{\text{Pat}}$ =Anzahl Patienten;  $n_{\text{P}}$ =Anzahl Proben;  $n_{\text{pP}}$ =Anzahl positiver Proben**

Substanz	$n_{\text{Pat}}$	$n_{\text{P}}$	$n_{\text{pP}}$	Median (Min-Max)	Mittelwert $\pm$ SD
PN [ng/ml]	39	190	159	1,2 (0,1-710,2)	7,6 $\pm$ 56,9
PLN [ng/ml]	39	190	143	0,7 (0,1-20,6)	1,3 $\pm$ 2,4
DEXA [ng/ml]	20	98	70	0,2 (0,1-68,2)	3,1 $\pm$ 11,8
FLU [ng/ml]	18	90	25	0,4 (0,1-18,4)	2,4 $\pm$ 4,8

Prednison und Prednisolon sind neben F die an häufigstem eingesetzten Wirkstoffe. Von den teilnehmenden AGS-Patienten wird PLN von 33 und PN von 6 Probanden eingenommen. Da beide Stoffe durch die Enzymaktivität der 11 $\beta$ -HSD ineinander metabolisiert werden, sind sie im Speichel nebeneinander nachweisbar. Die Konzentrationen sind dabei unabhängig von der Medikation und unterscheiden sich nicht signifikant (MW-Test: P(PN) = 0,422; P(PLN) = 0,324). PLN und PN korrelieren stark miteinander (Spearman rho = 0,812). (Abbildung D-10)



**Abbildung D-10: Korrelation der Speichelkonzentrationen von PLN und PN nach einer Medikation mit PLN (schwarze Punkte) und PN (weiße Punkte).**

Die Metabolisierung des PLNs, dem biologisch aktiven Wirkstoff, zum inaktiven Metaboliten PN erfolgt hauptsächlich in der Leber und wird von der 11 $\beta$ -HSD katalysiert. Dieser Vorgang ist reversibel und abhängig von der Zeit und der Dosierung der Medikation. Für die Interpretation der Speichelkonzentrationen muss die Enzymaktivität der 11 $\beta$ -HSD Typ 2 in den Speicheldrüsen und die PPB berücksichtigt werden. (vgl. *(Teeninga et al. 2013)*) Die Diffusionsintensität von PLN und PN in den Speichel wird außerdem von der nicht linearen Beziehung der gesamten und der freien Plasma-konzentrationen beeinflusst. (*Czock et al. 2005, Rose, Yurchak and Jusko 1981, Teeninga et al. 2013*)

### **D.4 Haaranalysen - ein retrospektiver Nachweis von Glucocorticosteroiden**

Haaranalysen werden seit Jahrzehnten durchgeführt um einen Gebrauch oder Missbrauch von Fremdstoffe, wie Drogen, Medikamente, Dopingsubstanzen, über einen längeren Zeitraum nachzuweisen. Weiterhin werden sie genutzt um die Produktion von endogenen Substanzen zu überwachen und diese für diagnostische Aussagen zu verwenden. Die endogenen Corticosteroide, speziell das biologisch aktive Cortisol, sind für die Regulierung von Stressreaktionen zuständig. Bei chronischen Stressbelastungen kommt es zu einer Hyperaktivität der HPA-Achse, was zu einer dauerhaft erhöhten Sekretion der GCs führt. Diese erhöhten Konzentrationen werden in das Haarmaterial während dessen Bildung inkorporiert und sind somit über einen längeren Zeitraum retrospektiv nachweisbar. Da die Haarkonzentrationen von vielen individuellen Einflüssen abhängig sind, ist es wichtig diese zu untersuchen und evtl. Bewertungskriterien für eine aussagekräftige Interpretation von Befunden festzulegen. In den nachfolgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der Haarstudien vorgestellt und zusammenfassend diskutiert.

#### **D.4.1 Endogene Referenzbereiche für die GCs**

Für die Bestimmung endogener Referenzwerte standen Haarproben von 94 Probanden zur Verfügung. Cortison konnte in allen proximalen Haarsegmenten nachgewiesen werden. Für Cortisol war der Nachweis nur bei 71 % der männlichen Probanden und 82 % der weiblichen Probanden erfolgreich (Tabelle D-8).

**Tabelle D-8 GC-Konzentrationen der proximalen Haarsegmente**

	<b>Männliche Probanden (n=49)</b>	<b>Weibliche Probanden (n=45)</b>
<i>Cortisol</i>	n=35	n=37
Median (Min-Max)	5,5 pg/mg (1,6 - 31,7 pg/mg)	4,3 pg/mg (1,6 - 30,4 pg/mg)
Mittelwert ± SD	7,5 ± 5,8 pg/mg	6,9 ± 6,4 pg/mg
<i>Cortison</i>	n=49	n=45
Median (Min-Max)	21,8 pg/mg (7,3 - 97,3 pg/mg)	15,4 pg/mg (3,8 - 101,4 pg/mg)
Mittelwert ± SD	27,2 ± 18,7 pg/mg	22,6 ± 21,8 pg/mg

Die Konzentrationen zwischen den Geschlechtern unterscheiden sich nicht signifikant (MW-U-Test: P(E):0,078; P(F):0,234). Die E- und F-Konzentrationen korrelieren mit einem Spearman-Faktor  $\rho = 0,890$  miteinander. Die Charakterisierung dieser Korrelation kann mit den Gleichungen der Formel D-5 erfolgen. Unter Berücksichtigung eines 95%igen Vertrauensintervalls können die Grenzen der Konzentrationswerte beschrieben werden.

**Formel D-5: Korrelation der Haarkonzentrationen von Cortisol und Cortison.**

(1) = Median; (2) = Untergrenze; (3) = Obergrenze

$$[F] = 0,252[E] - 0,003 \frac{pg}{mg} \quad (1)$$

$$[F] = 0,223[E] - 1,052 \frac{pg}{mg} \quad (2)$$

$$[F] = 0,281[E] + 1,045 \frac{pg}{mg} \quad (3)$$

Die Glucocorticosteroide liegen in den Haarproben in einem Verhältnis von 1:3 Cortisol zu Cortison vor und spiegeln somit weder die wider.

Für die Nachweisbarkeit von Substanzen im Haar spielen sowohl die Inkorporation als auch die Auswaschung eine entscheidende Rolle. Wie im Abschnitt B.2.3.1 dargelegt, sind verschiedene Faktoren für die Inkorporation von Substanzen in das Haar verantwortlich. Die Inkorporationsrate eines Stoffes ist dabei abhängig von seinen physikalischen und chemischen Eigenschaften und seiner Bioverfügbarkeit, welche von den Konzentrationen und möglichen Plasmaproteinbindungen bestimmt wird. Die hier dargestellte Bestimmung der endogenen Referenzbereiche sowie Literaturdaten (vgl. (Krumbholz et al. 2013, Chen et al. 2013, Gao et al. 2013, Grass et al. 2015, Kuehl et al. 2015, Quinete et al. 2015, Raul et al. 2004, Stalder and Kirschbaum 2012, Staufenbiel et al. 2015b, Zhang et al. 2013) haben

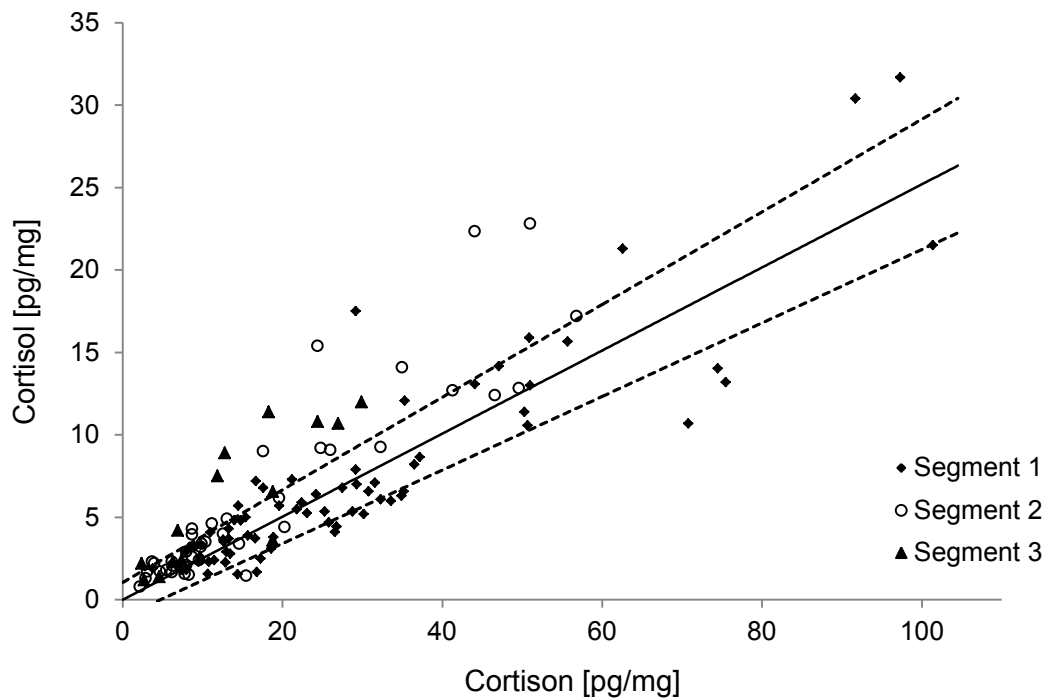


gezeigt, dass Cortison im Haar 3-7 mal höher konzentriert ist als Cortisol und somit die Blutverhältnisse (Gesamtkonzentration: 3:1; freie Anteile: 1:1) nicht wiedergegeben werden.

Diese Verschiebung wird durch die geringfügig differenzierten Substanzeigenschaften begünstigt. Die Substituenten in der C11-Position führen zu unterschiedlichen Polaritäten der beiden GCs. Cortison ist durch die Ketogruppe unpolarer als Cortisol und da lipophile Stoffe besser von den Haarfollikeln aufgenommen und in das Haar eingelagert werden, weist Cortison eine leicht erhöhte Inkorporationsrate auf.

Bislang wurden in Haarfollikeln keine 11 $\beta$ -HSD Typ 2 lokalisiert (*Smith et al. 1996*). Die Inaktivierung von F zu E während der Haarbildung spielt somit keine Rolle für die resultierenden Haarkonzentrationen. Die nicht-proteingebundenen Substanzanteile im Blut diffundieren in das Haarfollikel und werden, ohne metabolisiert zu werden, in das Haar inkorporiert. Auch in den Talgdrüsen sowie in den apokrinen Schweißdrüsen, mit welchen das Haar in Kontakt kommt, bevor es aus der Hautoberfläche herauswächst, wurden keine 11 $\beta$ -HSD Typ 2 lokalisiert. (*Smith et al. 1996, Hirasawa et al. 1997*) Lediglich in den ekkrinen Schweißdrüsen, welche unter anderem an Stirn und Nacken lokalisiert sind, wurden 11 $\beta$ -HSD des Typs 2 nachgewiesen. Im ekkrinen Schweiß wurden Cortisolkonzentrationen zwischen 0,5 und 6 ng/ml nachgewiesen (*Grass et al. 2015, Jia et al. 2016, Russell et al. 2014*), was in etwa den nicht-proteingebundenen Anteilen entspricht. Die Cortisonkonzentrationen wurden in diesen Arbeiten nicht mitbestimmt. Da aktive Schwitzvorgänge jedoch nicht zu einer Erhöhung der Cortisol- und Cortisonkonzentrationen führen (*Grass et al. 2015*), scheinen auch die ekkrinen Schweißdrüsen keinen Einfluss auf die Konzentrationsverhältnisse zu haben.

Bei 72 der 94 Haarproben wurden auf Grund der verfügbaren Haarlänge mehrere Haarsegmente à 3 cm analysiert. Die Konzentrationsprofile entlang der Haarsträhnen zeigen, dass die GC-Konzentrationen stetig und signifikant ( $P < 0,001$ ) abnehmen. Zwischen dem ersten und dem zweiten Segment reduzieren sich die Cortisonwerte um durchschnittlich  $46,5 \pm 19,5 \%$  (2,1 - 87,4 %) und die Cortisolwerte um  $34,9 \pm 20,0 \%$  (2,4 - 82 %). Zwischen dem zweiten und dem dritten Segment liegen die Werte bei  $43,5 \pm 16,7 \%$  bzw.  $25,6 \pm 13,3 \%$ . Die einzelnen Konzentrationspaare ( $n = 128$ ) der untersuchten Haarsegmente der Probanden sowie der ermittelte Bereich für die Normalkonzentrationen der proximalen Segmente sind in Abbildung D-11 dargestellt. Die GC-Konzentrationen der Probanden streuen interindividuell stark und fallen mit zunehmenden Haaralter immer mehr aus dem Referenzbereich heraus. Welchen Einfluss die beiden konkurrierenden Mechanismen, Inkorporation und Auswaschung, auf die nachweisbaren GC-Konzentrationen haben, sollen die nachfolgenden Ergebnisse verdeutlichen.



**Abbildung D-11: Korrelation der Haarkonzentrationen der GCs. Dargestellt sind die Konzentrationspaare der einzelnen Haarsegmente sowie die Gleichungen zur Beschreibung des Referenzbereiches des proximalen Segments. Seg 1 = 0-3 cm; Seg 2 = 3-6 cm; Seg 3 = 6-9 cm**

#### **D.4.2 Veränderung der Konzentrationen während der Schwangerschaft**

Da es sich bei den Glucocorticosteroiden um stressinduzierte Hormone handelt, stellt sich die Frage, wie verändert sich ihre Produktion, wenn der Körper einer chronischen Stresssituation unterlegen ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe einer follow-up-Studie die Möglichkeit untersucht, Glucocorticoide als endogenen Stressmarker zu verwenden. In der Haar-Studie wurde erstmals Cortisol und sein biologisch inaktiver Metabolit Cortison parallel in Haarproben während einer Schwangerschaft bestimmt. Im Vergleich zu anderen Forschungsarbeiten (*D'Anna-Hernandez et al. 2011, Kalra et al. 2007, Kirschbaum et al. 2009*) liegt die Besonderheit dieses Projektes darin, dass der Probandin monatlich Haarproben entnommen wurden. So sind Veränderungen in den Haarkonzentrationen im Verlauf der Schwangerschaft und der ersten Zeit postpartum kontinuierlich nachweisbar.

Die nachgewiesenen Cortisol- und Cortisonkonzentrationen der einzelnen Haarsegmente sowie deren Charakteristika bzgl. Probenentnahmezeit und Wachstumszeit sind in Tabelle D-9 wiedergegeben. Bei der Angabe der Wachstumszeit wird von einer durchschnittlichen

Wachstumsrate von 1 cm pro Monat ausgegangen. Außerdem wird das Alter des Resthaares (Verbleib unterhalb der Kopfhaut und Reststrähne bis zur Schnittkante) mit ca. 2 Wochen kalkuliert.

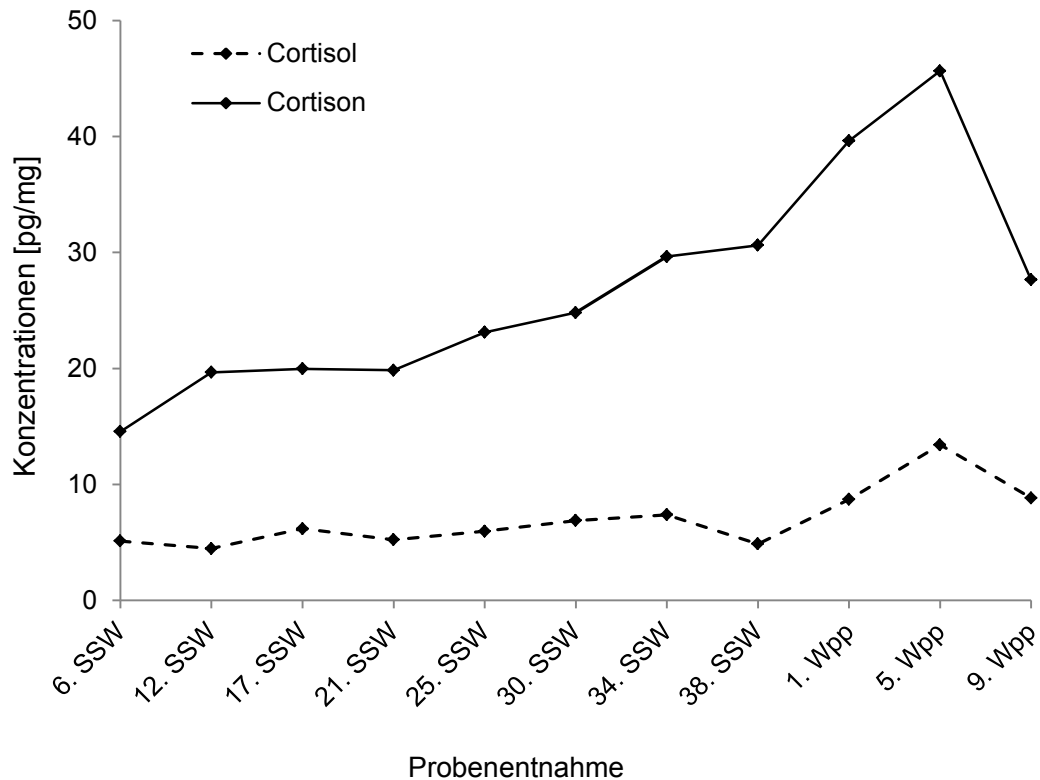
**Tabelle D-9: Cortisol- und Cortisonkonzentrationen der einzelnen Haarsegmente (je 2 cm) der Proben, welche während der Schwangerschaft genommen wurden. Die Konzentrationen nehmen entlang des Haarschaftes ab, im Fortlauf der Schwangerschaft jedoch zu.**

Probe	Entnahme	Segment	Wachstumszeit	Einwaage [mg]	Cortisol [pg/mg]	Cortison [pg/mg]
1	6. SSW 10.09.2011	1	07./08.2011	57,7	5.1	14.6
		2	05./06.2011	71,5	3.9	11.1
		3	03./04.2011	63,7	2.9	6.9
		4	01./02.2011	59,3	< LOD	5.5
2	12. SSW 11.10.2011	1	08./09.2011	47,3	4.5	19.7
		2	06./07.2011	46,2	3.8	11.9
		3	04./05.2011	46,6	3.2	6.0
		4	02./03.2011	40,0	< LOD	5.4
3	17. SSW 15.11.2011	1	09./10.2011	38,8	6.2	20.0
		2	07./08.2011	42,5	4.6	10.8
		3	05./06.2011	38,4	2.8	7.5
		4	03./04.2011	34,8	1.9	4.7
4	21. SSW 12.12.2011	1	10./11.2011	64,5	5.2	19.8
		2	08./09.2011	50,4	2.1	10.8
		3	06./07.2011	46,0	< LOD	7.0
		4	04./05.2011	46,5	< LOD	4.0
5	25. SSW 12.01.2012	1	11./12.2011	42,6	6.0	23.1
		2	09./10.2011	35,7	4.5	13.2
		3	07./08.2011	30,1	3.4	8.4
		4	05./06.2011	32,2	< LOD	7.1
6	30. SSW 15.02.2012	1	01.2012/12.2011	53,0	6.9	24.8
		2	10./11.2011	51,8	4.8	17.3
		3	08./09.2011	41,7	4.1	9.3
		4	06./07.2011	47,1	< LOD	5.7
7	34. SSW 12.02.2012	1	01./02.2012	48,4	7.4	29.6
		2	11./12.2011	43,3	4.5	16.6
		3	09./10.2011	39,3	3.6	9.8
		4	07./08.2011	38,9	< LOD	5.5

Fortführung Tabelle D-9

Probe	Entnahme	Segment	Wachstumszeit	Einwaage [mg]	Cortisol [pg/mg]	Cortison [pg/mg]
8	38. SSW 10.04.2012	1	02./03.2012	43,1	4.9	30.6
		2	01.2012/12.2011	41,8	4.3	22.5
		3	10./11.2011	39,1	3.1	13.6
		4	08./09.2011	38,3	< LOD	9.4
9	1 Woche pp 09.05.2012	1	03./04.2012	50,6	8.7	39.6
		2	01./02.2012	55,6	6.1	22.1
		3	11./12.2011	76,2	4.0	13.8
		4	09./10.2011	47,1	< LOD	7.6
10	5 Wochen pp. 07.06.2012	1	04./05.2012	79,4	13.4	45.7
		2	02./03.2012	75,2	7.0	28.7
		3	01.2012/12.2011	50,6	5.3	17.4
		4	10./11.2011	50,8	< LOD	10.2
		5	08./09.2011	55,3	< LOD	7.5
11	9 Wochen pp. 06.07.2012	1	05./06.2012	37,8	8.8	27.6
		2	03./04.2012	32,9	7.3	24.8
		3	01./02.2012	40,4	3.8	16.8
		4	11./12.2011	34,8	< LOD	9.0
		5	09./10.2011	38,6	< LOD	6.8

