

Aus dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie

Klinisches Institut, München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. Elisabeth Binder

Etablierung einer Methode

zur Analyse von Steroiden in Kopfhaar und Fingernagel

bei gesunden Erwachsenen

und Patienten mit Erkrankungen des Cortisolstoffwechsels

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Teresa Doris Engels

aus Mainz

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Günter Karl Stalla
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Elisabeth Mützel PD Dr. Heike Künzel
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Mareike Stieg
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	23.06.2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Das Hormon Cortisol</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Chemische Eigenschaften der Substanz Cortisol .....	1
1.1.2 Stoffwechsel des Hormons Cortisol im menschlichen Körper .....	2
1.1.3 Einlagerung von Cortisol in Haar und Fingernagel .....	4
<b>1.2 Erkrankungen des Cortisolstoffwechsels</b> .....	<b>5</b>
1.2.1 Hypocortisolismus durch Nebenniereninsuffizienz .....	5
1.2.2 Hypercortisolismus bei Cushing-Syndrom .....	7
1.2.3 Metabolisches Syndrom .....	8
1.2.4 Aktuelle klinische Diagnostik der Störungen des Cortisolhaushalts .....	8
<b>1.3 Aktueller Stand der Forschung zur Nachweisbarkeit von Cortisol im Haar 18</b>	
<b>1.4 Einflussfaktoren des Haarcortisolspiegels in der Literatur</b> .....	<b>19</b>
<b>1.5 Aktueller Stand der Forschung zur Nachweisbarkeit von Cortisol im Fingernagel</b> .....	<b>20</b>
<b>1.6 Zielsetzung</b> .....	<b>21</b>
<b>2 Methodik</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1 Ethische Aspekte</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2 Zusammensetzung der Studienkohorte</b> .....	<b>23</b>
2.2.1 Probandenkollektiv .....	23
2.2.2 Patientenkollektiv .....	23
<b>2.3 Erhebung der Parameter</b> .....	<b>24</b>
2.3.1 Datenerhebung durch Fragebögen .....	24
2.3.2 Körperliche Untersuchung .....	24
2.3.3 Entnahme der Haarsträhnen .....	25
2.3.4 Entnahme der Fingernägel .....	25
<b>2.4 Probenaufbereitung</b> .....	<b>26</b>
2.4.1 Aufbereitung der Materialien .....	26
2.4.2 Pulverisierung (Teil A) .....	27
2.4.3 Alkalische Hydrolyse (Teil B) .....	27
2.4.4 Messung mit ELISA (Teil C) .....	27
2.4.5 Validierung der Messmethode des Haarcortisols mit ELISA .....	29
2.4.6 Messung mit Massenspektrometrie (Teil D) .....	34

---

<b>2.5 Statistische Analysen .....</b>	<b>37</b>
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1 Charakterisierung der Probanden und Patienten.....</b>	<b>41</b>
3.1.1 Einteilung der Probanden und Patienten nach Krankheitsmerkmalen .....	41
3.1.2 Allgemeine Merkmale .....	43
3.1.3 Psychologische Merkmale.....	46
3.1.4 Merkmale des metabolischen Syndroms.....	49
3.1.5 Merkmale der Haare und Haarbehandlungen .....	53
<b>3.2 Einflussfaktoren der Cortisolbestimmung im Haar.....</b>	<b>54</b>
3.2.1 Verteilung der Messwerte des Haarcortisols .....	54
3.2.2 Einflussfaktoren der Cortisolbestimmung im Haar bei gesunden Probanden	56
3.2.3 Einflussfaktoren der Cortisolbestimmung bei allen Haarproben.....	57
3.2.4 Einflussfaktoren der Cortisolbestimmung im Haar bei Patienten mit Hydrocortisonsubstitution .....	60
3.2.5 Einflussfaktoren der Cortisolbestimmung im Haar bei Patienten mit kontrolliertem Cushing-Syndrom .....	63
3.2.6 Einflussfaktoren der Cortisolbestimmung im Haar bei Patienten mit aktivem Cushing-Syndrom.....	64
3.2.7 Zusammenhang der Einflussfaktoren der Cortisolbestimmung im Haar .....	64
<b>3.3 Anwendbarkeit zur Diagnostik bei Störungen des Cortisolstoffwechsels ..</b>	<b>69</b>
<b>3.4 Anwendbarkeit zur Beurteilung eines Therapieansprechens .....</b>	<b>70</b>
3.4.1 Überprüfung der Hydrocortisonsubstitution .....	70
3.4.2 Überprüfung des Therapieansprechens bei Hypercortisolismus.....	71
<b>3.5 Vergleich verschiedener Methoden .....</b>	<b>72</b>
3.5.1 Vergleich der Extraktion durch alkalische Hydrolyse mit Pulverisierung .....	72
3.5.2 Vergleich der Messung mittels Massenspektrometrie zu ELISA .....	73
3.5.3 Korrelation des Haarcortisolgehalts mit den Cortisolwerten in Fingernägeln	78
3.5.4 Ringversuch mit der Technischen Universität Dresden.....	79
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>81</b>
<b>4.1 Diskussion der Methodik .....</b>	<b>81</b>
4.1.1 Cortisolbestimmung im Haar nach Pulverisierung und Methanolextraktion ..	81
4.1.2 Cortisolbestimmung nach alkalischer Hydrolyse .....	82
4.1.3 Cortisolbestimmung mit ELISA.....	82
4.1.4 Cortisolbestimmung mit Massenspektrometrie.....	83
4.1.5 Validierung der Cortisolbestimmung im Haar mittels Pulverisierung und ELISA.....	83