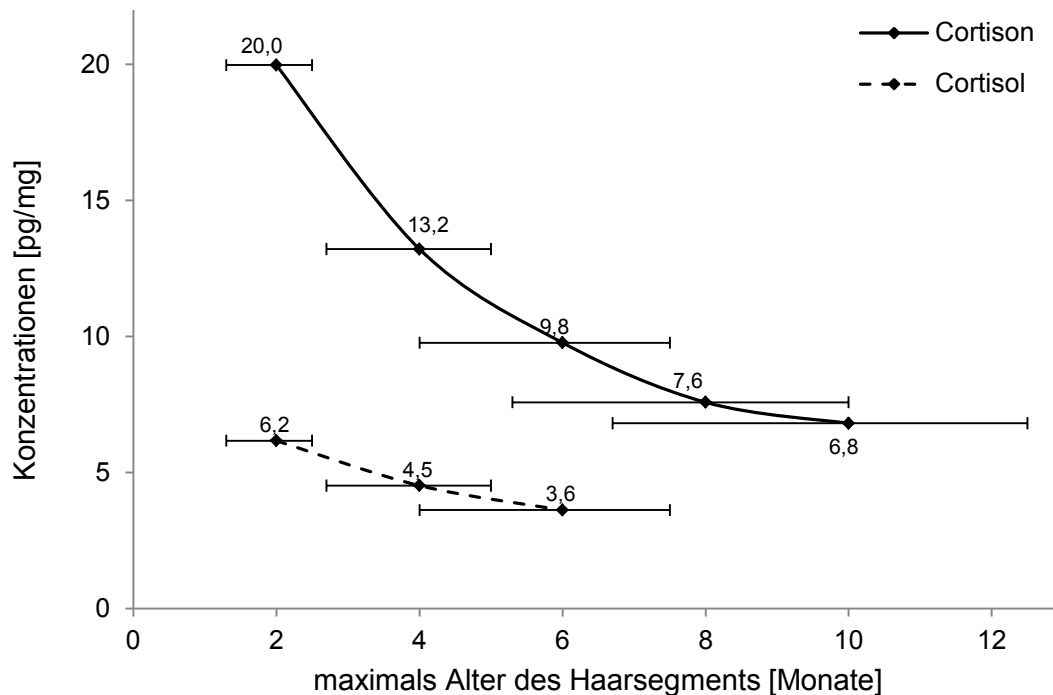
Der psychische und physische Einfluss, welchen die Schwangerschaft auf die Konzentrationen im Haar hat, lässt sich mit einem Vergleich der proximalen Haarsegmente zeigen (Abbildung D-12). Im Verlauf der Schwangerschaft kommt es zu einem stetigen Anstieg der Corticosteroidkonzentrationen im Haar, was auf eine gesteigerte Produktion und somit eine vermehrte Inkorporation in das Haar zurückzuführen ist. Das Konzentrationsmaximum (Cortisol: 13,4 pg/mg und Cortison: 45,7 pg/mg) wird in Probe 10 erreicht. Diese wurde 5 Wochen nach der Entbindung entnommen und spiegelt somit den letzten Schwangerschaftsmonat und die ersten 4 Wochen postpartum (April/Mai 2012) wider. Die Corticosteroidkonzentrationen sinken nach der Entbindung wieder ab (proximales Segment der Probe 9 Wochen pp, welches die ersten beiden Monate nach der Entbindung reflektiert). Die Ausgangshypothese wird angenommen und vorhandene Forschungen (D'Anna-Hernandez et al. 2011) bestätigt.



**Abbildung D-12: Verlauf der Corticosteroidkonzentrationen in den proximalen Segmenten. Die Konzentrationen steigen im Verlauf der Schwangerschaft stetig an, erreichen ihr Maximum in Probe 10 und fallen anschließend wieder ab.**

Für die einzelnen Haarproben kann gezeigt werden, dass die Konzentrationen entlang des Haarstranges abnehmen. Dabei reduzieren sich die Konzentrationen zwischen zwei benachbarten Segmenten um  $32,5 \pm 13,8 \%$  für F und um  $35,4 \pm 10,1 \%$  für E.

Ein Vergleich der Konzentrationen von Haarsegmenten, welche im selben Zeitraum gewachsen aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen wurden, gibt Aufschluss über den Auswascheffekt. In Abbildung D-13 ist dies beispielhaft für das Haarsegment gezeigt, welches im September und Oktober 2011 (ca. 2-3 Schwangerschaftsmonat) gewachsen ist. Anhand dieser Daten wird verdeutlicht, dass die Corticosteroidkonzentrationen für diese Probandin im Haar innerhalb von 4 Monaten auf die Hälfte der ursprünglich eingelagerten Konzentration absinken.



**Abbildung D-13: Nachweisbare GC-Konzentrationen in Abhängigkeit vom Alter des untersuchten Haarsegments. An Hand der kontinuierlich abfallenden Konzentrationen mit zunehmenden Alter des Haarsegments ist der Auswascheffekt deutlich zu erkennen. Die Fehlerbalken zeigen mögliche Indifferenzen im Bezug auf das Haaralter, da die Wachstums-rate für diese Probandin nicht bestimmt wurde. Es wird von einem durchschnittlichen Wachstum von 1 cm/Monat (Spannweite: 0,8 - 1,5 cm/Monat) ausgegangen.**

Die GCs sind bedingt durch ihre geringe Melanienaffinität nicht fest an das Haarpigment gebunden und dadurch Kandidaten, welche einer potentiellen Auswaschung unterliegen. Umwelteinflüsse und individuelle Parameter, wie die Frequenz von Haarwäschen und die Anwendung von Pflegeprodukten, bewirken, dass sich die Konzentrationen verringern. Abfallende Konzentrationsprofile entlang des Haares wurden bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen. (*D'Anna-Hernandez et al. 2011, Dettenborn et al. 2010, Gao et al. 2010, Kirschbaum et al. 2009, Noppe et al. 2015, Zhang et al. 2013*) Forschungsgruppen, bei denen dies nicht beobachtet wurde, argumentieren damit, dass es bedingt durch die Probenvorbereitung (Waschen des Haares zur Dekontamination) zu diesem Phänomen kommt. (*Etwel et al. 2014, Manenschijn et al. 2011, Manenschijn et al. 2012, Thomson et al. 2010*) Diese Theorie wird im Rahmen dieser Arbeit widerlegt, da die Probenaufarbeitung keinen Dekontaminationsschritt enthält und dennoch die Konzentrationsprofile nachweisbar sind. Außerdem wurde durch die mehrmalige Beprobung gezeigt, dass die Corticosteroidkonzentrationen mit zunehmendem Alter des Haares

abnehmen. Damit wurden systematische in vitro Untersuchungen bestätigt. (Hamel et al. 2011, Hoffman et al. 2014, Li et al. 2011)

Für eine Beurteilung von individuellen Veränderungen der Haarkonzentrationen der Corticosteroide, z.B. bedingt durch eine Erkrankung oder eine Stresssituation, ist es essentiell eine mehrmalige (min. zweimalige) Probenentnahme durchzuführen. Dadurch können Konzentrationen direkt verglichen und individuelle Parameter, wie die Wachstumsgeschwindigkeit berücksichtigt werden.

### **D.5 Einfluss der Plasmaproteinbindung auf die Haar- und Speichelkonzentrationen**

In der abschließenden Studie wurden alle drei Matrices der vorherigen Untersuchungen zusammengeführt und gesamtheitlich analytisch betrachtet. Die im Rahmen einer Schwangerschaft gewonnenen Plasma-, Speichel- und Haarproben wurden hinsichtlich ihrer GC-Konzentrationen und möglicher Korrelationen untereinander ausgewertet.

#### **D.5.1 Plasmaanalysen**

In den 10 Plasmaproben, welche während der Schwangerschaft sowie postpartum entnommen wurden, wurden die freien Anteile sowie die Gesamtkonzentrationen der Corticosteroide bestimmt. Die Konzentrationen sowie die daraus berechneten Plasmaproteinbindungen und die Analytverhältnisse sind in Tabelle D-10 zusammengefasst. Die Probenabnahme erfolgte dabei zwischen 07:15 Uhr und 08:00 Uhr, mit Ausnahme der Probe P\_3, welche erst 11:00 Uhr entnommen wurde. Dies wird auch durch die geringeren Konzentrationen sowie der verminderte Analytverhältnis deutlich.

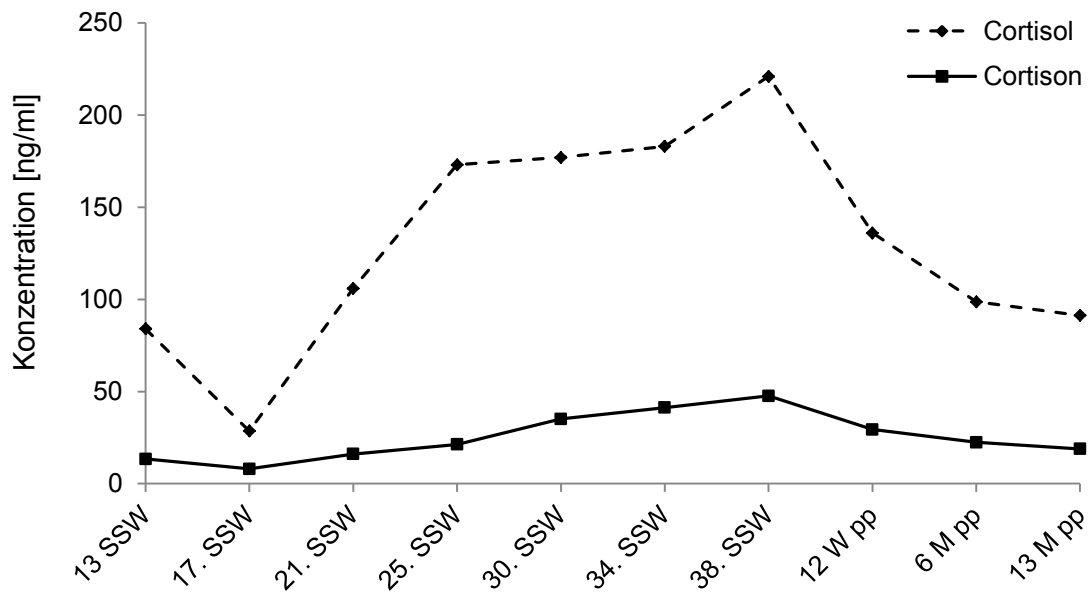
**Tabelle D-10: Zusammenstellung der Gesamtkonzentrationen (cg) der Corticosteroide, deren freien Anteile (cf) und PPB und des Analytverhältnisses der analysieren Plasmaproben**

Nr.	Entnahme	Cortisol			Cortison			F/E	
		C <sub>g</sub> [ng/ml]	C <sub>f</sub> [ng/ml]	PPB [%]	C <sub>g</sub> [ng/ml]	C <sub>f</sub> [ng/ml]	PPB [%]	g	f
P_0	./.								
P_1	./.								
P_2	13. SSW	84,0	3,4	96,0	13,4	1,8	86,3	6,2	1,9
P_3	17. SSW	28,6	0,7	97,6	8,0	1,6	79,9	3,6	0,4
P_4	21. SSW	106,0	2,7	97,4	16,1	2,1	86,8	6,6	1,3
P_5	25. SSW	173,0	3,2	97,9	21,3	3,3	84,5	8,1	1,1
P_6	30. SSW	177,0	3,9	97,3	35,1	6,6	81,3	5,0	0,7
P_7	34. SSW	183,0	5,2	97,1	41,3	8,1	80,5	4,4	0,7
P_8	38. SSW	221,0	8,3	96,2	47,6	9,2	80,7	4,6	0,9
P_9	./.								
P_10	./.								
P_11	12 W pp	136,0	3,1	97,7	29,4	5,3	81,9	4,6	0,6
P_12	6 M pp	98,7	2,4	97,6	22,4	3,2	85,8	4,4	0,7
P_13	13 M pp	91,3	1,7	98,1	18,9	2,9	84,7	4,8	0,6

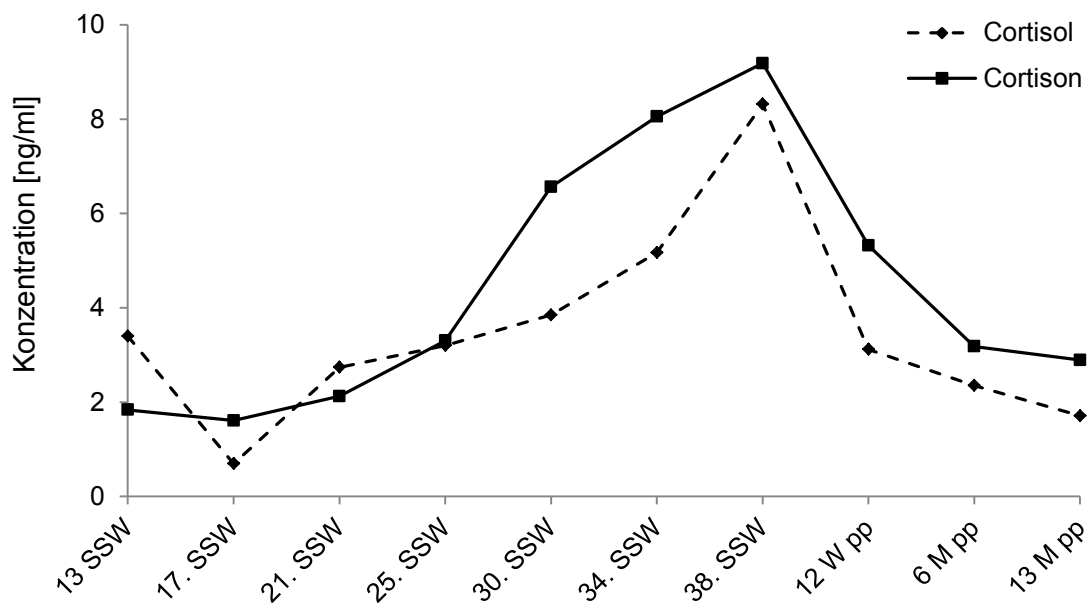
Sowohl die Gesamtkonzentrationen als auch die freien, nicht-proteingebundenen Anteile der GCs steigen im Verlauf der Schwangerschaft kontinuierlich an, bevor sie nach der Entbindung wieder auf das Ausgangsniveau absinken (Abbildung D-14). Dabei erhöht sich die Gesamtkonzentration von Cortisol auf das 2,6 - fache und das freie Cortisol auf das 2,4 - fache. Die Cortisonkonzentrationen steigen mit dem Faktor 3,5 (gesamt) und 5 (frei) an. Die Gesamtkonzentrationen korrelieren stark mit den freien Anteilen (Spearman: E: 0,988; F: 0,818). Auch die GC-Konzentrationen der jeweiligen Matrices untereinander (Spearman: frei: 0,770; gesamt: 0,915) korrelieren stark.



A) Gesamtkonzentrationen



B) freien Steroidanteile



**Abbildung D-14: Verlaufsprofile der freien und der gesamten Corticosteroidkonzentrationen im Plasma**

Die dauerhafte Aktivierung der HPA-Achse führt zu einer anhaltenden Stimulierung der Cortisolproduktion durch das ACTH. Was gleichzeitig eine gesteigerte Inaktivierung und somit einen Anstieg der Cortisonkonzentrationen (frei und gesamt) bewirkt. Dieses Ergebnis

ergänzt die Forschungsergebnisse von Perogamvros et al. (2010). In ihrer Studie führte eine akute Stimulierung mittels ACTH zu keiner Erhöhung des freien Cortisons (Gesamtcortison wurde nicht bestimmt). Was die Forschungsgruppe dazu bewegte, die freie Cortisonkonzentration als eine Konstante (ca. 15 nmol/l = 5,4 ng/ml) anzusehen. (Perogamvros et al. 2010) Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchte anhaltende/chronische Stimulierung wurde gezeigt, dass die freien Cortisonkonzentrationen intraindividuell streuen, dem zirkadianen Rhythmus unterliegen und durch akute und chronische Stressreaktionen veränderbar sind. Somit können sie nicht als Konstante betrachtet werden.

### D.5.2 Speicheluntersuchungen

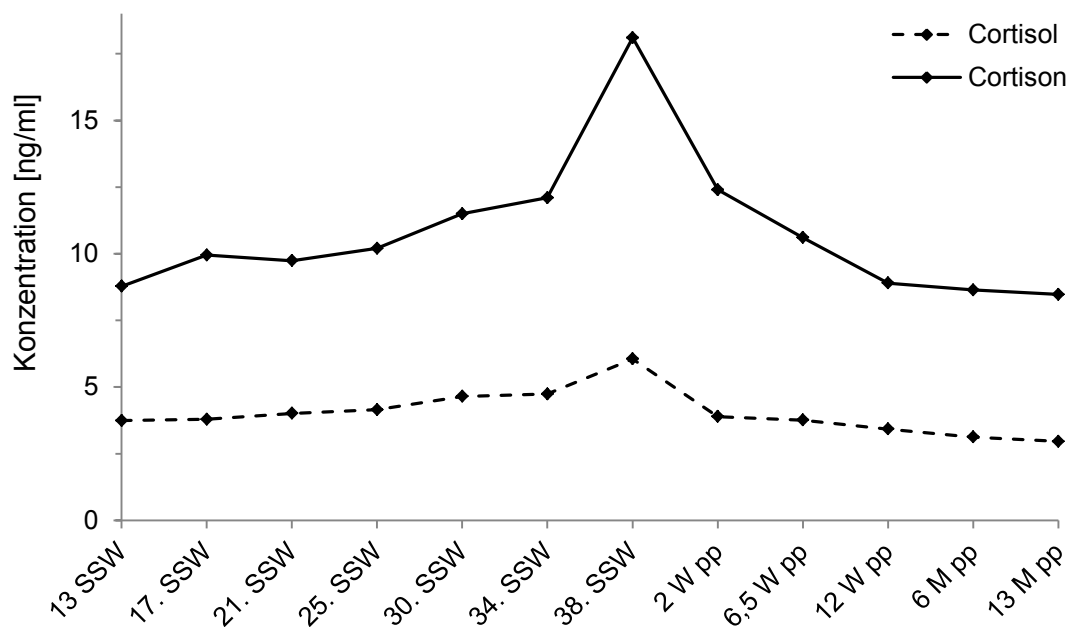
Die Speichelanalysen wurden unter zwei Gesichtspunkten durchgeführt. Zum einen soll ein Vergleich mit den zeitgleich entnommenen Haar- und Blutproben eine mögliche Korrelation verdeutlichen. Zum anderen sollen die fünf gesammelten Tagesprofile zeigen, ob es zu einer Veränderung der Corticosteroidkonzentrationen, deren Tagesverlauf und/oder deren Verhältnis zueinander während der Schwangerschaft kommt.

Die Analyse der Corticosteroide im Speichel während einer chronischen Aktivierung der HPA-Achse im Rahmen einer Schwangerschaft zeigt ebenfalls einen kontinuierlichen Anstieg beider Analytkonzentrationen. Die Konzentrationen der GCs sowie deren Verhältnis zueinander in den Speichelproben SP\_0 bis SP\_13 sind in Tabelle D-11 zusammengefasst.