4.1.6 Cortisolbestimmung im Fingernagel .....	84
4.1.7 Ringversuch mit der Technischen Universität Dresden.....	85
<b>4.2 Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>85</b>
4.2.1 Probanden- und Patientenkollektiv .....	85
4.2.2 Einflüsse auf den Haarcortisolspiegel .....	87
4.2.3 Stärken und Schwächen der Anwendbarkeit zur Diagnostik bei Verdacht auf Cushing-Syndrom .....	93
4.2.4 Stärken und Schwächen der Anwendbarkeit bei der Therapie durch Hydrocortisonsubstitution .....	95
4.2.5 Stärken und Schwächen der Anwendbarkeit auf die Therapie des Cushing-Syndroms.....	96
4.2.6 Ausblick .....	96
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>99</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>i</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>iii</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>xiii</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>xv</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>xvii</b>
<b>Anlagen .....</b>	<b>xxi</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>xlii</b>



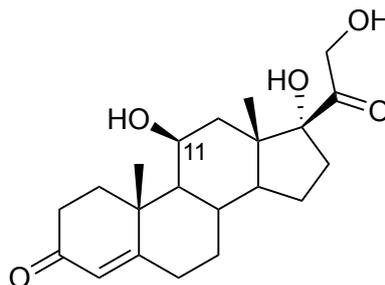
# 1 Einleitung

Cortisol ist ein facettenreiches Hormon mit vielfältigen Funktionen. Grundsätzlich reguliert das lebenswichtige Hormon den Energieumsatz des Körpers mit zirkadianer Adaptation der Leistungsfähigkeit. In Belastungssituationen mobilisiert es Energiereserven, führt zu einer vermehrten Abwehrbereitschaft und verändert die Immunantwort (Olivera-Figueroa, Juster, Morin-Major, Marin, & Lupien, 2015). Dementsprechend beeinflussen viele Faktoren die Cortisolproduktion im Körper. Erkrankungen, die mit erhöhten oder erniedrigten Cortisolspiegeln einhergehen, haben trotz aktueller Therapiemöglichkeiten eine bis zu fünffach erhöhte Mortalitätsrate im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung (Charmandari, Nicolaidis, & Chrousos, 2014; Nieman et al., 2015; Quinkler et al., 2013). Die tageszeitlichen Schwankungen erschweren bei Verdacht auf Störung der Cortisolproduktion die biochemische Diagnostik sowie ein adäquates Therapiemonitoring (Pruessner, Kirschbaum, Meinlschmid, & Hellhammer, 2003). Daher sollte ein verlässlicher Parameter für eine funktionierende Cortisolproduktion gefunden werden. Da sich das Hormon in Haar und Fingernagel einlagert, könnte eine Cortisolbestimmung in den Kopfharen oder Fingernägeln eine zuverlässige, wenig invasive und zeitlich umfassende Diagnostik liefern (D'Anna-Hernandez, Ross, Natvig, & Laudenslager, 2011).