**Tabelle D-11: Corticosteroidkonzentrationen in den Speichelproben**

Nummer	Entnahme	Cortisol [ng/ml]	Cortison [ng/ml]	F/E
SP_0	./.			
SP_1	./.			
SP_2	13. SSW	3,74	8,78	0,43
SP_3	17. SSW	3,79	9,95	0,38
SP_4	21. SSW	4,01	9,74	0,41
SP_5	25. SSW	4,15	10,20	0,41
SP_6	30. SSW	4,65	11,51	0,40
SP_7	34. SSW	4,74	12,12	0,39
SP_8	38. SSW	6,05	18,12	0,33
SP_9	2 W pp	3,89	12,41	0,31
SP_10	6,5 W pp	3,76	10,60	0,35
SP_11	12 W pp	3,42	8,91	0,38
SP_12	6 M pp	3,12	8,64	0,36
SP_13	13 M pp	2,96	8,47	0,35

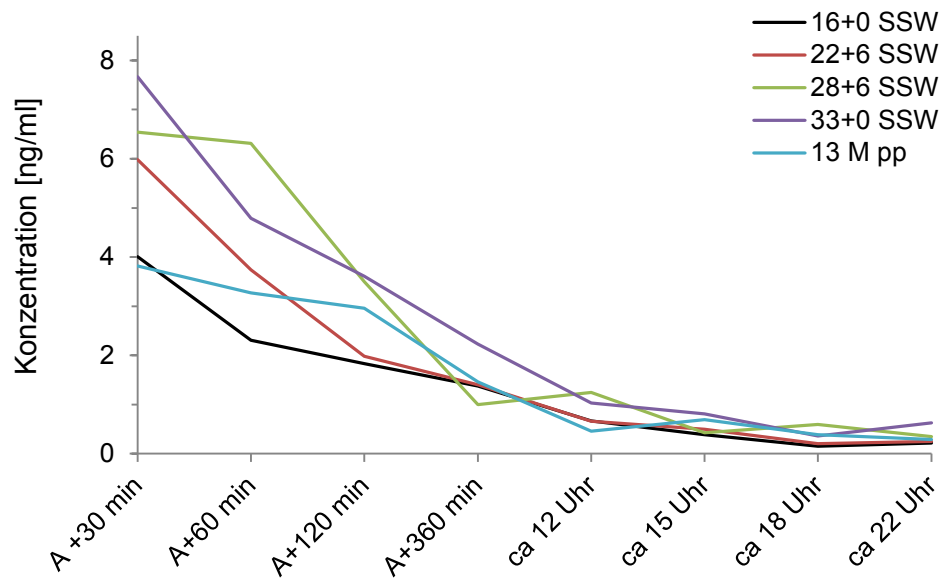
Die Konzentrationen korrelieren stark miteinander (Spearman:  $\rho = 0,853$ ) und ein Anstieg der Konzentrationen (E: Faktor 2,1, F: Faktor 1,6) mit Verlauf der Schwangerschaft ist deutlich zu erkennen (Abbildung D-15). Nach der Entbindung fallen die Konzentrationen beider GCs wieder auf ihr Ausgangsniveau ab. Ein Vergleich mit den Blutkonzentrationen (gesamt und frei, Abschnitt D.5.1) zeigt, dass das Speichelcortisol stark mit dem Blutcortisol (Spearman:  $\rho(\text{frei}) = 0,782$ ;  $\rho(\text{gesamt}) = 0,770$ ) korreliert aber nicht mit dem Blutcortison. Die Speichelkonzentrationen von E korrelieren dagegen stark mit den freien E-Anteilen (Spearman:  $\rho = 0,648$ ) sowie mit dem Cortisol im Blut (Spearman:  $\rho(\text{frei}) = 0,721$ ;  $\rho(\text{gesamt}) = 0,770$ ) aber nicht mit der gesamten Cortisonkonzentration ( $P = 0,074$ ).



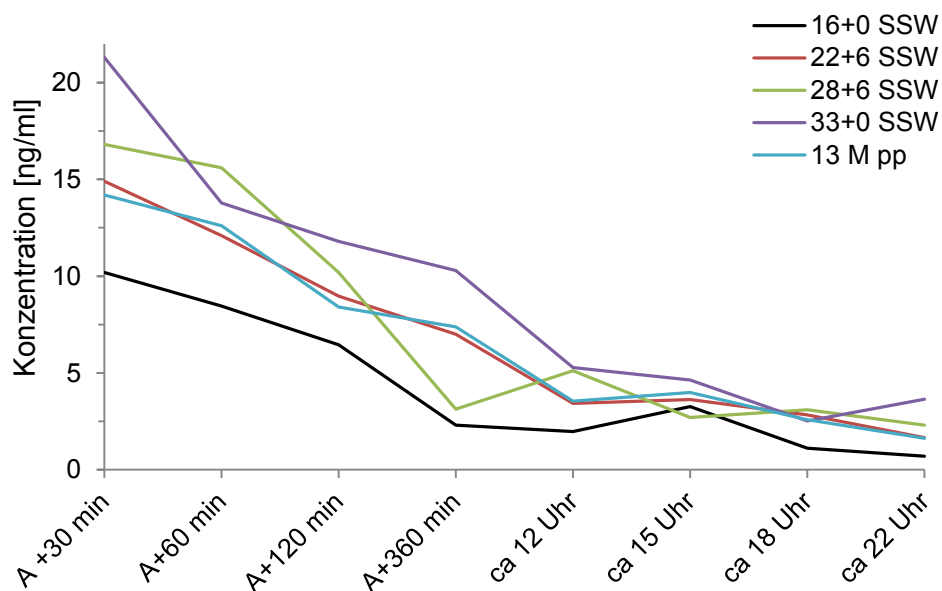
**Abbildung D-15: Veränderung der E- und F-Konzentrationen in den morgendlichen Speichelproben (zwischen 07:00 Uhr und 08:00 Uhr) während der Schwangerschaft**

Für den Vergleich der Tagesprofile während der unterschiedlichen Stadien der Schwangerschaft wurden je acht Speichelproben gesammelt. Die erste Probe des Tages wurde dabei 30 min nach dem Erwachen genommen. Weitere Probenentnahmen erfolgten 60 min, 120 min und 360 min nach dem Erwachen sowie gegen 12, 15, 18 und 22 Uhr. Die genauen Entnahmezeiten sowie die dazu gehörigen Konzentrationen sind im Anhang 34 zu finden. Abbildung D-16 zeigt die Konzentrationsprofile der Proben.

A) Cortisol



B) Cortison



**Abbildung D-16: Veränderung der GC-Tagesprofile im Speichel während/nach der Schwangerschaft**

Ein Anstieg der morgendlichen Konzentrationen der Corticosteroide in der Probe A+30 min ist mit zunehmendem Fortschreiten der Schwangerschaft deutlich zu erkennen. Im Verlauf des Tages gleichen sich die Profile an und die Nachmittag- und Abendproben weisen keine Unterschiede zwischen den einzelnen Probenentnahmetagen auf. Diese Untersuchungen zeigen, wie wichtig es ist, CAR in morgendlichen Proben zu berücksichtigen. Da CAR stressabhängig ist, muss für die Interpretation von morgendlichen GC-Konzentrationen das Stadium des „CAR-Prozesses“ berücksichtigt werden.

### D.5.3 Haaranalysen

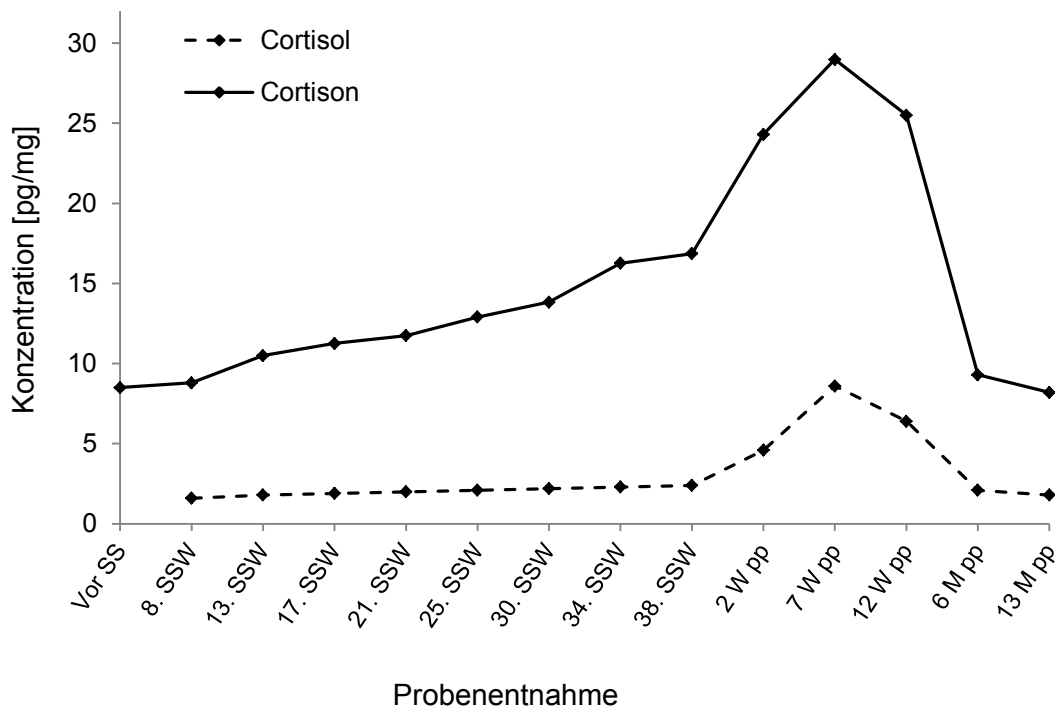
Da auch Haarproben den biologisch aktiven Anteil von Stoffen im Blut widerspiegeln und gleichzeitig eine retrospektive Aussage ermöglichen, wurden für diese Korrelationsstudie auch Haarproben der Probandin analysiert.

Für die Probandin wurde die individuelle Wachstumsrate an Hand der Länge einer markierten Haarsträhne bestimmt. Während der sieben Monate der Schwangerschaft ist das Haar 7,5 cm gewachsen, was einer durchschnittlichen Rate von 1,07 cm/Monat entspricht. In den folgenden 12,5 Monaten (29.08.2014 - 16.09.2015) ist das Haar 13 cm gewachsen, was einer Wachstumsrate von 1,04 cm/Monat entspricht. Da Unsicherheiten bei der Messung mit  $\pm 0,2$  cm berücksichtigt werden müssen, kann von einer Wachstumsrate von 1 cm/Monat ausgegangen werden. Außerdem wird das Alter des Resthaares (Verbleib unterhalb der Kopfhaut und Reststrähne bis zur Schnittkante) mit ca. 2 Wochen kalkuliert.

Die Konzentrationen der untersuchten Haarsegmente sind im Anhang 5 zu finden. Die Konzentrationen sowie die Analytverhältnisse sind in Tabelle D-12 wiedergegeben. Äquivalent zu den Ergebnissen der Haar-Studie (siehe D.4) wurden in den proximalen Haarsegmenten ansteigende GC-Konzentrationen für den Verlauf der Schwangerschaft ermittelt (Abbildung D-17). Die höchsten Konzentrationen sind in der Haarprobe zu finden, welche 7 Wochen nach der Entbindung genommen wurde. Diese spiegelt ca. den Zeitraum der letzten beiden SSW sowie der ersten 6 Wochen postpartum wider. Vergleichend mit den Werten von vor der Schwangerschaft stieg die Cortisolkonzentration um den Faktor 5,4 und die Cortisonkonzentration um den Faktor 3,4 an.

**Tabelle D-12: Corticosteroidkonzentrationen der proximalen Haarsegmente**

Nummer	Entnahme	Cortisol [pg/mg]	Cortison [pg/mg]	F/E
H_0	Vor SS	< LOD	8,5	
H_1	8. SSW	1,6	8,8	0,18
H_2	13. SSW	1,8	10,5	0,17
H_3	17. SSW	1,9	11,3	0,17
H_4	21. SSW	2,0	11,7	0,17
H_5	25. SSW	2,1	12,9	0,16
H_6	30. SSW	2,2	13,8	0,16
H_7	34. SSW	2,3	16,3	0,14
H_8	38. SSW	2,4	16,9	0,14
H_9	2 W pp	4,6	24,3	0,19
H_10	7 W pp	8,6	29,0	0,30
H_11	12 W pp	6,4	25,5	0,25
H_12	6 M pp	2,1	9,3	0,23
H_13	13 M pp	1,8	8,2	0,22

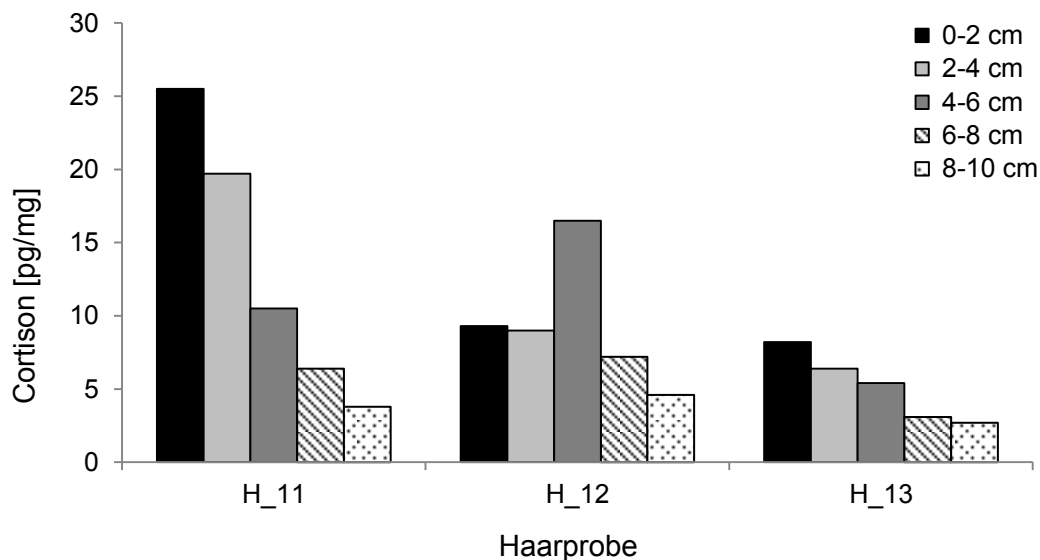


**Abbildung D-17: Veränderung der Haarkonzentrationen bedingt durch die chronische Stressbelastung während der Schwangerschaft**

Wie die Untersuchung der Plasmaproben gezeigt hat, steigen die Konzentrationen von Cortisol im Verlauf einer Schwangerschaft kontinuierlich an (vgl. (Carr et al. 1981, Smith et al. 1980)). Da gleichzeitig auch die CBG-Konzentration zunimmt (Ho et al. 2007, Lentjes et al. 1993, Meulenber et al. 1987, Musa et al. 1967, Scott, McGarrigle and Lachelin 1990), bleibt der Anteil der Plasmaproteinbindung für das Cortisol stabil bei 96 %. Dies führt dazu, dass sich die Konzentrationen an freiem und gesamtem Cortisol proportional zueinander verändern. Anders ist dies beim Cortison. Auch hier steigen die Konzentrationen kontinuierlich an. Die PPB des Cortisons liegt aber anfangs bei ca. 85 % und sinkt im Verlauf der Schwangerschaft auf 80 % ab. Eine mögliche Erklärung ist die Verdrängung des Cortisons aus seinen Proteinbindungen. CBG und Albumin geben das schwächer gebundene Cortison frei um die steigenden Konzentrationen des Cortisols auszugleichen. Dies führt dazu, dass die freien Anteile prozentual mehr ansteigen als die Gesamtkonzentration und somit Cortison verstärkt in das Haar eingelagert wird. Die Cortisonhaarkonzentration steigt dadurch schneller an als die Cortisolkonzentration, was ein Abfall des F/E-Verhältnisses bewirkt.

Weiterhin ist ein Konzentrationsgefälle entlang des Haarschaftes zu erkennen. Die Konzentrationen für Cortisol zwischen benachbarten Haarsegmenten sinken um 22,8 % (11,1 % - 75,6 %) und für Cortison um 35 % (12,7 % - 60,1 %). Ein Vergleich eines Wachstumsabschnittes zu unterschiedlichen Probenentnahmezeiten zeigt eine Reduzierung der ursprünglich eingelagerten Cortisonkonzentration von  $16,1 \pm 5,6$  % je 2-cm-Haarsegment. Dies entspricht einer durchschnittlichen Halbwertszeit von 5 Monaten. Für Cortisol liegt dies bei  $12,2 \pm 3,3$  % je 2-cm-Haarsegment und ca. 6 Monaten Halbwertszeit (Anhang 6). Wodurch der Auswascheffekt wieder verdeutlicht wird.

Abbildung D-18 zeigt die Konzentrationsverläufe des Cortisons (Cortisol siehe Anhang 7) entlang der Haarsträhne der Proben H\_11, H\_12 und H\_13. Diese Proben wurden 12 Wochen, 6 Monate bzw. 13 Monate nach der Entbindung genommen. Auffallend bei der Probe H\_12 (6 Monate pp) ist der Konzentrationspeak im Haarsegment 3 (4-6 cm, max. Alter der Haarprobe: 6 Monate). Dieses Segment spiegelt den Wachstumszeitraum August/September 2014 wider und somit die Zeit der höchsten Inkorporationsrate (Konzentration zur Einlagerung E: 29 pg/mg; F: 8,6 pg/mg). Dieses Haarsegment unterlag ebenfalls dem Auswascheffekt, aber bedingt durch die signifikant erhöhte Ausgangskonzentration ist die verstärkte Inkorporation auch 6 Monate später noch zu erkennen. Nach der viermonatigen Wachstumsphase sind noch 56 % des ursprünglich eingelagerten Cortisons und 35 % des Cortisol nachweisbar.



**Abbildung D-18: Verlauf der Cortisonkonzentrationen entlang der Haarsträhne der Proben H\_11, H\_12 und H\_13, welche 12 Wochen, 6 Monate und 13 Monate postpartum entnommen wurden.**

Bei dieser Probe ist somit das Gegenspiel von Einlagerung und Auswaschung deutlich zu erkennen. Beide gegenläufige Prozesse müssen somit bei retrospektiven Bewertungen berücksichtigt werden. Kommt es zu einer verstärkten Inkorporation ist es von der Intensität des Auswascheffektes abhängig, ob dies auch bei retrospektiven Betrachtungen nachweisbar ist. Im Fall der Haarprobe H-12 kann die gesteigerte Inkorporation während der letzten Schwangerschaftsperiode auch sechs Monate nachher noch nachgewiesen werden. Derselbe Effekt wurde auch von Kirschbaum et al. (2009) beobachtet. Bei Müttern von 3-4 Monate alten Kindern waren die Cortisolkonzentrationen des 2. Segments (Widerspiegelung des 3. Schwangerschaftstrimesters) höher als die Werte im proximalen Segment. Bei Müttern mit älteren Kindern (6 bzw. 9 Monate) war dies nicht mehr zu beobachten. (Kirschbaum et al. 2009) Im Gegensatz dazu konnten Manenschijn et al. (2012) gesteigerte Inkorporationen bedingt durch ein cyclisch auftretendes Cushings Syndrom auch 6 - 24 Monate danach retrospektiv nachweisen, da sie keinen Auswascheffekt in denen von ihnen untersuchten Proben beobachtet haben. (Manenschijn et al. 2012) Die systematische Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit beweist jedoch, dass die Corticosteroide Auswaschprozessen unterliegen, welche dazu führen, dass sich die Konzentrationen reduzieren und retrospektive Aussagen nur begrenzt möglich sind.



## E Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Antworten auf die Ausgangsfrage:

*„Wie hoch ist der Anteil der Plasmaproteinbindung der GCs im Blut und welche Rückschlüsse lassen sich daraus auf die Konzentrationsverschiebung innerhalb der einzelnen Matrices ziehen?“*

zu finden. Basierend darauf wurden die einzelnen Teilprojekte ausgewählt und durchgeführt. Sowohl Plasmaproben als auch Speichel- und Haarproben wurden hinsichtlich ihrer GC-Konzentrationen analysiert. Die Untersuchung von Kontrollproben ermöglichte es, Referenzwerte unter Normalbedingungen zu erheben. Die Ergebnisse aus allen Projekten ergaben, dass die beiden endogenen GCs Cortisol und Cortison in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen in den Analysenmedien vorkommen:

Plasma:	Gesamtkonzentration F:E	ca. 3:1
	freie Konzentrationen F:E	ca. 1:1
Speichel:	F:E	ca. 1:5
Haar:	F:E	ca. 1:3

Diese Ergebnisse bestätigen Forschungsergebnisse anderer Gruppen. Vogeser et al. berichteten ein Verhältnis im Serum von 5:1, Perogamvros et al. von 1:5 im morgendlichen Speichel und McWhinney et al. von 4:1 im Plasma und 1:7 im Speichel. (McWhinney et al. 2010, Perogamvros et al. 2009, Vogeser, Zchoval and Jacob 2001) Für Haaruntersuchungen wurden Verhältnisse zwischen 1:3 und 1:5 berichtet. (Chen et al. 2013, Gao et al. 2013, Grass et al. 2015, Kuehl et al. 2015, Stalder and Kirschbaum 2012, Zhang et al. 2013) Begründet wurden diese Beobachtungen bisher mit der Metabolisierung des Cortisols zum Cortison während der Inkorporation in das Haar bzw. während der Diffusion in den Speichel, was zu einer Umkehrung der Konzentrationsverhältnisse führe. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Beitrag der Plasmaproteinbindung zu dieser Verhältnisverschiebung zu bestimmen.