## 1.1 Das Hormon Cortisol

### 1.1.1 Chemische Eigenschaften der Substanz Cortisol

Cortisol ist ein Steroidhormon mit einem charakteristischen starren Sterangrundgerüst. Cortisol ist lipophil und in Wasser schwer löslich. Durch den relativ hohen Schmelzpunkt bei 212–213 Grad Celsius liegt es bei Raumtemperatur als Feststoff vor und nimmt leicht kristalline Form an. Cortisol ist ein körpereigenes Hormon, kann jedoch synthetisch hergestellt werden. Von Cortison, das auch physiologisch im menschlichen Körper vorliegt, unterscheidet sich Cortisol durch eine Alkoholgruppe anstelle der Ketogruppe an Position 11, siehe Abbildung 1.

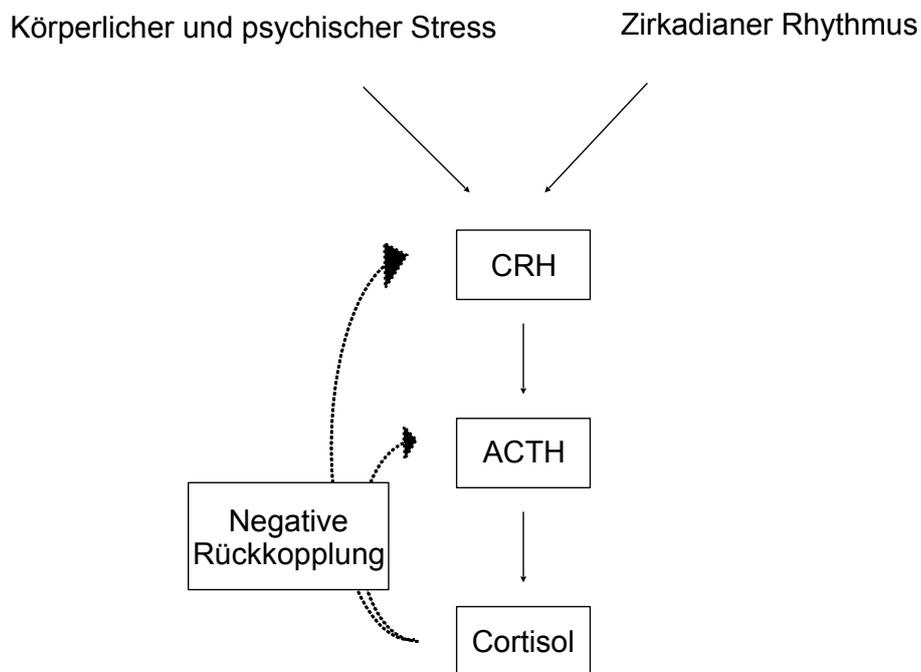


**Abbildung 1:** Chemische Struktur von Cortisol.

### 1.1.2 Stoffwechsel des Hormons Cortisol im menschlichen Körper

Cortisol ist ein Glucocorticoid, das in der Nebennierenrinde produziert und sezerniert wird. Aus Cholesterin wird Pregnenolon und Progesteron gebildet, daraus wird durch dreifache Hydroxylierung Cortisol synthetisiert. In anderen Geweben können aus Pregnenolon dem Cortisol ähnliche Hormone, wie Dehydroepiandrosteron (DHEA), Testosteron und Estradiol, entstehen (Taves, Gomez-Sanchez, & Soma, 2011).

Die Synthese und Sekretion des Cortisols wird über einen hypothalamisch-hypophysär-adrenalen Regelkreislauf gesteuert, der in Abbildung 2 dargestellt ist. Pulsatil und vermehrt auf Stressreize hin wird im Hypothalamus *Corticotropin-releasing-Hormon* (CRH) ausgeschüttet, das in den corticotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens die Synthese und Ausschüttung des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH) fördert. Dieses wiederum übt seine Wirkung in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde aus, in der die Glucocorticoide synthetisiert werden (Lightman et al., 2008; Young, Abelson, & Lightman, 2004). Über einen negativen *Feedback*-Mechanismus hemmen Glucocorticoide die Ausschüttung von ACTH und CRH, welches selbst von ACTH gehemmt wird (Papadopoulos & Cleare, 2011). Die morgendliche Erhöhung der CRH-Konzentration führt zu den normalerweise höchsten Cortisolserumspiegeln in den frühen Morgenstunden kurz nach dem Aufwachen (Hellman et al., 1970).