Die Bestimmung der PPB beider endogener GCs hat gezeigt, dass Cortisol mit ca. 96 % stärker an die Transportproteine CBG und Albumin bindet als Cortison mit ca. 85 %. Dies führt dazu, dass sich die freien, nicht-proteingebundenen Konzentrationen angleichen und es zu einer Verhältnisverschiebung von Cortisol zu Cortison von 3:1 auf 1:1 kommt. Somit stehen vergleichbare Konzentrationen für die Inkorporation ins Haar bzw. die Diffusion in den

Speichel zur Verfügung. Es konnte gezeigt werden, dass die freien Plasmakonzentrationen beider GC stark mit den Speichelkonzentrationen korrelieren, Cortisol aber unterproportional und Cortison überproportional vom Plasma in den Speichel übergeht. Was mit zwei weiteren Mechanismen, welche während der Diffusion eine Rolle spielen, der Lipophilie und der Inaktivierung durch lokale Enzymreaktionen, erklärt werden kann.

Weiterhin wurde gezeigt, dass sich die Tagesrhythmik der GC-Produktion im Speichel abbilden lässt und eine starke Korrelation zwischen Cortison und Cortisol vorliegt. Mit Hilfe einer Grenzfunktion können endogene Referenzkonzentrationen definiert und Messdaten eingeordnet werden. Unter anderem wurde gezeigt, dass eine Hormonersatztherapie mit *Hydrocortison* zu einer Verschiebung der Metabolisierung und der PPB führt und somit ein Gebrauch/Missbrauch von GCs durch abweichende Konzentrationsverhältnisse nachweisbar ist. Speicheluntersuchungen während einer chronischen Stresssituation (Schwangerschaft) zeigen, dass die GC-Produktion stetig ansteigt und sich besonders die CAR-Werte unterscheiden.

Um die tageszeitlichen und stressbedingten Schwankungen der GC-Produktion auszublenken und eine längere Zeitspanne zu betrachten, wurden zusätzlich Haarproben analysiert. In diesen wurde ein kontinuierlicher Anstieg der GCs in den proximalen Haarsegmenten nachgewiesen, was auf eine kontinuierlich erhöhte Inkorporation während der chronischen Stresssituation schließen lässt. Außerdem wurde gezeigt, dass die Haarkonzentrationen dem Auswascheffekt unterliegen und die nachweisbaren Konzentrationen geringer werden, je älter das Haar wird. Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass beide Mechanismen (Einlagerung und Auswaschung) konkurrieren und deshalb Referenzdaten nur für das proximale Segment erhoben werden können. Danach sind die Auswirkungen der individuellen Einflüsse nicht mehr allgemeingültig kalkulierbar und nur noch intraindividuelle Vergleiche nach mehrmaliger Beprobung aussagekräftig. Sind die Effekte der verstärkten Inkorporation größer als die Auswaschung, lassen sich diese auch Monate später erkennen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Plasmaproteinbindung der GCs zur Verhältnisverschiebung der Konzentrationen im Blut, Speichel und Haar beiträgt. Etwa 50 % des beobachteten Effekts kann der PPB zugeordnet werden. Weitere Quellen sind die unterschiedliche Lipophilie der GCs und die enzymatische Umwandlung, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht „quantitativ“ betrachtet wurden. Die enzymatische Inaktivierung wurde bis dato als Hauptreaktion für die Konzentrationsverschiebung diskutiert. Mit der aktuellen Arbeit wurde dies widerlegt, und die PPB als Hauptquelle identifiziert.

## Literaturverzeichnis

- Aardal, E. & A. C. Holm (1995) Cortisol in saliva--reference ranges and relation to cortisol in serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 33, 927-32.
- Abou-Samra, A. B., M. Pugeat, H. Dechaud, L. Nachury, B. Bouchareb, M. Fevre-Montange & J. Tourniaire (1984) Increased plasma concentration of N-terminal beta-lipotrophin and unbound cortisol during pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 20, 221-8.
- Allen, P. I., K. A. Batty, C. A. Dodd, J. Herbert, C. J. Hugh, G. F. Moore, M. J. Seymour, H. M. Shiers, P. M. Stacey & S. K. Young (1985) Dissociation between emotional and endocrine responses preceding an academic examination in male medical students. *J Endocrinol*, 107, 163-70.
- An, K., J. Salyer, R. E. Brown, H. F. Kao, A. Starkweather & I. Shim (2015) Salivary Biomarkers of Chronic Psychosocial Stress and CVD Risks: A Systematic Review. *Biol Res Nurs*, 18, 241-63.
- Anizan, S. & M. A. Huestis (2014) The potential role of oral fluid in antidoping testing. *Clin Chem*, 60, 307-22.
- Antonelli, G., F. Ceccato, C. Artusi, M. Marinova & M. Plebani (2015) Salivary cortisol and cortisone by LC-MS/MS: validation, reference intervals and diagnostic accuracy in Cushing's syndrome. *Clin Chim Acta*, 451, 247-51.
- Aps, J. K. & L. C. Martens (2005) Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int*, 150, 119-31.
- Armario, A., O. Marti, T. Molina, J. de Pablo & M. Valdes (1996) Acute stress markers in humans: response of plasma glucose, cortisol and prolactin to two examinations differing in the anxiety they provoke. *Psychoneuroendocrinology*, 21, 17-24.
- Baba, M., M. Ohkura, K. Koga, K. Nishiuchi, L. R. Herrera, R. Matsuse & T. Inoue (2015) Analysis of salivary cortisol levels to determine the association between depression level and differences in circadian rhythms of shift-working nurses. *J Occup Health*, 57, 237-44.
- Bae, Y. J. & J. Kratzsch (2015) Corticosteroid-binding globulin: modulating mechanisms of bioavailability of cortisol and its clinical implications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 29, 761-72.
- Bambino, T. H. & A. J. Hsueh (1981) Direct inhibitory effect of glucocorticoids upon testicular luteinizing hormone receptor and steroidogenesis in vivo and in vitro. *Endocrinology*, 108, 2142-8.
- Barrou, Z., D. Guiban, A. Maroufi, C. Fournier, M. A. Dugue, J. P. Luton & P. Thomopoulos (1996) Overnight dexamethasone suppression test: comparison of plasma and salivary cortisol measurement for the screening of Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol*, 134, 93-6.
- Baxendale, P. M., H. S. Jacobs & V. H. James (1983) Plasma and salivary androstenedione and dihydrotestosterone in women with hyperandrogenism. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 18, 447-57.

- Beishuizen, A., L. G. Thijs & I. Vermes (2001) Patterns of corticosteroid-binding globulin and the free cortisol index during septic shock and multitrauma. *Intensive Care Med*, 27, 1584-91.
- Birbeck, M. S. & E. H. Mercer (1957a) The electron microscopy of the human hair follicle. I. Introduction and the hair cortex. *J Biophys Biochem Cytol*, 3, 203-14.
- Birbeck, M. S. & E. H. Mercer (1957b) The electron microscopy of the human hair follicle. II. The hair cuticle. *J Biophys Biochem Cytol*, 3, 215-22.
- Birbeck, M. S. & E. H. Mercer (1957c) The electron microscopy of the human hair follicle. III. The inner root sheath and trichohyaline. *J Biophys Biochem Cytol*, 3, 223-30.
- Bosker, W. M. & M. A. Huestis (2009) Oral fluid testing for drugs of abuse. *Clin Chem*, 55, 1910-31.
- Braig, S., F. Grabher, C. Ntomchukwu, F. Reister, T. Stalder, C. Kirschbaum, J. Genuneit & D. Rothenbacher (2015) Determinants of maternal hair cortisol concentrations at delivery reflecting the last trimester of pregnancy. *Psychoneuroendocrinology*, 52, 289-96.
- Bredehoff, M., R. Baginski, M. K. Parr, M. Thevis & W. Schanzer (2012) Investigations of the microbial transformation of cortisol to prednisolone in urine samples. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 129, 54-60.
- Brorsson, C., P. Dahlqvist, L. Nilsson & S. Naredi (2014) Saliva stimulation with glycerine and citric acid does not affect salivary cortisol levels. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 81, 244-8.
- Carr, B. R., C. R. Parker, Jr., J. D. Madden, P. C. MacDonald & J. C. Porter (1981) Maternal plasma adrenocorticotropin and cortisol relationships throughout human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 139, 416-22.
- Cetinkaya, S., A. Ozon & N. Yordam (2007) Diagnostic value of salivary cortisol in children with abnormal adrenal cortex functions. *Horm Res*, 67, 301-6.
- Charney W & H. L. Herzog. 1967. *Microbial Transformations of Steroids: A Handbook*. New York: Academic Press.
- Chen, Y. M., N. M. Cintron & P. A. Whitson (1992) Long-term storage of salivary cortisol samples at room temperature. *Clin Chem*, 38, 304.
- Chen, Z., J. Li, J. Zhang, X. Xing, W. Gao, Z. Lu & H. Deng (2013) Simultaneous determination of hair cortisol, cortisone and DHEAS with liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in negative mode. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 929, 187-94.
- Chiappin, S., G. Antonelli, R. Gatti & E. F. De Palo (2007) Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta*, 383, 30-40.
- Chida, Y. & A. Steptoe (2009) Cortisol awakening response and psychosocial factors: a systematic review and meta-analysis. *Biol Psychol*, 80, 265-78.
- Cirimele, V., P. Kintz, V. Dumestre, J. P. Gouille & B. Ludes (2000) Identification of ten corticosteroids in human hair by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry. *Forensic Sci Int*, 107, 381-8.
- Clements, A. D. & C. R. Parker (1998) The relationship between salivary cortisol concentrations in frozen versus mailed samples. *Psychoneuroendocrinology*, 23, 613-6.

- Clements, A. D., C. R. Parker, Jr., W. E. Dixon, Jr. & B. Salley (2007) Marshmallows used as saliva stimulant do not affect cortisol concentrations: finally a palatable alternative for toddler saliva collection. *Dev Psychobiol*, 49, 702-7.
- Clow, A., L. Thorn, P. Evans & F. Hucklebridge (2004) The awakening cortisol response: methodological issues and significance. *Stress*, 7, 29-37.
- Coolens, J. L. & W. Heyns (1989) Marked elevation and cyclic variation of corticosteroid-binding globulin: an inherited abnormality? *J Clin Endocrinol Metab*, 68, 492-4.
- Coolens, J. L., H. Van Baelen & W. Heyns (1987) Clinical use of unbound plasma cortisol as calculated from total cortisol and corticosteroid-binding globulin. *J Steroid Biochem*, 26, 197-202.
- Cumming, D. C., M. E. Quigley & S. S. Yen (1983) Acute suppression of circulating testosterone levels by cortisol in men. *J Clin Endocrinol Metab*, 57, 671-3.
- Czock, D., F. Keller, F. M. Rasche & U. Haussler (2005) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin Pharmacokinet*, 44, 61-98.
- D'Anna-Hernandez, K. L., R. G. Ross, C. L. Natvig & M. L. Laudenslager (2011) Hair cortisol levels as a retrospective marker of hypothalamic-pituitary axis activity throughout pregnancy: comparison to salivary cortisol. *Physiol Behav*, 104, 348-53.
- Davis, S. N., C. Shavers, F. Costa & R. Mosqueda-Garcia (1996) Role of cortisol in the pathogenesis of deficient counterregulation after antecedent hypoglycemia in normal humans. *J Clin Invest*, 98, 680-91.
- De Boer, S. F., S. J. Koopmans, J. L. Slangen & J. Van der Gugten (1990) Plasma catecholamine, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats: effect of interstressor interval length. *Physiol Behav*, 47, 1117-24.
- De Moor, P., E. Meulepas, A. Hendriks, W. Heyns & H. G. Vandenschrieck (1967) Cortisol-binding capacity of plasma transcortin: a sex-linked trait? *J Clin Endocrinol Metab*, 27, 959-65.
- De Moor, P., O. Steeno, I. Brosens & A. Hendriks (1966) Data on transcortin activity in human plasma as studied by gel filtration. *J Clin Endocrinol Metab*, 26, 71-8.
- De Palo, E. F., G. Antonelli, A. Benetazzo, M. Prearo & R. Gatti (2009) Human saliva cortisone and cortisol simultaneous analysis using reverse phase HPLC technique. *Clin Chim Acta*, 405, 60-5.
- del Corral, P., A. D. Mahon, G. E. Duncan, C. A. Howe & B. W. Craig (1994) The effect of exercise on serum and salivary cortisol in male children. *Med Sci Sports Exerc*, 26, 1297-301.
- Dettenborn, L., C. Muhtz, N. Skoluda, T. Stalder, S. Steudte, K. Hinkelmann, C. Kirschbaum & C. Otte (2012) Introducing a novel method to assess cumulative steroid concentrations: increased hair cortisol concentrations over 6 months in medicated patients with depression. *Stress*, 15, 348-53.
- Dettenborn, L., A. Tietze, F. Bruckner & C. Kirschbaum (2010) Higher cortisol content in hair among long-term unemployed individuals compared to controls. *Psychoneuroendocrinology*, 35, 1404-9.

- Deutschbein, T., N. Unger, K. Mann & S. Petersenn (2009) Diagnosis of secondary adrenal insufficiency in patients with hypothalamic-pituitary disease: comparison between serum and salivary cortisol during the high-dose short synacthen test. *Eur J Endocrinol*, 160, 9-16.
- Di Luigi, L., C. Baldari, M. C. Gallotta, F. Perroni, F. Romanelli, A. Lenzi & L. Guidetti (2006) Salivary steroids at rest and after a training load in young male athletes: relationship with chronological age and pubertal development. *Int J Sports Med*, 27, 709-17.
- Dorin, R. I., H. K. Pai, J. T. Ho, J. G. Lewis, D. J. Torpy, F. K. Urban, 3rd & C. R. Qualls (2009) Validation of a simple method of estimating plasma free cortisol: role of cortisol binding to albumin. *Clin Biochem*, 42, 64-71.
- Duclos, M. (2010) Glucocorticoids: a doping agent? *Endocrinol Metab Clin North Am*, 39, 107-26, ix-x.
- Duclos, M., C. Gatti, B. Bessiere & P. Mormede (2009) Tonic and phasic effects of corticosterone on food restriction-induced hyperactivity in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 34, 436-45.
- Edwards, C. R., P. M. Stewart, D. Burt, L. Brett, M. A. McIntyre, W. S. Sutanto, E. R. de Kloet & C. Monder (1988) Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet*, 2, 986-9.
- Erickson, D., R. J. Singh, A. Sathananthan, A. Vella & S. C. Bryant (2012) Late-night salivary cortisol for diagnosis of Cushing's syndrome by liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 76, 467-72.
- Etwel, F., E. Russell, M. J. Rieder, S. H. Van Uum & G. Koren (2014) Hair cortisol as a biomarker of stress in the 2011 Libyan war. *Clin Invest Med*, 37, E403-8.
- Ferrari, P. (2010) The role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human hypertension. *Biochim Biophys Acta*, 1802, 1178-87.
- Fleshner, M., T. Deak, R. L. Spencer, M. L. Laudenslager, L. R. Watkins & S. F. Maier (1995) A long-term increase in basal levels of corticosterone and a decrease in corticosteroid-binding globulin after acute stressor exposure. *Endocrinology*, 136, 5336-42.
- Frankenhaeuser, M. (1982) Challenge-control interaction as reflected in sympathetic-adrenal and pituitary-adrenal activity: comparison between the sexes. *Scand J Psychol, Suppl* 1, 158-64.
- Frenzel, S. & H. G. Dorr (1998) [Problems of delayed diagnosis of an uncomplicated adrenogenital syndrome (AGS) with 21-hydroxylase defect in a 7-year-old boy]. *Dtsch Med Wochenschr*, 123, 827-31.
- Fries, E., L. Dettenborn & C. Kirschbaum (2009) The cortisol awakening response (CAR): facts and future directions. *Int J Psychophysiol*, 72, 67-73.
- Gao, W., T. Stalder, P. Foley, M. Rauh, H. Deng & C. Kirschbaum (2013) Quantitative analysis of steroid hormones in human hair using a column-switching LC-APCI-MS/MS assay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 928, 1-8.
- Gao, W., Q. Xie, J. Jin, T. Qiao, H. Wang, L. Chen, H. Deng & Z. Lu (2010) HPLC-FLU detection of cortisol distribution in human hair. *Clin Biochem*, 43, 677-82.
- Garde, A. H. & A. M. Hansen (2005) Long-term stability of salivary cortisol. *Scand J Clin Lab Invest*, 65, 433-6.

- Glock, M., P. A. Heller, D. Malamud & S. National Library of Medicine . Reference. 1992. *Saliva as a diagnostic fluid: January 1982 through April 1992 : 2098 citations*. U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Library of Medicine, Reference Section.
- Gow, R., G. Koren, M. Rieder & S. Van Uum (2011) Hair cortisol content in patients with adrenal insufficiency on hydrocortisone replacement therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 74, 687-693.
- Gow, R., S. Thomson, M. Rieder, S. Van Uum & G. Koren (2010) An assessment of cortisol analysis in hair and its clinical applications. *Forensic Sci Int*, 196, 32-7.
- Grass, J., C. Kirschbaum, R. Miller, W. Gao, S. Steudte-Schmiedgen & T. Stalder (2015) Sweat-inducing physiological challenges do not result in acute changes in hair cortisol concentrations. *Psychoneuroendocrinology*, 61, 64.
- Gray, C. H., M. A. Green, N. J. Holness & J. B. Lunn (1956) Urinary metabolic products of prednisone and prednisolone. *J Endocrinol*, 14, 146-54.
- Greaves, M. S. & H. F. West (1963) Cortisol and cortisone in saliva of pregnancy. *J Endocrinol*, 26, 189-95.
- Groschl, M. (2008) Current status of salivary hormone analysis. *Clin Chem*, 54, 1759-69.
- Groschl, M., M. Rauh & H. G. Dorr (2002) Cortisol and 17-hydroxyprogesterone kinetics in saliva after oral administration of hydrocortisone in children and young adolescents with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 1200-4.
- Groschl, M., R. Wagner, M. Rauh & H. G. Dorr (2001) Stability of salivary steroids: the influences of storage, food and dental care. *Steroids*, 66, 737-41.
- Haeckel, R. (1989) Interpretation of salivary drug concentrations. *J Clin Chem Clin Biochem*, 27, 223-6.
- Haeckel, R. & P. Hanecke (1996) Application of saliva for drug monitoring. An in vivo model for transmembrane transport. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 34, 171-91.
- Hamel, A. F., J. S. Meyer, E. Henchey, A. M. Dettmer, S. J. Suomi & M. A. Novak (2011) Effects of shampoo and water washing on hair cortisol concentrations. *Clin Chim Acta*, 412, 382-5.
- Hammond, G. L. (1990) Molecular properties of corticosteroid binding globulin and the sex-steroid binding proteins. *Endocr Rev*, 11, 65-79.
- Hammond, G. L., C. L. Smith, I. S. Goping, D. A. Underhill, M. J. Harley, J. Reventos, N. A. Musto, G. L. Gunsalus & C. W. Bardin (1987) Primary structure of human corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and pulmonary cDNAs, exhibits homology with serine protease inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 5153-7.
- Hammond, G. L., C. L. Smith & D. A. Underhill (1991) Molecular studies of corticosteroid binding globulin structure, biosynthesis and function. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 40, 755-62.
- HAMPL, R., L. Foretova, J. Sulcova & L. Starka (1990) Daily profiles of salivary cortisol in hydrocortisone treated children with congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Pediatr*, 149, 232-4.