**Abbildung 2:** Schema der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (in Anlehnung an Maidana, Bruno, & Mesch, 2013).

Die Cortisolwirkung wird durch den Glucocorticoidrezeptor (GR) vermittelt, an den das Hormon im Zytosol bindet, um dann gemeinsam in den Zellkern eingeschleust zu werden. Durch Bindung an *Enhancer*-Elemente wird die Gentranskription beeinflusst. Je nach Gewebe existieren verschiedene Isoformen des GR mit jeweils anderer Funktion (Oakley & Cidlowski, 2013). Wesentlich für die Wirkung scheint weiterhin die Beeinflussung anderer Transkriptionsfaktoren zu sein, wie der Antagonismus zu *Nuclear-Factor-kappa-light-Chain-Enhancer* (NFκB) (Galon et al., 2002; Knudsen, Dinarello, & Strom, 1987). Freies Cortisol kann an den strukturell ähnlichen Mineralocorticoidrezeptor binden und aktiviert ihn bereits in geringer Konzentration (Gomez-Sanchez & Gomez-Sanchez, 2014). Cortisol ist jedoch im Blut zu über 95 % an Proteine gebunden, unter anderem an das *Corticosteroid-binding-Globulin* (CBG), auch Transcortin genannt, und an Albumin (Lightman et al., 2008).

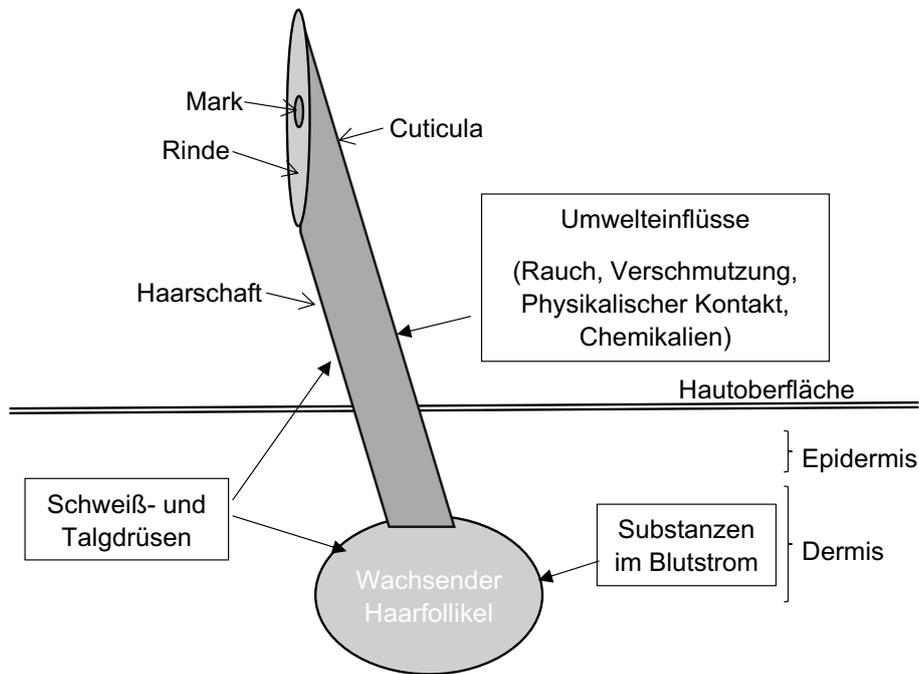
Die Wirkung des Cortisols im Stoffwechsel dient vor allem der Mobilisation von Energiereserven. Glucose wird durch vermehrte Gluconeogenese, Lipolyse und Proteinolyse bereitgestellt (Juszczak & Stankiewicz, 2018; Kratschmar et al., 2011). Ein verminderter Knochenaufbau führt effektiv zu Knochenabbau. Im Sinne einer Adaptation des Körpers an Stress steigt unter Cortisoleinfluss die Sensitivität der Adrenozeptoren für Katecholamine, mit einer folgenden Erhöhung des Blutdrucks. Im Vergleich zu den Katecholaminen zeigt das Cortisolsystem eine verlangsamte und verlängerte Reaktion auf einen Stressstimulus (Geiger, Pitts, Feldkamp, Kirschbaum, & Wolf, 2015). Cortisol zeigt eine komplexe immunmodulatorische Wirkung, die mit einer verminderten Lymphozytenproliferation und Leukozytenadhäsion einhergeht (de Waal, 1994; Guyre, Bodwell, & Munck, 1984).

Zur Inaktivierung wird Cortisol im Körper durch das Enzym 11β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase-2 zu Cortison oxidiert. Die 11β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase-1 katalysiert die Reduktion. Die Enzyme werden in verschiedenen Körperzellen in unterschiedlicher Konzentration exprimiert. So erfolgt zum Beispiel an Nierenzellen die überwiegende Inaktivierung durch Oxidation. Die Aktivierung des Mineralocorticoidrezeptors durch Cortisol anstelle seines eigentlichen Liganden Aldosteron wird so vermindert. In der Haut wird das Vorhandensein der 11β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase-1 bei der topischen Anwendung von Hydrocortisoncremes ausgenutzt, durch die Cortison erst in seine aktive Form umgewandelt wird (Classen-Houben et al., 2009; Kratschmar et al., 2011).

### 1.1.3 Einlagerung von Cortisol in Haar und Fingernagel

Haare wachsen ungefähr einen Zentimeter pro Monat, auch wenn es dabei genetische und altersabhängige Unterschiede gibt (Loussouarn, El Rawadi, & Genain, 2005; Luo et al., 2012). Das Haarwachstum vollzieht sich in drei Phasen, wobei nur in der ersten, zwei bis drei Jahre dauernden, anagenen Phase das Haar ca. einen Zentimeter pro Monat wächst. Hierbei wird der Haarfollikel durch Blut aus umliegenden Kapillaren mit Nährstoffen versorgt. In Blut gelöste Substanzen wie Cortisol können in dieser Zeit in den sich verlängernden Haarschaft eingelagert werden. Die zweite katagene Phase leitet über zur Ruhephase durch Keratinisierung und beginnende Ablösung von der Papille. In der zwei- bis dreimonatigen telogenen Phase wächst das Haar nicht mehr und kann relativ leicht abgelöst werden. Das Wachstum des neuen Haares beginnt in der dermalen Papille und löst das alte Haar aus seiner Verankerung. Rund 85 % aller Haare befinden sich normalerweise im Wachstum (Bost, 1992). Hinterhauptshaare zeigen dabei die geringste Wachstumsvarietät zwischen verschiedenen Strähnen (Sauve, Koren, Walsh, Tokmakejian, & Van Uum, 2007).

Cortisol befindet sich physiologischerweise im Haar, obwohl der genaue Mechanismus noch unbekannt ist (D'Anna-Hernandez et al., 2011). Eine Einlagerung durch Diffusion des Cortisols aus den umliegenden Kapillaren ist vornehmlich anzunehmen (Cone, 1996; Russell, Koren, Rieder, & Van Uum, 2012). Bemerkenswert ist, dass isolierte menschliche Haarfollikel bei Stimulation durch CRH und ACTH relevante Mengen Cortisol synthetisieren können. CRH moduliert *in vitro* Haarwachstum, Keratinozytenproliferation und Melaninproduktion (Ito et al., 2005). Damit spiegelt der Cortisolspiegel im Haar also nicht allein den Serumspiegel wider, sondern auch die direkte Produktion am Haarbalg (Raul, Cirimele, Ludes, & Kintz, 2004). Cortisol lässt sich in Schweiß nachweisen, dennoch geht eine vermehrte Schweißproduktion nicht mit einer Erhöhung der Haarcortisolkonzentration einher (Grass et al., 2015). Da Cortisol ein lipophiles Molekül ist, ist eine Anlagerung an *Carrier*-Moleküle ähnlich wie Drogen an das Farbpigment Melanin denkbar, damit ließe sich auch eine erhöhte Konzentration in dunkleren Haaren erklären (Cone, 1996; Kintz, Cirimele, & Ludes, 2000). Einflüsse auf die Einlagerung von Cortisol im Haar sind in Abbildung 3 zusammenfassend dargestellt.