- Hamrahian, A. H., T. S. Oseni & B. M. Arafah (2004) Measurements of serum free cortisol in critically ill patients. *N Engl J Med*, 350, 1629-38.
- Handa, R. J., L. H. Burgess, J. E. Kerr & J. A. O'Keefe (1994) Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Horm Behav*, 28, 464-76.
- Hansch, C., A. Leo & D. Hoekman. 1995. *Exploring QSAR: Hydrophobic, Electronic, and steric Constants*. Washington DC: American Chemical Society.
- Hayano, M., H. J. Ringold, V. Stefanovic, M. Gut & R. I. Dorfman (1961) The stereochemical course of enzymatic steroid 1, 2-dehydrogenation. *Biochem Biophys Res Commun*, 4, 454-9.
- Hellhammer, D. H., S. Wust & B. M. Kudielka (2009) Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology*, 34, 163-71.
- Helmlin, H. J., A. Murner, S. Steiner, M. Kamber, C. Weber, H. Geyer, S. Guddat, W. Schanzer & M. Thevis (2016) Detection of the diuretic hydrochlorothiazide in a doping control urine sample as the result of a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) tablet contamination. *Forensic Sci Int*, 267, 166-172.
- Henderson, G. L. (1993) Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Sci Int*, 63, 19-29.
- Henley, D. E. & S. L. Lightman (2011) New insights into corticosteroid-binding globulin and glucocorticoid delivery. *Neuroscience*, 180, 1-8.
- Henning, S. J. (1978) Plasma concentrations of total and free corticosterone during development in the rat. *Am J Physiol*, 235, E451-6.
- Hiramatsu, R. (1981) Direct assay of cortisol in human saliva by solid phase radioimmunoassay and its clinical applications. *Clin Chim Acta*, 117, 239-49.
- Hirasawa, G., H. Sasano, K. Takahashi, K. Fukushima, T. Suzuki, N. Hiwatashi, T. Toyota, Z. S. Krozowski & H. Nagura (1997) Colocalization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II and mineralocorticoid receptor in human epithelia. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 3859-63.
- Ho, J. T., H. Al-Musalhi, M. J. Chapman, T. Quach, P. D. Thomas, C. J. Bagley, J. G. Lewis & D. J. Torpy (2006) Septic shock and sepsis: a comparison of total and free plasma cortisol levels. *J Clin Endocrinol Metab*, 91, 105-14.
- Ho, J. T., J. G. Lewis, P. O'Loughlin, C. J. Bagley, R. Romero, G. A. Dekker & D. J. Torpy (2007) Reduced maternal corticosteroid-binding globulin and cortisol levels in pre-eclampsia and gamete recipient pregnancies. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 66, 869-77.
- Hoffman, M. C., L. V. Karban, P. Benitez, A. Goodteacher & M. L. Laudenslager (2014) Chemical processing and shampooing impact cortisol measured in human hair. *Clin Invest Med*, 37, E252-7.
- Jacobs, N., N. A. Nicolson, C. Derom, P. Delespaul, J. van Os & I. Myin-Germeys (2005) Electronic monitoring of salivary cortisol sampling compliance in daily life. *Life Sci*, 76, 2431-43.
- Jia, M., W. M. Chew, Y. Feinstein, P. Skeath & E. M. Sternberg (2016) Quantification of cortisol in human eccrine sweat by liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *Analyst*, 141, 2053-60.



- Kalra, S., A. Einarson, T. Karaskov, S. Van Uum & G. Koren (2007) The relationship between stress and hair cortisol in healthy pregnant women. *Clin Invest Med*, 30, E103-7.
- Karlen, J. L., J.; Frostell, A.; Theodorsson, E.; Faresjö, T. (2011) Cortisol in hair measured in young adults- biomarker of major life stressors? *BMC Clinical Pathology*, 11.
- Karlson, P. D., D.; Koolman, J.; Fuchs, G.; Gerok, W. 2005. *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. Georg Thieme Verlag.
- Kemmer, F. W., R. Bisping, H. J. Steingruber, H. Baar, F. Hardtmann, R. Schlaghecke & M. Berger (1986) Psychological stress and metabolic control in patients with type I diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 314, 1078-84.
- Kidd, S., P. Midgley, N. Lone, A. M. Wallace, M. Nicol, J. Smith & N. McIntosh (2009) A re-investigation of saliva collection procedures that highlights the risk of potential positive interference in cortisol immunoassay. *Steroids*, 74, 666-8.
- Kidwell, D. A., J. C. Holland & S. Athanasis (1998) Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 713, 111-35.
- Kintz, P. (2004) Value of hair analysis in postmortem toxicology. *Forensic Sci Int*, 142, 127-34.
- Kirchhoff, F., J. Briegel & M. Vogeser (2011) Quantification of free serum cortisol based on equilibrium dialysis and isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem*, 44, 894-9.
- Kirschbaum, C., A. Tietze, N. Skoluda & L. Dettenborn (2009) Hair as a retrospective calendar of cortisol production-Increased cortisol incorporation into hair in the third trimester of pregnancy. *Psychoneuroendocrinology*, 34, 32-7.
- Klingmüller, D. S., H.U. 2001. Teil F:Endokrinologie. In *Innere Medizin Sonderausgabe*, ed. K. B. A. Bob, 875-876. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Kosuge, K., T. Uematsu, S. I. Araki, H. Matsuno, K. Ohashi & M. Nakashima (1998) Comparative dispositions of ofloxacin in human head, axillary, and pubic hairs. *Antimicrob Agents Chemother*, 42, 1298-302.
- Kramer, M. S., J. Lydon, L. Seguin, L. Goulet, S. R. Kahn, H. McNamara, J. Genest, C. Dassa, M. F. Chen, S. Sharma, M. J. Meaney, S. Thomson, S. Van Uum, G. Koren, M. Dahhou, J. Lamoureux & R. W. Platt (2009) Stress pathways to spontaneous preterm birth: the role of stressors, psychological distress, and stress hormones. *Am J Epidemiol*, 169, 1319-26.
- Krumbholz, A. 2012. *Masterarbeit: Diagnostik und Interpretation des Nachweises von Corticosteroiden in Haaren*. TU Dresden.
- Krumbholz, A., P. Anielski, N. Reisch, G. Schelling & D. Thieme (2013) Diagnostic value of concentration profiles of glucocorticosteroids and endocannabinoids in hair. *Ther Drug Monit*, 35, 600-7.
- Kudielka, B. M., J. E. Broderick & C. Kirschbaum (2003) Compliance with saliva sampling protocols: electronic monitoring reveals invalid cortisol daytime profiles in noncompliant subjects. *Psychosom Med*, 65, 313-9.

- Kuehl, L. K., K. Hinkelmann, C. Muhtz, L. Dettenborn, K. Wingenfeld, C. Spitzer, C. Kirschbaum, K. Wiedemann & C. Otte (2015) Hair cortisol and cortisol awakening response are associated with criteria of the metabolic syndrome in opposite directions. *Psychoneuroendocrinology*, 51, 365-70.
- Lentjes, E. G., F. Romijn, R. J. Maassen, L. de Graaf, P. Gautier & A. J. Moolenaar (1993) Free cortisol in serum assayed by temperature-controlled ultrafiltration before fluorescence polarization immunoassay. *Clin Chem*, 39, 2518-21.
- Lewis, J. G. (2006) Steroid analysis in saliva: an overview. *Clin Biochem Rev*, 27, 139-46.
- Lewis, J. G., C. J. Bagley, P. A. Elder, A. W. Bachmann & D. J. Torpy (2005) Plasma free cortisol fraction reflects levels of functioning corticosteroid-binding globulin. *Clin Chim Acta*, 359, 189-94.
- Li, J., Q. Xie, W. Gao, Y. Xu, S. Wang, H. Deng & Z. Lu (2011) Time course of cortisol loss in hair segments under immersion in hot water. *Clin Chim Acta*, 413, 434-40.
- Mandel, I. D. (1990) The diagnostic uses of saliva. *J Oral Pathol Med*, 19, 119-25.
- Manenschijn, L., J. W. Koper, S. W. Lamberts & E. F. van Rossum (2011) Evaluation of a method to measure long term cortisol levels. *Steroids*, 76, 1032-6.
- Manenschijn, L., J. W. Koper, E. L. van den Akker, L. J. de Heide, E. A. Geerdink, F. H. de Jong, R. A. Feelders & E. F. van Rossum (2012) A novel tool in the diagnosis and follow-up of (cyclic) Cushing's syndrome: measurement of long-term cortisol in scalp hair. *J Clin Endocrinol Metab*, 97, E1836-43.
- Marcus-Perlman, Y., K. Tordjman, Y. Greenman, R. Limor, G. Shenkerman, E. Osher & N. Stern (2006) Low-dose ACTH (1 microg) salivary test: a potential alternative to the classical blood test. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 64, 215-8.
- Mastorakos, G. & I. Ilias (2000) Maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis in pregnancy and the postpartum period. Postpartum-related disorders. *Ann N Y Acad Sci*, 900, 95-106.
- Matabosch, X., O. J. Pozo, N. Monfort, C. Perez-Mana, M. Farre, J. Marcos, J. Segura & R. Ventura (2013a) Urinary profile of methylprednisolone and its metabolites after oral and topical administrations. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 138, 214-21.
- Matabosch, X., O. J. Pozo, C. Perez-Mana, M. Farre, J. Marcos, J. Segura & R. Ventura (2013b) Discrimination of prohibited oral use from authorized inhaled treatment of budesonide in sports. *Ther Drug Monit*, 35, 118-28.
- McWhinney, B. C., S. E. Briscoe, J. P. Ungerer & C. J. Pretorius (2010) Measurement of cortisol, cortisone, prednisolone, dexamethasone and 11-deoxycortisol with ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application for plasma, plasma ultrafiltrate, urine and saliva in a routine laboratory. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 878, 2863-9.
- Mendel, C. M. (1989) The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev*, 10, 232-74.
- Merckmillipore. 21.06.2016. <http://www.merckmillipore.com/DE/de/life-science-research/protein-sample-preparation/protein-concentration/amicon-ultra-centrifugal-filters/0-5-ml/ytSb.qB.gZIAAFBQHplvyxn.nav>.
- Merke, D. P. & G. B. Cutler, Jr. (2001) New ideas for medical treatment of congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 30, 121-35.

- Metcalf, M. G., J. J. Evans & J. A. Mackenzie (1984) Indices of ovulation: comparison of plasma and salivary levels of progesterone with urinary pregnanediol. *J Endocrinol*, 100, 75-80.
- Meulenberg, P. M., H. A. Ross, L. M. Swinkels & T. J. Benraad (1987) The effect of oral contraceptives on plasma-free and salivary cortisol and cortisone. *Clin Chim Acta*, 165, 379-85.
- Meyerhoff, J. L., M. A. Oleshansky & E. H. Mougey (1988) Psychologic stress increases plasma levels of prolactin, cortisol, and POMC-derived peptides in man. *Psychosom Med*, 50, 295-303.
- Mezzullo, M., F. Fanelli, A. Fazzini, A. Gambineri, V. Vicennati, G. Di Dalmazi, C. Pelusi, R. Mazza, U. Pagotto & R. Pasquali (2016) Validation of an LC-MS/MS salivary assay for glucocorticoid status assessment: Evaluation of the diurnal fluctuation of cortisol and cortisone and of their association within and between serum and saliva. *J Steroid Biochem Mol Biol*.
- Mickelson, K. E., G. B. Harding, M. Forsthoefel & U. Westphal (1982) Steroid-protein interactions. Human corticosteroid-binding globulin: characterization of dimer and electrophoretic variants. *Biochemistry*, 21, 654-60.
- Migeon, C. J. & A. B. Wisniewski (2001) Congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. Growth, development, and therapeutic considerations. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 30, 193-206.
- Miller, G. E., E. Chen & E. S. Zhou (2007) If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans. *Psychol Bull*, 133, 25-45.
- Minton, J. E. (1994) Function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the sympathetic nervous system in models of acute stress in domestic farm animals. *J Anim Sci*, 72, 1891-8.
- Montalvan, B. & M. Duclos (2008) Why glucocorticoids ought to be kept on the World Antidoping Agency's list of banned products. *Br J Sports Med*, 42, 946-7.
- Musa, B. U., R. P. Doe & U. S. Seal (1967) Serum protein alterations produced in women by synthetic estrogens. *J Clin Endocrinol Metab*, 27, 1463-9.
- Mußhoff, F. S., H.; Thieme, D.; Tourneur, D.; Madea, B. 2004. Haaranalytik - Eine Einführung. In *Haaranalytik*, ed. F. M. h. B. Madea, 1-16. Köln: Deutsche Ärzte Verlag GmbH.
- Mutschler, E. 2001. *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie : mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie : 349 Abbildungen, 272 Tabellen und 439 Formelbilder*. Wiss. Verlag-Ges.
- Neufeld, J. H., L. Breen & R. Hauger (1994) Extreme posture elevates corticosterone in a forced ambulation model of chronic stress in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 47, 233-40.
- Neumann, F. S., B.; Schleusener, H.; Schweikert, H.U. . 1992. Endokrinpharmakologie. In *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, ed. D. H. W. Forth, W. Rummel, K. Starke, 556-568. Mannheim: BI Wissenschaftsverlag.

- Nguyen, P. T., J. G. Lewis, J. Sneyd, R. S. Lee, D. J. Torpy & P. R. Shorten (2014) Development of a formula for estimating plasma free cortisol concentration from a measured total cortisol concentration when elastase-cleaved and intact corticosteroid binding globulin coexist. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 141, 16-25.
- Noppe, G., Y. B. de Rijke, K. Dorst, E. L. van den Akker & E. F. van Rossum (2015) LC-MS/MS-based method for long-term steroid profiling in human scalp hair. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 83, 162-6.
- Noppe, G., E. F. van Rossum, J. Vliegenthart, J. W. Koper & E. L. van den Akker (2014) Elevated hair cortisol concentrations in children with adrenal insufficiency on hydrocortisone replacement therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 81, 820-5.
- Nunes, M. L., S. Vattaut, J. B. Corcuff, A. Rault, H. Loiseau, B. Gatta, N. Valli, L. Letenneur & A. Tabarin (2009) Late-night salivary cortisol for diagnosis of overt and subclinical Cushing's syndrome in hospitalized and ambulatory patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 94, 456-62.
- O'Connor, P. J. & D. L. Corrigan (1987) Influence of short-term cycling on salivary cortisol levels. *Med Sci Sports Exerc*, 19, 224-8.
- Orchard, J. W. (2008) Why glucocorticoids should be removed from the World Antidoping Agency's list of banned products. *Br J Sports Med*, 42, 944-5.
- Papanicolaou, D. A., N. Mullen, I. Kyrou & L. K. Nieman (2002) Nighttime salivary cortisol: a useful test for the diagnosis of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 4515-21.
- Passelergue, P., A. Robert & G. Lac (1995) Salivary cortisol and testosterone variations during an official and a simulated weight-lifting competition. *Int J Sports Med*, 16, 298-303.
- Perogamvros, I., B. G. Keevil, D. W. Ray & P. J. Trainer (2010) Salivary cortisone is a potential biomarker for serum free cortisol. *J Clin Endocrinol Metab*, 95, 4951-8.
- Perogamvros, I., L. J. Owen, J. Newell-Price, D. W. Ray, P. J. Trainer & B. G. Keevil (2009) Simultaneous measurement of cortisol and cortisone in human saliva using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application in basal and stimulated conditions. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877, 3771-5.
- PIC. Pharmaceutical Inspection Conversion; Recommendations on: Validation Master Plan, Installation and Operational Qualification, Non-sterile Process Validation, Cleaning Validation 2007. <https://www.picscheme.org/layout/document.php?id=153> [13.12.2016].
- Pompa, G., F. Arioli, M. L. Fracchiolla, C. A. Rossi, A. L. Bassini, S. Stella & P. A. Biondi (2006) Neof ormation of boldenone and related steroids in faeces of veal calves. *Food Addit Contam*, 23, 126-32.
- Port, K. (1991) Serum and saliva cortisol responses and blood lactate accumulation during incremental exercise testing. *Int J Sports Med*, 12, 490-4.
- Pötsch, L. S., G. 2004. Inkorporation von Fremdstoffen in Haare. In *Haaranalytik*, ed. F. M. h. B. Madea, 31-98. Köln: Deutscher Ärzte Verlag GmbH.
- Pretorius, C. J., J. P. Galligan, B. C. McWhinney, S. E. Briscoe & J. P. Ungerer (2011) Free cortisol method comparison: ultrafiltration, equilibrium dialysis, tracer dilution, tandem mass spectrometry and calculated free cortisol. *Clin Chim Acta*, 412, 1043-7.

- Pruessner, J. C., O. T. Wolf, D. H. Hellhammer, A. Buske-Kirschbaum, K. von Auer, S. Jobst, F. Kaspers & C. Kirschbaum (1997) Free cortisol levels after awakening: a reliable biological marker for the assessment of adrenocortical activity. *Life Sci*, 61, 2539-49.
- Puccinelli, V. A., R. Caputo & B. Ceccarelli (1967) The structure of human hair follicle and hair shaft: an electron microscope study. *G Ital Dermatol Minerva Dermatol*, 108, 453-97.
- Putignano, P., P. Toja, A. Dubini, F. Pecori Giraldi, S. M. Corsello & F. Cavagnini (2003) Midnight salivary cortisol versus urinary free and midnight serum cortisol as screening tests for Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 4153-7.
- Quinete, N., J. Bertram, M. Reska, J. Lang & T. Kraus (2015) Highly selective and automated online SPE LC-MS3 method for determination of cortisol and cortisone in human hair as biomarker for stress related diseases. *Talanta*, 134, 310-6.
- Quinkler, M. & P. M. Stewart (2003) Hypertension and the cortisol-cortisone shuttle. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 2384-92.
- Randall, V. A. 2004. Androgens and hair. In *Testosterone: Action, Deficiency, Substitution*, ed. H. M. B. E. Nieschlag, 207-231. Cambridge University Press.
- Raul, J. S., V. Cirimele, B. Ludes & P. Kintz (2004) Detection of physiological concentrations of cortisol and cortisone in human hair. *Clin Biochem*, 37, 1105-11.
- Reisch, N. (2015) Substitution therapy in adult patients with congenital adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 29, 33-45.
- Riad-Fahmy, D., G. F. Read & R. F. Walker (1980) Salivary steroid assays for screening endocrine function. *Postgrad Med J*, 56 Suppl 1, 75-8.
- Robin, P., J. Predine & E. Milgrom (1978) Assay of unbound cortisol in plasma. *J Clin Endocrinol Metab*, 46, 277-83.
- Rose, J. Q., A. M. Yurchak & W. J. Jusko (1981) Dose dependent pharmacokinetics of prednisone and prednisolone in man. *J Pharmacokinetic Biopharm*, 9, 389-417.
- Rubinow, D. R., C. A. Roca, P. J. Schmidt, M. A. Danaceau, K. Putnam, G. Cizza, G. Chrousos & L. Nieman (2005) Testosterone suppression of CRH-stimulated cortisol in men. *Neuropsychopharmacology*, 30, 1906-12.
- Russell, E., C. Kirschbaum, M. L. Laudenslager, T. Stalder, Y. de Rijke, E. F. van Rossum, S. Van Uum & G. Koren (2015) Toward standardization of hair cortisol measurement: results of the first international interlaboratory round robin. *Ther Drug Monit*, 37, 71-5.
- Russell, E., G. Koren, M. Rieder & S. Van Uum (2012) Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology*, 37, 589-601.
- Russell, E., G. Koren, M. Rieder & S. H. Van Uum (2014) The detection of cortisol in human sweat: implications for measurement of cortisol in hair. *Ther Drug Monit*, 36, 30-4.
- Sachs, H. (1995) Theoretical limits of the evaluation of drug concentrations in hair due to irregular hair growth. *Forensic Sci Int*, 70, 53-61.
- Saitoh, M., M. Uzuka & M. Sakamoto (1970) Human hair cycle. *J Invest Dermatol*, 54, 65-81.
- Schedlowski, M., D. Wiechert, T. O. Wagner & U. Tewes (1992) Acute psychological stress increases plasma levels of cortisol, prolactin and TSH. *Life Sci*, 50, 1201-5.

- Scott, E. M., H. H. McGarrigle & G. C. Lachelin (1990) The increase in plasma and saliva cortisol levels in pregnancy is not due to the increase in corticosteroid-binding globulin levels. *J Clin Endocrinol Metab*, 71, 639-44.
- Semple, C. G., C. E. Gray, W. Borland, C. A. Espie & G. H. Beastall (1988) Endocrine effects of examination stress. *Clin Sci (Lond)*, 74, 255-9.
- Sgoifo Rossi, C. A., F. Arioli, A. Bassini, L. M. Chiesa, V. Dell'Orto, M. Montana & G. Pompa (2004) Evidence for false-positive results for boldenone testing of veal urine due to faecal cross-contamination during sampling. *Food Addit Contam*, 21, 756-62.
- Sharpley, C. F., J. R. McFarlane & A. Slominski (2012) Stress-linked cortisol concentrations in hair: what we know and what we need to know. *Rev Neurosci*, 23, 111-21.
- Short, K. R., J. Nygren, M. L. Bigelow & K. S. Nair (2004) Effect of short-term prednisone use on blood flow, muscle protein metabolism, and function. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 6198-207.
- Siegenthaler, W. 2006. *Klinische Pathophysiologie*. Stuttgart: Goerg Thieme Verlag.
- Siiteri, P. K., J. T. Murai, G. L. Hammond, J. A. Nisker, W. J. Raymoure & R. W. Kuhn (1982) The serum transport of steroid hormones. *Recent Prog Horm Res*, 38, 457-510.
- Silverthorn, D. U. 2009. *Physiologie*. München: Pearson Studium.
- Slominski, R., C. R. Rovnaghi & K. J. Anand (2015) Methodological Considerations for Hair Cortisol Measurements in Children. *Ther Drug Monit*, 37, 812-20.
- Smith, J. B., G. Nolan & W. Jubiz (1980) The relationship between unbound and total cortisol: its usefulness in detecting CBG abnormalities. *Clin Chim Acta*, 108, 435-45.
- Smith, R. E., J. A. Maguire, A. N. Stein-Oakley, H. Sasano, K. Takahashi, K. Fukushima & Z. S. Krozowski (1996) Localization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II in human epithelial tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, 81, 3244-8.
- Speiser, P. W., R. Azziz, L. S. Baskin, L. Ghizzoni, T. W. Hensle, D. P. Merke, H. F. Meyer-Bahlburg, W. L. Miller, V. M. Montori, S. E. Oberfield, M. Ritzen & P. C. White (2010) Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 95, 4133-60.
- Stalder, T. & C. Kirschbaum (2012) Analysis of cortisol in hair--state of the art and future directions. *Brain Behav Immun*, 26, 1019-29.
- Stalder, T., C. Kirschbaum, B. M. Kudielka, E. K. Adam, J. C. Pruessner, S. Wust, S. Dockray, N. Smyth, P. Evans, D. H. Hellhammer, R. Miller, M. A. Wetherell, S. J. Lupien & A. Clow (2016) Assessment of the cortisol awakening response: Expert consensus guidelines. *Psychoneuroendocrinology*, 63, 414-32.
- Staufenbiel, S. M., C. D. Andela, L. Manenschijn, A. M. Pereira, E. F. van Rossum & N. R. Biermasz (2015a) Increased Hair Cortisol Concentrations and BMI in Patients With Pituitary-Adrenal Disease on Hydrocortisone Replacement. *J Clin Endocrinol Metab*, 100, 2456-62.
- Staufenbiel, S. M., B. W. Penninx, Y. B. de Rijke, E. L. van den Akker & E. F. van Rossum (2015b) Determinants of hair cortisol and hair cortisone concentrations in adults. *Psychoneuroendocrinology*, 60, 182-94.

- Staufenbiel, S. M., B. W. Penninx, A. T. Spijker, B. M. Elzinga & E. F. van Rossum (2013) Hair cortisol, stress exposure, and mental health in humans: a systematic review. *Psychoneuroendocrinology*, 38, 1220-35.
- Stephens, M. A., P. B. Mahon, M. E. McCaul & G. S. Wand (2016) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to acute psychosocial stress: Effects of biological sex and circulating sex hormones. *Psychoneuroendocrinology*, 66, 47-55.
- Stryer, L. 1994. *Biochemie*. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Stupnicki, R. & Z. Obminski (1992) Glucocorticoid response to exercise as measured by serum and salivary cortisol. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 65, 546-9.
- Tahara, Y., K. Sakurai & T. Ando (2007) Influence of chewing and clenching on salivary cortisol levels as an indicator of stress. *J Prosthodont*, 16, 129-35.
- Tannin, G. M., A. K. Agarwal, C. Monder, M. I. New & P. C. White (1991) The human gene for 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization. *J Biol Chem*, 266, 16653-8.
- Tasaka, A., K. Takeuchi, H. Sasaki, T. Yoshii, R. Soeda, T. Ueda & K. Sakurai (2014) Influence of chewing time on salivary stress markers. *J Prosthodont Res*, 58, 48-54.
- Teeninga, N., Z. Guan, J. Freijer, A. F. Ruiters, M. T. Ackermans, J. E. Kist-van Holthe, T. van Gelder & J. Nauta (2013) Monitoring prednisolone and prednisone in saliva: a population pharmacokinetic approach in healthy volunteers. *Ther Drug Monit*, 35, 485-92.
- Thieme, D., C. Rautenberg, J. Grosse & M. Schoenfelder (2013) Significant increase of salivary testosterone levels after single therapeutic transdermal administration of testosterone: suitability as a potential screening parameter in doping control. *Drug Test Anal*, 5, 819-25.
- Thieme, D. & H. Sachs (2007) Examination of a long-term clozapine administration by high resolution segmental hair analysis. *Forensic Sci Int*, 166, 110-4.
- Thomson, S., G. Koren, L. A. Fraser, M. Rieder, T. C. Friedman & S. H. Van Uum (2010) Hair analysis provides a historical record of cortisol levels in Cushing's syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 118, 133-8.
- Tsigos, C. & G. P. Chrousos (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res*, 53, 865-71.
- Umeanuka, O. T., B. D. Saheeb, C. C. Uguru & F. N. Chukwuneke (2015) Evaluation of cortisol concentrations in saliva as a measure of stress in patients having routine dental extractions. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 53, 557-60.
- Umeda, T., R. Hiramatsu, T. Iwaoka, T. Shimada, F. Miura & T. Sato (1981) Use of saliva for monitoring unbound free cortisol levels in serum. *Clin Chim Acta*, 110, 245-53.
- Vammen, M. A., S. Mikkelsen, A. M. Hansen, M. B. Grynderup, J. H. Andersen, J. P. Bonde, H. N. Buttenschon, H. A. Kolstad, A. Kaergaard, L. Kaerlev, O. Mors, R. Rugulies & J. F. Thomsen (2014) Salivary cortisol and depression in public sector employees: cross-sectional and short term follow-up findings. *Psychoneuroendocrinology*, 41, 63-74.
- Van Scott, E. J., R. P. Reinertson & R. Steinmuller (1957) The growing hair roots of the human scalp and morphologic changes therein following amethopterin therapy. *J Invest Dermatol*, 29, 197-204.

- Van Uum, S. H., B. Sauve, L. A. Fraser, P. Morley-Forster, T. L. Paul & G. Koren (2008) Elevated content of cortisol in hair of patients with severe chronic pain: a novel biomarker for stress. *Stress*, 11, 483-8.
- Vaupel, P., E. Mutschler & H. G. Schaible. 2015. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. Wissenschaftliche.
- Vermeulen, A. (1956) Studies on the metabolism of prednisone. I. Isolation of prednisone, prednisolone, and delta 1-4 pregnadiene-3-11 dione-17alpha-20beta-21-triol from the urine of patients treated with prednisone. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 23, 113-9.
- Vermeulen, A. (1957) 17-Ketosteroids after prednisone and prednisolone. *Lancet*, 273, 79.
- Vermeulen, A. & E. Caspi (1958) The metabolism of prednisolone by homogenates of rat liver. *J Biol Chem*, 233, 54-6.
- Viau, V. (2002) Functional cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and -adrenal axes. *J Neuroendocrinol*, 14, 506-13.
- Vieira, J. G., O. H. Nakamura & V. M. Carvalho (2014) Determination of cortisol and cortisone in human saliva by a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 58, 844-50.
- Vining, R. F. & R. A. McGinley (1987) The measurement of hormones in saliva: possibilities and pitfalls. *J Steroid Biochem*, 27, 81-94.
- Vogeser, M. & J. Briegel (2007) Effect of temperature on protein binding of cortisol. *Clin Biochem*, 40, 724-7.
- Vogeser, M., P. Mohnle & J. Briegel (2007) Free serum cortisol: quantification applying equilibrium dialysis or ultrafiltration and an automated immunoassay system. *Clin Chem Lab Med*, 45, 521-5.
- Vogeser, M., R. Zachoval & K. Jacob (2001) Serum cortisol/cortisone ratio after Synacthen stimulation. *Clin Biochem*, 34, 421-5.
- WADA. Prohibited List 2016. <https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/prohibited-list> [30.05.2016].
- WADA. Technical Document 2015 MRPL. <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/td2015-mrpl> [30.05.2016].
- Walker, R. F., G. F. Read, I. A. Hughes & D. Riad-Fahmy (1979a) Radioimmunoassay of 17 alpha-hydroxyprogesterone in saliva, parotid fluid, and plasma of congenital adrenal hyperplasia patients. *Clin Chem*, 25, 542-5.
- Walker, R. F., G. F. Read & D. Riad-Fahmy (1979b) Radioimmunoassay of progesterone in saliva: application to the assessment of ovarian function. *Clin Chem*, 25, 2030-3.
- Wei, J., G. Sun, L. Zhao, X. Yang, X. Liu, D. Lin, T. Li & X. Ma (2015) Analysis of hair cortisol level in first-episodic and recurrent female patients with depression compared to healthy controls. *J Affect Disord*, 175, 299-302.
- Weitzman, E. D., D. Fukushima, C. Nogueira, H. Roffwarg, T. F. Gallagher & L. Hellman (1971) Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 33, 14-22.
- Wendel, L., Betterdorf. 2009. *Neugeborenen-Screening in Deutschland*. Friedrichsdorf: Milupa GmbH.



- Wester, V. L. & E. F. van Rossum (2015) Clinical applications of cortisol measurements in hair. *Eur J Endocrinol*, 173, M1-10.
- Westphal, U. 1986. *Steroid-Protein Interactions II*. Springer Berlin Heidelberg.
- Wilde, J. 1999. Steroide. In *Biochemical Pathways*, ed. G. Michal, 85-98. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Wong, J. A., W. B. Pickworth, A. J. Waters, M. al'Absi & A. M. Leventhal (2014) Cortisol levels decrease after acute tobacco abstinence in regular smokers. *Hum Psychopharmacol*, 29, 152-62.
- Wood, P. (2009) Salivary steroid assays - research or routine? *Ann Clin Biochem*, 46, 183-96.
- Yamada, J., B. Stevens, N. de Silva, S. Gibbins, J. Beyene, A. Taddio, C. Newman & G. Koren (2007) Hair cortisol as a potential biologic marker of chronic stress in hospitalized neonates. *Neonatology*, 92, 42-9.
- Yaneva, M., H. Mosnier-Pudar, M. A. Dugue, S. Grabar, Y. Fulla & X. Bertagna (2004) Midnight salivary cortisol for the initial diagnosis of Cushing's syndrome of various causes. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 3345-51.
- Zhang, J., J. Li, Y. Xu, J. Yang, Z. Chen & H. Deng (2013) Characteristics of novel hair-based biomarker for the activity assessment of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Clin Chim Acta*, 426, 25-32.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung B-1: Biosynthese der Steroidhormone ausgehend vom Cholesterin hin zu den Androgenen, Gluco- und Mineralocorticosteroide mit den dafür benötigten Enzymen (HSD: Hydroxysteroiddehydrogenase).....	5
Abbildung B-2: Schematische Darstellung des Haaraufbaus. (nach (Mußhoff 2004)).....	22
Abbildung B-3: schematische Darstellung des Lebenszyklus eines Haares mit Anagen-, Katagen- und Telogenphase (modifizierte Darstellung nach (Randall 2004)) .....	23
Abbildung B-4: Inkorporationsmechanismen: Die Einlagerung von Substanzen ins Haar kann über verschiedene Wege erfolgen. Die direkte Einlagerung aus dem Blut stellt für viele Substanzen die Hauptquelle der Inkorporation dar. Jedoch müssen auch die Einflüsse der Haut, der Drüsensekrete und von äußeren Kontaminationen beachtet werden. (modifizierte Darstellung nach (Henderson 1993)).....	24
Abbildung D-1: Verlauf der relativen Veränderungen der Konzentrationen und PPB nach einer einstündigen physischen Belastung .....	51
Abbildung D-2: Verlauf der relativen Veränderungen der Konzentrationen und PPB nach einer transdermalen Testosteronapplikation .....	52
Abbildung D-3: Verlauf der relativen Veränderungen der Konzentrationen und PPB nach einer einstündigen physischen Belastung und einer transdermalen Testosteronapplikation...	54
Abbildung D-4: Verlauf der relativen Veränderungen der Speichelkonzentrationen der Corticosteroide während der Studienexperimente .....	56
Abbildung D-5: Gegenüberstellung der relativen Veränderungen der GC-Konzentrationen der einzelnen Probenentnahmezeitpunkten. Die grün hinterlegten Bereiche signalisieren den Zeitraum der Testosteronapplikation (24 h ab t = 0 h) und die rot hinterlegten die Belastung via Fahrradergometer (1 h ab t = 5 h).....	57
Abbildung D-6: Schematische Darstellung der Enzymreaktionen der 11 $\beta$ -HSD.....	59
Abbildung D-7: Endogene GC-Konzentrationen: Die Konzentrationen am Morgen (schwarze Punkte) sind signifikant höher als die Abendkonzentrationen (weiße Punkte). .....	62

Abbildung D-8: Nachgewiesene Speichelkonzentrationen der GCs bei AGS-Patienten (schwarze Punkte: mit HC; weiße Punkte: mit PLN/PN) im Vergleich zu den Referenzkonzentrationsbereich der Kontrollprobanden (Linien).....64

Abbildung D-9: enzymatische Umwandlung der GCS PLN (I), F (II), PN (III), E (IV) durch die zwei Typen der 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD), die  $\Delta$ 1 Steroid-Dehydrogenase (SDH) und die „ $\Delta$ 1 Steroid-Hydrogenase“ (SH) .....67

Abbildung D-10: Korrelation der Speichelkonzentrationen von PLN und PN nach einer Medikation mit PLN (schwarze Punkte) und PN (weiße Punkte).....68

Abbildung D-11: Korrelation der Haarkonzentrationen der GCs. Dargestellt sind die Konzentrationspaare der einzelnen Haarsegmente sowie die Gleichungen zur Beschreibung des Referenzbereiches des proximalen Segments. Seg 1 = 0-3 cm; Seg 2 = 3-6 cm; Seg 3 = 6-9 cm .....72

Abbildung D-12: Verlauf der Corticosteroidkonzentrationen in den proximalen Segmenten. Die Konzentrationen steigen im Verlauf der Schwangerschaft stetig an, erreichen ihr Maximum in Probe 10 und fallen anschließend wieder ab. ....75

Abbildung D-13: Nachweisbare GC-Konzentrationen in Abhängigkeit vom Alter des untersuchten Haarsegments. An Hand der kontinuierlich abfallenden Konzentrationen mit zunehmenden Alter des Haarsegments ist der Auswascheffekt deutlich zu erkennen. Die Fehlerbalken zeigen mögliche Indifferenzen im Bezug auf das Haaralter, da die Wachstumsrate für diese Probandin nicht bestimmt wurde. Es wird von einem durchschnittlichen Wachstum von 1 cm/Monat (Spannweite: 0,8 - 1,5 cm/Monat) ausgegangen.....76

Abbildung D-14: Verlaufsprofile der freien und der gesamten Corticosteroidkonzentrationen im Plasma .....79

Abbildung D-15: Veränderung der E- und F-Konzentrationen in den morgendlichen Speichelproben (zwischen 07:00 Uhr und 08:00 Uhr) während der Schwangerschaft .....81

Abbildung D-16: Veränderung der GC-Tagesprofile im Speichel während/nach der Schwangerschaft.....82

Abbildung D-17: Veränderung der Haarkonzentrationen bedingt durch die chronische Stressbelastung während der Schwangerschaft.....84

Abbildung D-18: Verlauf der Cortisonkonzentrationen entlang der Haarsträhne der Proben H\_11, H\_12 und H\_13, welche 12 Wochen, 6 Monate und 13 Monate postpartum entnommen wurden.....85

## Tabellenverzeichnis

Tabelle B-1: Übersicht der wichtigsten endogenen Steroidhormone mit den dazugehörigen spezifischen Transportproteinen.....	10
Tabelle B-2: Literaturwerte: Referenzbereiche der Cortisolkonzentrationen im Blutplasma. Angabe der Gesamtkonzentration, des freien Anteils sowie dessen prozentualer Anteil. (w=weiblich; m=männlich, o.C.=ohne Kontrazeptiva) .....	14
Tabelle B-3: Literaturwerte: tageszeitlich abhängige Referenzkonzentrationen der endogenen Corticosteroide sowie deren Verhältnis zueinander .....	21
Tabelle B-4: Literaturwerte: Veränderung der Blutkonzentrationen von Cortisol im Verlauf einer Schwangerschaft.....	28
Tabelle B-5: Literaturwerte: Referenzdaten für die endogenen Haarkonzentrationen der GC Cortisol und Cortison im proximalem Haarsegment (n.u.: nicht untersucht).....	30
Tabelle C-1: Speichel-und Serumproben der Probanden während der vier o.a. Experimente (durchnummerierte Proben) mit den dazugehörigen Entnahmezeiten .....	35
Tabelle C-2: Zusammenstellung der gesammelten Haar-, Speichel- und Plasmaproben während und nach der Schwangerschaft der Probandin. Es ist das Datum und die Uhrzeit der Probenentnahme mit dem dazugehörigen Schwangerschaftsstatus aufgelistet.....	38
Tabelle C-3: Kalibrierungsproben zur quantitativen Bestimmung von F und E im Ultrafiltrat (UF) und Etherextrakt (EE).....	41
Tabelle C-4: Kalibrierungsproben für die Bestimmung der Steroidkonzentrationen im Speichel .....	42
Tabelle C-5: Übersicht zu den LC-MS/MS-Parametern der Zielanalyten. Bei den angegebenen MRM-Übergängen (Multiple-Reaction-Monitoring, Q1 zu Q3) dient der erste der Quantifizierung und der zweite der Identifizierung. ....	43
Tabelle C-6: Zusammenfassung der Validierungsparameter bzgl. der verwendeten Matrices und der Kalibrierungsbereiche für die GCs .....	44
Tabelle D-1: Parameter für die quantitative Bestimmung von Cortisol und Cortison im Haar, Speichel und Plasma (L = linear).....	45

Tabelle D-2: Gesamtkonzentrationen, freier Anteil und Analytverhältnis der GCs in Abhängigkeit von der Tageszeit. ....	47
Tabelle D-3: durchschnittliche PPB der GCs in Abhängigkeit von der Tageszeit .....	48
Tabelle D-4: Spearman-Korrelation ( $\rho$ ) und dazugehörige Signifikanzlevels (P) der absoluten Hormonkonzentrationen zwischen Plasma (frei und gesamten) und Speichel.....	58
Tabelle D-5: GC-Konzentrationen im Speichel: Für beide GCs wurde der zirkadiane Rhythmus mit hohen Konzentrationen am Morgen und geringen Konzentrationen am Abend nachgewiesen. Die Konzentrationen zeigen dabei keine Geschlechtsabhängigkeit.....	61
Tabelle D-6: Speichelkonzentrationen der endogenen Corticosteroide sowie deren Verhältnis zueinander, wenn Hydrocortison als Medikament eingenommen wird.....	64
Tabelle D-7: Übersicht der nachgewiesenen Speichelkonzentrationen der synthetischen Corticosteroide. $n_{\text{Pat}}$ =Anzahl Patienten; $n_{\text{P}}$ =Anzahl Proben; $n_{\text{pP}}$ =Anzahl positiver Proben.....	68
Tabelle D-8 GC-Konzentrationen der proximalen Haarsegmente .....	70
Tabelle D-9: Cortisol- und Cortisonkonzentrationen der einzelnen Haarsegmente (je 2 cm) der Proben, welche während der Schwangerschaft genommen wurden. Die Konzentrationen nehmen entlang des Haarschaftes ab, im Fortlauf der Schwangerschaft jedoch zu. ....	73
Tabelle D-10: Zusammenstellung der Gesamtkonzentrationen (cg) der Corticosteroide, deren freien Anteile (cf) und PPB und des Analytverhältnisses der analysierten Plasmaproben.....	78
Tabelle D-11: Corticosteroidkonzentrationen in den Speichelproben.....	80
Tabelle D-12: Corticosteroidkonzentrationen der proximalen Haarsegmente .....	83

## Formelverzeichnis

Formel B-1: COOLENS Gleichung zur Berechnung der nicht proteingebundenen Cortisolanteile im Blutplasma aus der Gesamtkonzentrationen und der CBG-Konzentration. .....	12
Formel B-2: Gleichung zur Bestimmung des theoretischen Speichel/Plasma-Quotienten, welcher den Übergang von Substanzen aus den Plasma in den Speichel charakterisiert.....	16
Formel D-1: Beschreibung der Korrelationen der GCS und der Matrizes untereinander .....	47
Formel D-2: Gleichung zur Berechnung der Plasmaproteinbindung der Corticosteroide.....	48
Formel D-3: Bestimmung der relativen Veränderungen der Experimentdaten zu den Basalwerten .....	49
Formel D-4: Korrelation der Speichelkonzentrationen von Cortisol und Cortison. ....	62
Formel D-5: Korrelation der Haarkonzentrationen von Cortisol und Cortison.....	70