**Abbildung 3:** Einflüsse auf die Einlagerung von Cortisol im Haar (in Anlehnung an Gow, Thomson, Rieder, Van Uum, & Koren, 2010).

Steroidhormone lassen sich auch in Fingernägeln nachweisen. Der Einlagerungsmechanismus scheint vornehmlich passive Diffusion durch Kapillaren am Nagelbett in die Nagelmatrix zu sein (Higashi et al., 2016; Warnock et al., 2010). Auch hier sind Umwelteinflüsse zu beachten.

## 1.2 Erkrankungen des Cortisolstoffwechsels

Eine Störung des Cortisolhaushalts kann vielfältige Ursachen besitzen, dennoch zeigt sie sich grundsätzlich in einer der zwei Ausprägungen: Hypocortisolismus oder Hypercortisolismus.

### 1.2.1 Hypocortisolismus durch Nebenniereninsuffizienz

Eine Nebenniereninsuffizienz kann auf eine primäre Schädigung der Nebennierenrinde zurückgehen (Morbus Addison), sekundär durch eine verminderte ACTH-Ausschüttung in der Hypophyse bedingt sein oder tertiär durch eine verminderte CRH-Sekretion des Hypothalamus. Die iatrogen verursachte Störung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse durch Glucocorticoidgabe ist die häufigste Ursache. Von den endogenen Erkrankungen, die in Europa mit einer Inzidenz von fünf pro eine Million und einer Prävalenz von ca. 100 pro eine Million Einwohner auftreten, ist die Autoimmunadrenalitis mit mehr als 80 % die weiteste verbreitete Form. Auch Infektionserkrankungen wie Tuberkulose können zu einer primären Nebenniereninsuffizienz führen (Honegger et al., 2015; Quinkler et al., 2013). Bei den

zentralen Formen sind oft Hirntumore oder ihre Therapie sowie Infektionen und Unfälle die Auslöser. Charakteristisch ist ein Hypocortisolismus, der je nach Ursache mit einer ACTH-Erhöhung (primäre Nebenniereninsuffizienz) oder ACTH-Erniedrigung (sekundäre und tertiäre Nebenniereninsuffizienz) einhergeht (Charmandari et al., 2014).

Das klinische Bild ist von Antriebslosigkeit, Gewichtsverlust und Dehydratation geprägt, das sich in Stresssituationen bis zu einer lebensbedrohlichen Addisonkrise aggravieren kann (Murray et al., 2017). Ein charakteristischer Hinweis bei primärer Nebenniereninsuffizienz ist eine Hyperpigmentation der Haut. Verschiedene Tests können zur Bestimmung der Cortisol- und ACTH-Produktion im Körper genutzt werden. Je nach Ausprägung des Krankheitsbildes muss allerdings noch vor einer abschließenden Diagnostik durch Hydrocortisonsubstitution therapiert werden (Charmandari et al., 2014). Der häufige Mineralocorticoidmangel kann durch Messung des Plasmaspiegels von Renin und Aldosteron aufgedeckt werden und wird mit Fludrocortison therapiert. Bei primärer Nebenniereninsuffizienz gibt die Hyponatriämie häufig einen Hinweis auf die Erkrankung, die Bestimmung von Autoantikörpern gegen Enzyme der Hormonproduktion bestätigt dann den Verdacht. Auch ein Sexualhormonmangel sollte abgeklärt und ggf. z. B. mit DHEA substituiert werden. Die Aufklärung über potentiell lebensbedrohliche Situationen aufgrund von erhöhtem Cortisolbedarf sollte erfolgen und ein Notfallausweis ausgestellt werden (Bornstein et al., 2016).