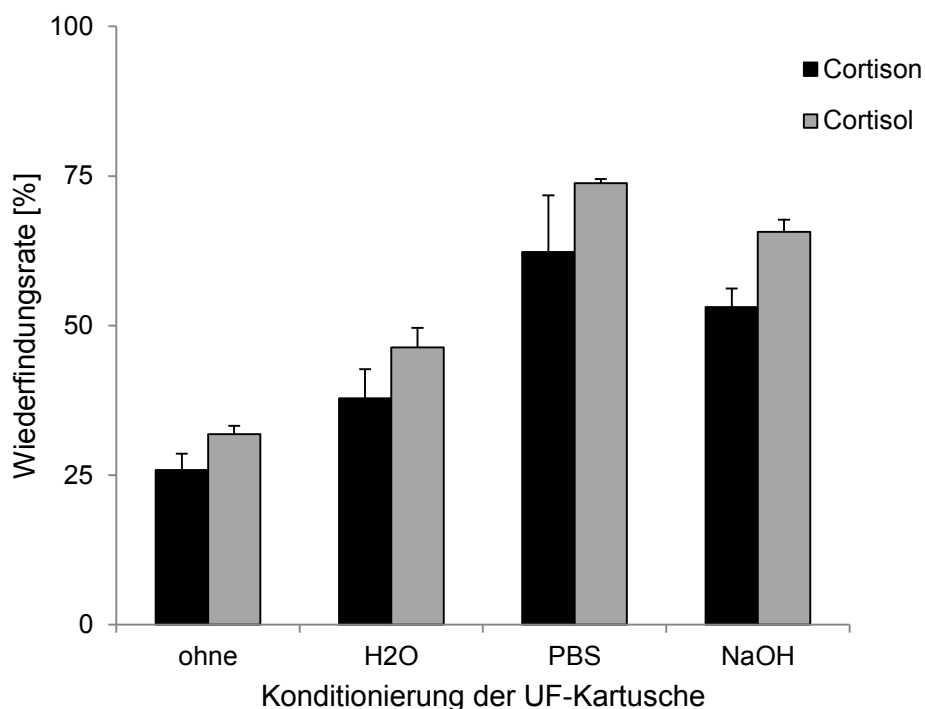
## Anhang

### Anhang 1: Anpassung der Ultrafiltration

Für die Optimierung der Ultrafiltration wurden, wenn nicht anders angegeben, matrixlose Proben verwendet. Dabei lagen die GCs Cortisol und Cortison, entsprechend der zu erwartenden Konzentration, mit 5 ng/ml und 20 ng/ml in phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) vor. Während der folgenden Optimierungsschritte wurden Ultrafiltrationskartuschen mit einem Größenausschluss von 30 kDa (Amicon® Ultra-0,5, MerckMillipore, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

#### - Prekonditionierung der Filter

Nach Herstellerangaben könne das Plasma direkt auf die Ultrafiltrationskartuschen aufgetragen werden. Eine vorherige Konditionierung könne jedoch die Ergebnisse positiv bzgl. der Wiederfindungsraten beeinflussen. (Merckmillipore 21.06.2016) Um diesen Einfluss zu überprüfen, wurden drei verschiedene Konditionierungsschritte durchgeführt. Getestet wurden die Verwendung von Reinstwasser (0,5 ml), von PBS (0,5 ml) und einer Abfolge von Reinstwasser (0,5 ml) - Natronlauge (0,1 N; 0,5 ml) - Reinstwasser (0,5 ml). Vergleichend dazu wurde eine Ultrafiltration ohne vorherige Konditionierung durchgeführt. Die Prekonditionierung erfolgte, ebenso wie die Ultrafiltration, bei 37 °C und 6500 rpm für 15 min.

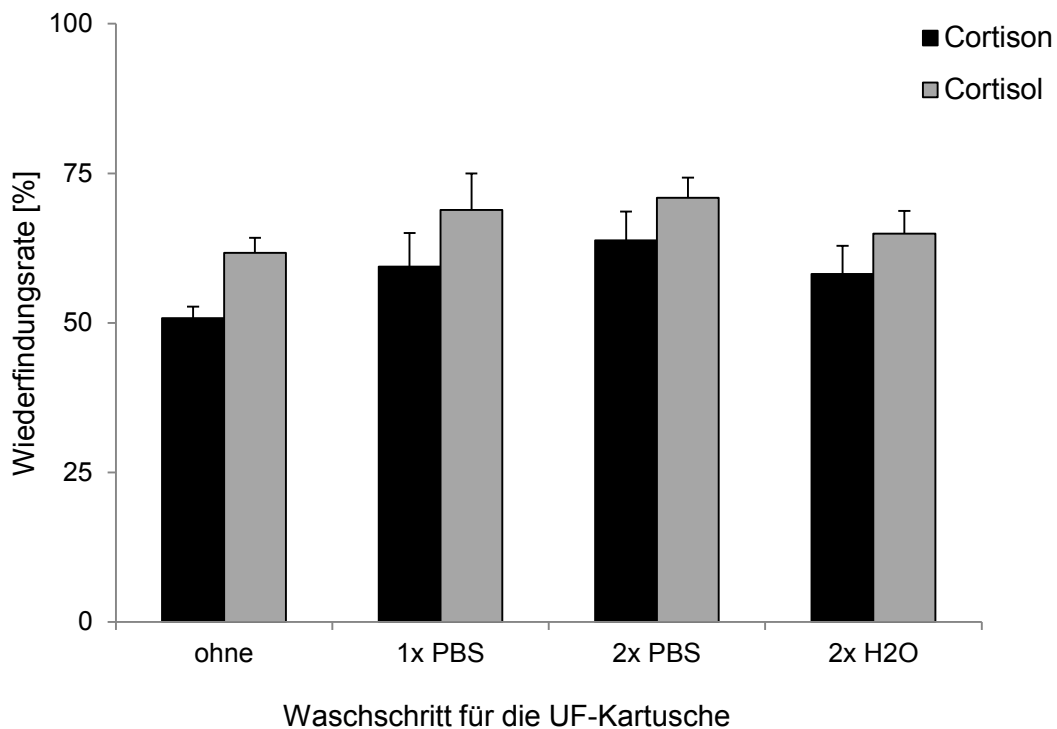




Anhand des oben dargestellten Diagrammes kann gezeigt werden, dass die höchsten Wiederfindungsraten der GCs nach einer Prekonditionierung der UF-Kartusche mit PBS erzielt wurde. Die Prekonditionierung führt zu einer Benetzung des Filtermaterials wodurch weniger Analyten zurückgehalten und höhere Nachweisraten erzielt werden.

- Waschen des Rückstandes

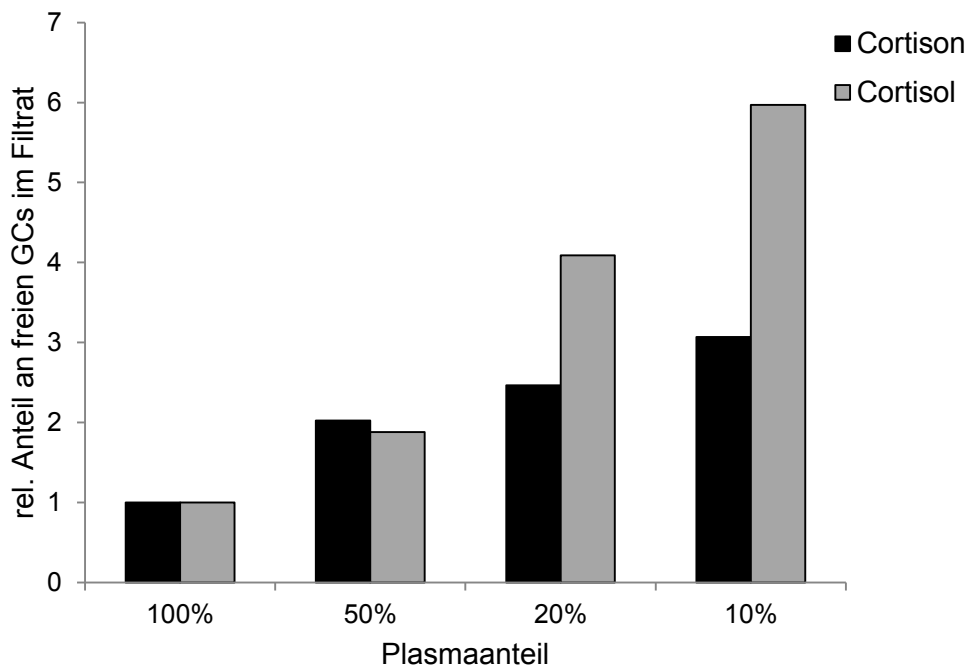
Ebenso könne sich ein Waschen des Redundanten positiv auswirken. (Merckmillipore 21.06.2016) Dafür wurden unterschiedliche Waschschrte des Rückstands im Filter nach erfolgter Ultrafiltration getestet. Zum einen wurde 1x bzw. 2x mit PBS (0,5 ml) gewaschen, zum anderen wurde Reinstwasser (je 0,5 ml) dafür verwendet.



Wird nach der Ultrafiltration ein Waschschrift der „beladenen“ UF-Kartusche durchgeführt, so werden höhere Wiederfindungsraten für die GCs erzielt. Dies zeigt, dass Analyten aus dem Filtermaterial gewaschen werden. Da es bei Plasmaproben durch den Waschschrift jedoch zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen proteingebundenen und freien Analyten kommt, ist davon auszugehen, dass die erhöhten Konzentrationen nicht nur aus dem Spülvorgang des Filtermaterial resultieren, sondern auch Analyten aus der PPB verdrängt werden. Somit wird der Waschschrift für die Aufarbeitung der Realproben nicht durchgeführt.

*- Verdünnen des Plasmas*

Für diesen Versuch wurde eine Real-Plasmaprobe (je 500 µl; männlich, 53 Jahre) 1:1, 1:5 und 1:10 mit PBS verdünnt. Weiterhin wurde die unverdünnte Probe sowie reines PBS als Negativprobe aufgearbeitet. Die Ultrafiltration von je 500µl erfolgte nach vorheriger Konditionierung (0,5 ml PBS, 37°C, 15 min, 6500 rpm) mit einem 30 kDa-Filtersystem bei 37 °C und 6500 rpm für 40 Minuten.



Mit zunehmender Verdünnungsrate des Plasmas steigt der nachweisbare Anteil an freien, nicht-proteingebundenen GCs an. Dies zeigt, dass es zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen gebundenen und freien GCs kommt und die GCs aus ihren Plasmaproteinbindungen freigesetzt werden. Da dies die Ergebnisse bzgl. der Bestimmung der PPB verfälscht, wird das Plasma im Folgenden unverdünnt auf die Filtrationskartuschen aufgetragen.

**Anhang 2: nachgewiesene absolute Hormonkonzentrationen in den einzelnen Untersuchungsmedien und die daraus berechneten Analytverhältnisse sowie die Plasmaproteinbindungen, angegeben als Mediane mit Spannweite.**

<b>A) freies Cortison im Plasma (ng/ml)</b>							
<i>Zeit/Dauer</i>	<i>8 Uhr/0h</i>	<i>11 Uhr/3h</i>	<i>14 Uhr/6h</i>	<i>17 Uhr/9h</i>	<i>8 Uhr/24h</i>	<i>8 Uhr/48h</i>	<i>8 Uhr/72h</i>
<i>obot</i>	5,1 (2,3-9,9)	3,9 (2,2-5,2)	3,5 (2,2-4,5)	3,1 (1,1-4,6)			
<i>mbot</i>	4,6 (1,8-8,7)	3,2 (1,3-5,5)	3,9 (2,2-7,4)	2,3 (1,1-4,6)	4,9 (2,2-8,7)	4,9 (1,9-7,1)	4,3 (3,0-7,6)
<i>obmt</i>	4,3 (2,8-11,5)	2,8 (1,7-4,6)	2,4 (1,1-4,9)	2,5 (0,9-5,0)	4,7 (1,6-8,1)	3,5 (2,6-5,9)	4,5 (2,2-11,8)
<i>mbmt</i>	3,8 (1,7-7,5)	2,8 (1,3-5,1)	4,9 (1,5-7,2)	1,6 (1,1-4,7)	3,3 (2,3-7,3)	5,7 (2,5-12,2)	4,3 (2,0-7,3)

<b>B) freies Cortisol im Plasma (ng/ml)</b>							
<i>Zeit/Dauer</i>	<i>8 Uhr/0h</i>	<i>11 Uhr/3h</i>	<i>14 Uhr/6h</i>	<i>17 Uhr/9h</i>	<i>8 Uhr/24h</i>	<i>8 Uhr/48h</i>	<i>8 Uhr/72h</i>
<i>obot</i>	7,5 (1,8-18,1)	3,0 (1,5-5,6)	2,3 (1,5-4,2)	1,9 (0,7-4,0)			
<i>mbot</i>	6,9 (1,1-15,3)	1,9 (0,5-4,1)	5,0 (1,5-12,3)	1,7 (0,5-4,5)	5,5 (0,9-12,7)	6,3 (1,2-11,3)	5,9 (1,6-14,0)
<i>obmt</i>	4,8 (2,2-10,4)	1,6 (0,8-5,7)	1,5 (0,5-3,4)	1,5 (0,4-3,5)	5,4 (1,3-13,4)	5,7 (1,4-12,5)	5,3 (1,2-8,9)
<i>mbmt</i>	4,4 (1,3-9,0)	1,7 (0,4-7,5)	4,6 (0,5-13,7)	1,0 (0,4-2,9)	6,3 (1,6-11,2)	5,5 (1,2-13,2)	4,8 (1,8-13,5)

<b>C) berechnetes Analytverhältnis Cortisol/Cortison der freien Anteile</b>							
<i>Zeit/Dauer</i>	<i>8 Uhr/0h</i>	<i>11 Uhr/3h</i>	<i>14 Uhr/6h</i>	<i>17 Uhr/9h</i>	<i>8 Uhr/24h</i>	<i>8 Uhr/48h</i>	<i>8 Uhr/72h</i>
<i>obot</i>	1,6 (0,6-2,3)	0,7 (0,5-1,4)	0,7 (0,5-1,1)	0,7 (0,5-0,9)			
<i>mbot</i>	1,8 (0,6-2,2)	0,6 (0,4-1,0)	1,1 (0,5-1,9)	0,7 (0,4-1,3)	1,1 (0,4-2,1)	1,3 (0,6-1,9)	1,2 (0,5-2,1)
<i>obmt</i>	0,9 (0,7-2,0)	0,6 (0,4-2,1)	0,5 (0,4-1,0)	0,6 (0,4-1,8)	1,2 (0,7-1,9)	1,2 (0,5-3,5)	1,2 (0,5-1,5)
<i>mbmt</i>	1,1 (0,6-2,1)	0,6 (0,3-1,6)	1,0 (0,3-1,,9)	0,5 (0,3-0,9)	1,3 (0,7-2,4)	1,0 (0,4-2,2)	1,1 (0,7-2,0)

Fortsetzung Anhang 2

<b>D) gesamtes Cortison im Plasma (ng/ml)</b>							
<i>Zeit/Dauer</i>	<i>8 Uhr/0h</i>	<i>11 Uhr/3h</i>	<i>14 Uhr/6h</i>	<i>17 Uhr/9h</i>	<i>8 Uhr/24h</i>	<i>8 Uhr/48h</i>	<i>8 Uhr/72h</i>
<i>obot</i>	20,4 (17,9-56,6)	23,3 (12,5-39,1)	22,6 (18,3-31,1)	18,1 (13,2-45,8)			
<i>mbot</i>	22,6 (17,5-76,6)	21,1 (16,4-49,7)	23,6 (20,3-58,8)	20,5 (13,5-47,8)	32,1 (16,5-63,6)	27,2 (20,7-69,8)	26,6 (19,1-59,5)
<i>obmt</i>	24,2 (13,8-75,1)	29,0 (20,7-36,4)	23,2 (10,0-54,3)	17,1 (11,0-29,3)	25,7 (13,5-63,1)	25,0 (19,0-69,5)	25,9 (19,1-96,0)
<i>mbmt</i>	26,2 (18,9-69,3)	30,7 (17,4-44,1)	27,4 (21,5-47,3)	18,0 (13,7-68,0)	27,8 (19,7-61,4)	30,4 (25,1-81,8)	28,0 (20,8-64,4)

<b>E) gesamtes Cortisol im Plasma (ng/ml)</b>							
<i>Zeit/Dauer</i>	<i>8 Uhr/0h</i>	<i>11 Uhr/3h</i>	<i>14 Uhr/6h</i>	<i>17 Uhr/9h</i>	<i>8 Uhr/24h</i>	<i>8 Uhr/48h</i>	<i>8 Uhr/72h</i>
<i>obot</i>	96,0 (62,0-344,0)	60,5 (44,7-134,5)	71,5 (51,1-132,0)	54,9 (32,5-169,0)			
<i>mbot</i>	128,7 (64,8-285,8)	70,4 (49,5-133,2)	118,6 (61,4-207,8)	63,5 (34,3-117,9)	142,8 (73,5-312,5)	119,2 (80,1-298,3)	126,2 (65,9-367,6)
<i>obmt</i>	95,4 (67,4-286,6)	70,9 (60,5-153,1)	55,3 (32,7-158,5)	55,0 (32,8-83,8)	134,4 (50,6-249,5)	130,2 (48,8-379,3)	127,9 (64,3-330,1)
<i>mbmt</i>	115,1 (65,9-212,4)	68,6 (40,4-125,6)	106,5 (38,3-251,9)	50,2 (34,2-217,9)	109,1 (87,2-256,3)	120,8 (71,4-279,1)	139,8 (76,7-244,4)

<b>F) berechnetes Analytverhältnis Cortisol/Cortison der gesamten Anteile</b>							
<i>Zeit/Dauer</i>	<i>8 Uhr/0h</i>	<i>11 Uhr/3h</i>	<i>14 Uhr/6h</i>	<i>17 Uhr/9h</i>	<i>8 Uhr/24h</i>	<i>8 Uhr/48h</i>	<i>8 Uhr/72h</i>
<i>obot</i>	5,0 (2,3-6,9)	3,4 (2,1-3,6)	3,0 (2,3-5,3)	3,1 (2,2-4,1)			
<i>mbot</i>	5,3 (3,0-8,3)	3,2 (2,3-4,2)	4,6 (3,0-5,7)	2,5 (1,9-3,9)	5,4 (2,5-6,7)	4,3 (3,3-6,1)	5,2 (2,6-6,3)
<i>obmt</i>	4,5 (3,1-6,5)	2,8 (2,1-5,3)	2,9 (1,9-3,3)	2,8 (2,0-5,3)	4,6 (3,0-6,1)	5,2 (2,2-5,8)	4,0 (3,4-5,5)
<i>mbmt</i>	4,0 (2,8-9,0)	2,3 (2,0-4,4)	4,2 (1,8-5,3)	2,8 (1,8-3,4)	4,2 (3,2-6,5)	4,5 (2,4-6,1)	4,0 (2,7-6,3)

<b>G) berechnete Plasmaproteinbindung für Cortison</b>							
<i>Zeit/Dauer</i>	<i>8 Uhr/0h</i>	<i>11 Uhr/3h</i>	<i>14 Uhr/6h</i>	<i>17 Uhr/9h</i>	<i>8 Uhr/24h</i>	<i>8 Uhr/48h</i>	<i>8 Uhr/72h</i>
<i>obot</i>	75,4 (55,9-87,1)	84,1 (72,7-90,5)	85,2 (75,6-92,6)	84,2 (71,6-95,9)			
<i>mbot</i>	84,2 (62,2-92,9)	88,7 (73,9-94,1)	81,3 (71,8-93,5)	90,0 (73,8-96,2)	83,8 (64,0-95,4)	86,7 (73,1-93,0)	85,0 (71,1-87,8)
<i>obmt</i>	84,4 (71,2-89,4)	90,9 (85,1-94,1)	88,7 (78,9-95,1)	87,4 (78,8-94,3)	82,4 (67,6-93,8)	86,1 (71,2-95,9)	86,3 (78,6-92,7)
<i>mbmt</i>	85,2 (76,3-94,3)	90,4 (83,1-94,8)	82,1 (76,5-93,2)	91,6 (84,3-93,1)	89,7 (71,8-92,2)	85,1 (75,7-91,9)	86,7 (70,2-92,8)

Fortsetzung Anhang 2

<b>H) berechnete Plasmaproteinbindung für Cortisol</b>							
<i>Zeit/Dauer</i>	<i>8 Uhr/0h</i>	<i>11 Uhr/3h</i>	<i>14 Uhr/6h</i>	<i>17 Uhr/9h</i>	<i>8 Uhr/24h</i>	<i>8 Uhr/48h</i>	<i>8 Uhr/72h</i>
<i>obot</i>	93,7 (85,7-97,4)	95,2 (89,5-98,1)	96,2 (93,9-98,7)	97,0 (94,1-99,1)			
<i>mbot</i>	96,1 (87,6-98,3)	98,3 (94,1-98,9)	95,0 (89,7-98,9)	97,4 (91,4-99,1)	96,3 (86,7-99,4)	96,3 (89,1-98,8)	96,5 (89,7-97,6)
<i>obmt</i>	96,4 (90,7-97,9)	97,6 (96,3-98,9)	97,5 (94,2-99,1)	97,4 (95,8-98,8)	95,7 (88,6-98,9)	95,8 (89,1-98,7)	96,9 (93,8-98,9)
<i>mbmt</i>	96,3 (93,1-98,1)	98,1 (94,1-99,0)	95,6 (90,7-98,8)	98,5 (96,2-99,1)	96,4 (90,8-98,2)	96,5 (92,4-98,5)	96,2 (09,4-98,3)

<b>I) Cortison im Speichel (ng/ml)</b>							
<i>Zeit/Dauer</i>	<i>8 Uhr/0h</i>	<i>11 Uhr/3h</i>	<i>14 Uhr/6h</i>	<i>17 Uhr/9h</i>	<i>8 Uhr/24h</i>	<i>8 Uhr/48h</i>	<i>8 Uhr/72h</i>
<i>obot</i>	5,63 (3,31-10,4)	5,21 (2,49-7,69)	3,24 (2,07-6,44)	2,94 (1,4-5,55)			
<i>mbot</i>	7,34 (5,0-14,9)	5,12 (2,48-9,13)	7,05 (2,92-14,8)	3,46 (0,98-6,0)	6,58 (3,0-16,8)	6,52 (3,43-16,5)	7,87 (2,74-20,2)
<i>obmt</i>	6,23 (3,6-19,3)	4,55 (1,78-7,4)	3,88 (0,9-8,13)	3,3 (1,8-7,0)	7,42 (3,88-16,6)	6,37 (2,86-14,1)	6,8 (3,5-11,2)
<i>mbmt</i>	7,07 (0,6-11,0)	3,56 (1,9-13,9)	7,25 (2,43-14,0)	2,01 (1,55-7,47)	6,9 (4,1-14,4)	7,34 (4,84-9,9)	6,7 (3,0-12,3)

<b>J) Cortisol im Speichel (ng/ml)</b>							
<i>Zeit/Dauer</i>	<i>8 Uhr/0h</i>	<i>11 Uhr/3h</i>	<i>14 Uhr/6h</i>	<i>17 Uhr/9h</i>	<i>8 Uhr/24h</i>	<i>8 Uhr/48h</i>	<i>8 Uhr/72h</i>
<i>obot</i>	1,3 (0,55-2,70)	0,61 (0,36-1,03)	0,55 (0,20-1,10)	0,38 (0,15-0,59)			
<i>mbot</i>	1,58 (0,73-3,3)	0,63 (0,31-1,36)	1,23 (0,39-2,30)	0,42 (0,15-0,89)	1,64 (0,5-3,88)	1,39 (0,83-3,46)	1,24 (0,69-4,59)
<i>obmt</i>	1,1 (0,93-4,18)	0,5 (0,28-1,01)	0,47 (0,22-0,74)	0,43 (0,21-0,76)	1,6 (1,00-3,80)	1,47 (0,49-2,84)	1,71 (0,74-2,26)
<i>mbmt</i>	1,45 (0,80-2,09)	0,48 (0,20-2,37)	1,63 (0,26-3,54)	0,35 (0,20-0,78)	1,26 (0,83-2,62)	1,31 (0,74-1,78)	1,57 (0,63-2,15)

<b>K) berechnetes Analytverhältnis Cortisol/Cortison im Speichel</b>							
<i>Zeit/Dauer</i>	<i>8 Uhr/0h</i>	<i>11 Uhr/3h</i>	<i>14 Uhr/6h</i>	<i>17 Uhr/9h</i>	<i>8 Uhr/24h</i>	<i>8 Uhr/48h</i>	<i>8 Uhr/72h</i>
<i>obot</i>	0,24 (0,1-0,4)	0,12 (0,1-0,2)	0,13 (0,1-0,3)	0,11 (0,1-0,2)			
<i>mbot</i>	0,20 (0,1-0,3)	0,13 (0,1-0,3)	0,15 (0,1-0,3)	0,09 (0,1-0,9)	0,23 (0,1-0,4)	0,21 (0,1-0,4)	0,25 (0,1-0,3)
<i>obmt</i>	0,24 (0,1-0,3)	0,15 (0,1-0,2)	0,10 (0,1-0,3)	0,11 (0,1-0,3)	0,23 (0,2-0,4)	0,20 (0,1-0,6)	0,19 (0,1-0,4)
<i>mbmt</i>	0,27 (0,1-2,5)	0,14 (0,1-0,2)	0,21 (0,1-0,3)	0,12 (0,1-0,3)	0,19 (0,1-0,3)	0,18 (0,1-0,3)	0,18 (0,1-0,3)

**Anhang 3: Spearman-Korrelation der Basalkonzentrationen der Plamsaprogen**

		<b>E_EE</b>	<b>E_UF</b>	<b>F_EE</b>	<b>F_UF</b>
<b>E_EE</b>	rho	1	0,362	0,640	0,342
	p-Wert		0,030	0,000	0,041
<b>E_UF</b>	rho	0,362	1	0,405	0,847
	p-Wert	0,030		0,014	0,000
<b>F_EE</b>	rho	0,640	0,405	1	0,494
	p-Wert	0,000	0,014		0,002
<b>F_UF</b>	rho	0,342	0,847	0,494	1
	p-Wert	0,041	0,000	0,002	

**Anhang 4: GC-konzentrationen der Speicheltagesprofile der Schwangerschaftsstudie zur Korrelation von PPB, Speichel, Haar**

Entnahme	Probe	Uhrzeit	F [ng/ml]	E [ng/ml]	F/E
SSW 16+0 27.02.2014	Erwachen (A)	05:50			
	A +30 min	06:20	4,01	10,2	0,39
	A+60 min	06:45	2,31	8,45	0,27
	A+120 min	07:40	1,83	6,46	0,28
	A+360 min	09:20	1,38	2,30	0,60
	ca. 12 Uhr	12:40	0,70	1,98	0,34
	ca. 15 Uhr	14:40	0,38	3,27	0,12
	ca. 18 Uhr	17:45	0,15	1,11	0,14
	ca. 22 Uhr	21:40	0,22	0,70	0,31
SSW 22+6 16.04.2014	Erwachen (A)	05:45			
	A +30 min	06:10	5,98	14,9	0,40
	A+60 min	07:00	3,74	12,1	0,31
	A+120 min	07:50	1,98	8,97	0,22
	A+360 min	09:20	1,40	7,00	0,20
	ca.. 12 Uhr	12:45	0,66	3,43	0,19
	ca. 15 Uhr	15:30	0,50	3,63	0,14
	ca. 18 Uhr	18:35	0,20	2,83	0,07
	ca. 22 Uhr	21:40	0,25	1,66	0,15
SSW 28+6 28.05.2014	Erwachen (A)	05:55			
	A +30 min	06:20	6,54	16,80	0,39
	A+60 min	06:50	6,31	15,60	0,40
	A+120 min	07:40	3,50	10,20	0,34
	A+360 min	09:10	1,00	3,14	0,32
	ca. 12 Uhr	12:50	1,25	5,12	0,24
	ca. 15 Uhr	14:50	0,43	2,70	0,16
	ca. 18 Uhr	17:10	0,59	3,10	0,19
	ca. 22 Uhr	22:10	0,35	2,31	0,15
SSW 33+0 26.06.2014	Erwachen (A)	05:15			
	A +30 min	05:40	7,67	21,30	0,36
	A+60 min	06:35	4,79	13,78	0,35
	A+120 min	07:40	3,61	11,79	0,31
	A+360 min	08:50	2,23	10,30	0,22
	ca. 12 Uhr	12:50	1,03	5,29	0,19
	ca. 15 Uhr	15:40	0,81	4,63	0,17
	ca. 18 Uhr	18:40	0,36	2,52	0,14
	ca. 22 Uhr	21:50	0,63	3,64	0,17

Fortsetzung Anhang 4

<b>Entnahme</b>	<b>Probe</b>	<b>Uhrzeit</b>	<b>F [ng/ml]</b>	<b>E [ng/ml]</b>	<b>F/E</b>
13 Mpp	Erwachen (A)	05:55			
20.10.2015	A +30 min	06:30	3,82	14,2	0,27
	A+60 min	06:50	3,27	12,6	0,26
	A+120 min	07:50	2,96	8,41	0,35
	A+360 min	09:10	1,46	7,38	0,20
	ca. 12 Uhr	11:50	0,46	3,55	0,13
	ca. 15 Uhr	15:00	0,69	4,00	0,17
	ca. 18 Uhr	18:30	0,38	2,58	0,15
	ca. 22 Uhr	22:30	0,29	1,63	0,18



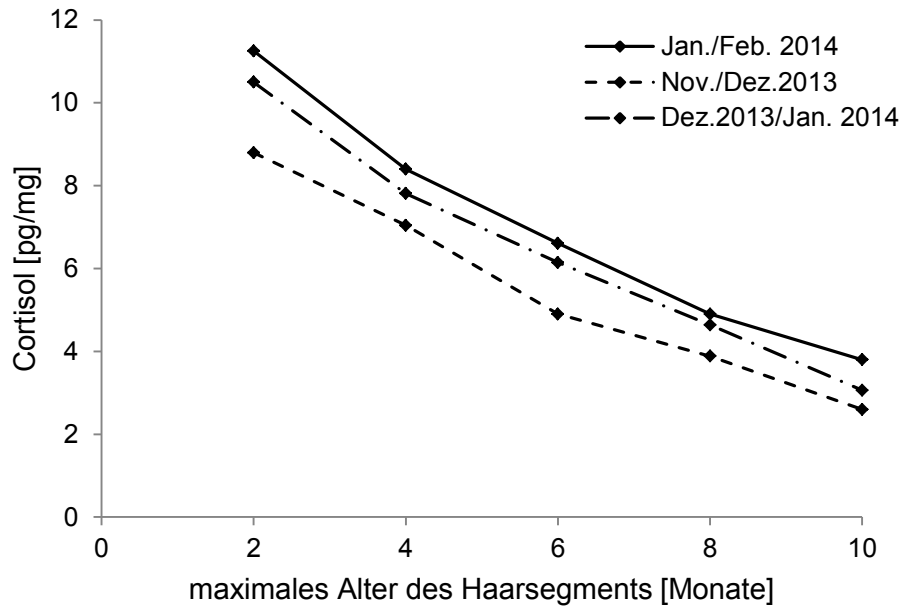
**Anhang 5: Haarkonzentrationen der Corticosteroide in den analysierten Segmenten der Schwangerschaftsstudie zur Korrelation von PPB, Speichel, Haar**

Probe	Entnahme	Segment	Wachstumszeit	Einwaage [mg]	Cortisol [pg/mg]	Cortison [pg/mg]
0	15.09.2013	1	08.-09.2013	50,7	< LOD	8,5
		2	06.-07.2013	50,4	< LOD	7,3
		3	04.-05.2013	61,9	< LOD	4,7
		4	02.-03.2013	64,3	< LOD	2,9
		5	12.2012-01.2013	48,2	< LOD	< LOD
1	SSW 7+4 30.12.2013	1	11.-12.2013	52,7	1,6	8,8
		2	09.-10.2013	50,3	< LOD	6,3
		3	07.-08.2013	51,1	< LOD	3,3
		4	05.-06.2013	51,6	< LOD	2,3
		5	03.-04. 2013	50,3	< LOD	< LOD
2	SSW 12+0 30.01.2014	1	12.2013-01.2014	51,9	1,8	10,5
		2	10.-11.2013	49,8	< LOD	7,1
		3	08.-09.2013	50,5	< LOD	5,6
		4	06.-07.2013	51,3	< LOD	3,0
		5	04.-05.2013	51,4	< LOD	< LOD
3	SSW 16+5 04.03.2014	1	01.-02.2014	50,2	1,9	11,3
		2	11.-12.2013	50,7	< LOD	7,0
		3	09.-10.2013	50,4	< LOD	4,1
		4	07.-08.2013	51,0	< LOD	2,7
		5	05.-06.2013	50,4	< LOD	< LOD
4	SSW 20+1 28.03.2014	1	02.-03.2014	51,5	2	11,7
		2	12.2013-01.2014	51,4	1,6	7,8
		3	10.-11.2013	50,7	< LOD	5,1
		4	08.-09.2013	50,5	< LOD	3,2
		5	06.-07.2013	50,8	< LOD	2,4
5	SSW 24+1 25.04.2014	1	03.-04.2014	51,8	2,1	12,9
		2	01.-02.2014	53,4	1,6	8,4
		3	11.-12.2013	49,8	< LOD	4,9
		4	09.-10.2013	51,6	< LOD	3,2
		5	07.-08.2013	50,7	< LOD	2,1
6	29+5 SSW 03.06.2014	1	04.-05.2014	50,6	2,2	13,8
		2	02.-03.2014	49,9	1,8	9,5
		3	12.2013-01.2014	50,6	1,6	6,1
		4	10.-11.2013	49,7	< LOD	3,9
		5	08.-09.2013	49,6	< LOD	2,7

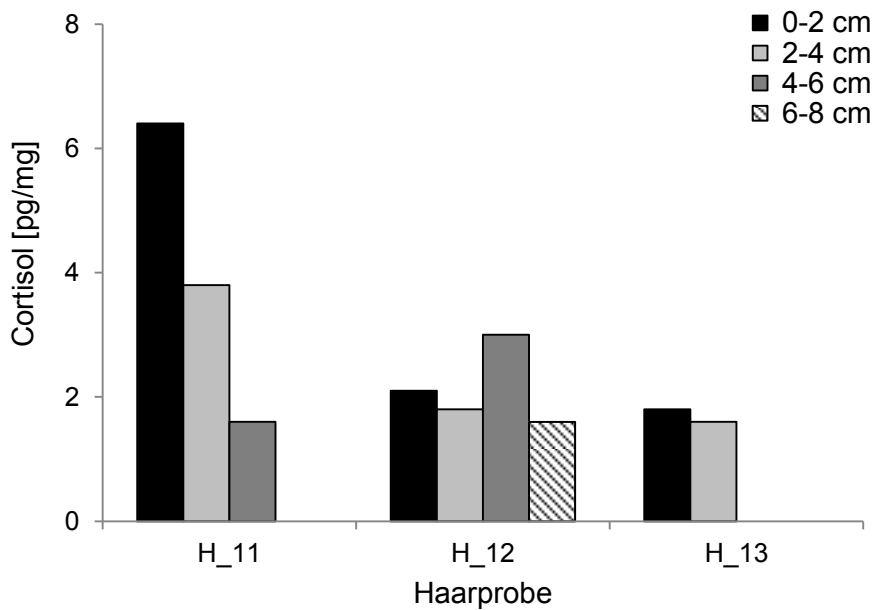
## Fortsetzung Anhang 5

Probe	Entnahme	Segment	Wachstumszeit	Einwaage [mg]	Cortisol [pg/mg]	Cortison [pg/mg]
7	33+5 SSW 01.07.2014	1	05.-06.2014	49,5	2,3	16,3
		2	03.-04.2014	49,7	1,8	10,6
		3	01.-02.2014	49,7	< LOD	6,6
		4	11.-12.2013	50,3	< LOD	3,9
		5	09.-10.2013	52,2	< LOD	2,8
8	37+6 SSW 30.07.2014	1	06.-07.2014	50,7	2,4	16,9
		2	04.-05.2014	52,4	1,8	11,5
		3	02.-03.2014	50,1	1,6	8,2
		4	12.2013-01.2014	50,3	< LOD	4,6
		5	10.-11.2013	50,9	< LOD	2,8
9	2 Woche pp 29.08.2014	1	07.-08.2014	51,3	4,6	24,3
		2	05.-06.2014	50,1	1,9	13,0
		3	03.-04.2014	49,8	1,6	7,8
		4	01.-02.2014	48,6	< LOD	4,9
		5	11.-12.2013	52,4	< LOD	2,6
10	6,5 Woche pp 30.09.2014	1	08.-09.2014	55,4	8,6	29,0
		2	06.-07.2014	51,1	2,1	14,3
		3	04.-05.2014	50,4	1,6	9,8
		4	02.-03.2014	51,9	< LOD	7,7
		5	12.2013-01.2014	50,3	< LOD	3,1
11	12 Woche pp 05.11.2014	1	09.-10.2014	53,1	6,4	25,5
		2	07.-08.2014	50,3	3,8	19,7
		3	05.-06.2014	52,5	1,6	10,5
		4	03.-04.2014	51,4	< LOD	6,4
		5	01.-02.2014	50,2	< LOD	3,8
12	6 Monate pp 05.02.2015	1	12.2014-01.2015	48,6	2,1	9,3
		2	10.-11.2014	50,2	1,8	9,0
		3	08.-09.2014	51,8	3,0	16,8
		4	06.-07.2014	49,7	1,6	7,2
		5	04.-05.2014	50,2	< LOD	4,6
13	13 Monate pp 16.09.2015	1	06.-07.2015	49,3	1,8	8,2
		2	04.-05.2015	51,2	1,6	6,4
		3	02.-03.2015	50,6	< LOD	5,4
		4	12.2014-01.2015	48,1	< LOD	3,1
		5	10.-11.2014	51,6	< LOD	2,7

Anhang 6: Veränderung der Cortisolkonzentrationen mit zunehmenden Haaralter. Für diese Probandin liegt die Halbwertszeit bei ca. sechs Monaten.



Anhang 7: Verlauf der Cortisolkonzentration entlang der Haarsträhne der Proben H\_11, H\_12 und H-13. Für die Probe H\_12 ist ein Konzentrationspeak im Segment 3 (4-6 cm) zu erkennen.



## Veröffentlichungen

### Publikationen

„Diagnostic value of concentration profiles of glucocorticosteroids and endocannabinoids in hair.” **Krumbholz A**, Anielski P, Reisch N, Schelling G, Thieme D. *Ther Drug Monit.* **2013 Oct**; 35(5): 600-7.

„Statistical significance of hair analysis of clenbuterol to discriminate therapeutic use from contamination.” **Krumbholz A**, Anielski P, Gfrerer L, Graw M, Geyer H, Schänzer W, Dvorak J, Thieme D. *Drug Test Anal.* **2014 Nov-Dec**; 6(11-12): 1108-16.

„Effect of prenatal steroid treatment on the developing immune system.” Diepenbruck I, Much CC, **Krumbholz A**, Kolster M, Thieme R, Thieme D, Diepenbruck S, Solano ME, Arck PC, Tolosa E. *J Mol Med (Berl).* **2013 Nov**; 91(11):1293-302.

„Endocannabinoid concentrations in hair are associated with PTSD symptom severity.” Wilker S, Pfeiffer A, Elbert T, Ovuga E, Karabatsiakakis A, **Krumbholz A**, Thieme D, Schelling G, Kolassa IT. *Psychoneuroendocrinology.* **2016 May**; 67: 198-206.

### Tagungsbeiträge

30. Cologne Workshop on Dope Analysis, Manfred Donike Workshop, Köln (2012)

**Poster:** „Hair analyses of steroids as tool of disease control in patients with congenital adrenal hyperplasia”

**Krumbholz A**, Anielski P, Reisch N, Thieme D.

32. Cologne Workshop on Dope Analysis, Manfred Donike Workshop, Köln (2014)

**Vortrag:** „Is hair analysis of clenbuterol suitable to discriminate therapeutic use from contamination?”

Thieme D, Anielski P, Geyer H, Gfrerer L, **Krumbholz A**.

## Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2012 bis Dezember 2016 am Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie Kreischa, An-Institut der Technischen Universität Dresden unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. Eike Brunner, Professur für Bioanalytische Chemie der Technischen Universität Dresden, Fachrichtung Chemie und Lebensmittelchemie angefertigt.

Es haben keine früheren erfolglosen Promotionsverfahren stattgefunden.

Hiermit erkenne ich die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden vom 23. Februar 2011, zuletzt geändert durch die Beschlüsse des Fakultätsrates vom 16. Juni 2011 und 18. Juni 2014, an.

Dresden, den  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Aniko Krumbholz geb. Härtling