Zur Hydrocortisonsubstitution kommen verschiedene Medikamente zum Einsatz, die sich in ihrer spezifischen Wirksamkeit am Glucocorticoid- bzw. Mineralocorticoidrezeptor unterscheiden (Murray et al., 2017). Das zunächst entwickelte Cortisonacetat zeigt dabei gluco- und mineralocorticoide Rezeptorwirkungen. Das häufig eingesetzte Hydrocortison entspricht in seiner Wirkung am ehesten dem physiologischen Cortisol (Bornstein et al., 2016; Colburn, DiSanto, Stubbs, Monovich, & DeSante, 1980; Heazelwood, Galligan, Cannell, Bochner, & Mortimer, 1984). Beide werden zwei bis dreimal täglich oral eingenommen. Um die Pharmakokinetik besser an die physiologischen Abläufe anzupassen, wurde ein *Dual-release*-Präparat auf den Markt gebracht unter dem Handelsnamen Plenadren® (Johannsson et al., 2012). Mit ca. 6-fach glucocorticoide Potenz im Vergleich zu Hydrocortison wirkt Prednisolon, das nicht standardmäßig zur Substitution eingesetzt wird. Dexamethason besitzt eine ca. 30-fach glucocorticoide Potenz und wird in der Endokrinologie vornehmlich diagnostisch eingesetzt (Caldato, Fernandes, & Kater, 2004; Quinkler et al., 2013). In der topischen, inhalativen und oralen immunsuppressiven Anwendung gibt es eine ganze Bandbreite verschiedener Medikamente, die in ihrer Stärke und Aufnahmefähigkeit optimiert

wurden. Alle diese Cortisonpräparate können systemische Effekte haben und eine Substitutionstherapie beeinflussen, auch wenn sie nicht zu diesem Zweck eingesetzt werden.

### 1.2.2 Hypercortisolismus bei Cushing-Syndrom

Das Cushing-Syndrom beschreibt das klinische Bild eines Hypercortisolismus, also einer inadäquat hohen Cortisolsekretion mit aufgehobener Tag-Nacht-Rhythmik. In Europa gibt es jährlich zwei bis drei Neuerkrankte pro eine Million Einwohner, die Krankheitsprävalenz liegt zwischen 30 und 60 Personen (Nieman et al., 2008). Meist ist das Cushing-Syndrom iatrogen verursacht und Folge einer langandauernden und hoch dosierten Glucocorticoidtherapie, zum Beispiel im Rahmen von Autoimmunerkrankungen. Mit 70 % ist die häufigste endogene Ursache ein ACTH-produzierendes Adenom zentral in der Hypophyse, Morbus Cushing genannt. In 10 % der Fälle liegt eine ektope ACTH-Sekretion vor, meist paraneoplastisch bei Bronchialkarzinomen oder Karzinoiden. 15–20 % der Fälle des Hypercortisolismus sind adrenaler Genese und beziehen sich auf eine vermehrte Cortisolproduktion meist im Rahmen von Tumoren der Nebennierenrinde. Diese ACTH-unabhängige Form wird primärer Hypercortisolismus genannt (Deutschbein & Fassnacht, 2015). Selten ist das zyklische Cushing-Syndrom, bei dem eine übermäßige Cortisolsekretion intermittierend auftritt (Manenschiijn et al., 2012).

Kennzeichen des Cushing-Syndroms ist eine Umverteilung des Körperfettes mit Stammfettsucht, Stiernacken und Vollmondgesicht. Arterielle Hypertonie, Insulinresistenz, Dyslipidämie sowie Osteoporose sind häufige, eher unspezifische Symptome. Vermehrte Hämatome, Striae rubrae, Muskelatrophie sowie psychische Veränderungen sind richtungsweisend (Labeur et al., 2006; Nieman et al., 2008).

Die Therapie besteht je nach Ätiologie meist aus einer operativen Resektion des Gewebes mit erhöhter Hormonproduktion und sich ggf. anschließender Substitutionstherapie mit Glucocorticoiden, die teilweise über Jahre durchgeführt werden muss. Beim Morbus Cushing ist das Mittel der Wahl die transssphenoidale Resektion des Hypophysenadenoms (Beauregard, Dickstein, & Lacroix, 2002). Das adrenale Cushing wird durch uni- oder bilaterale Adrenalektomie therapiert. Bei Inoperabilität kann eine medikamentöse Therapie mit adrenostatischen Substanzen wie Ketoconazol oder Zytostatika wie Mitotan eingeleitet werden und gleichzeitig eine Cortisolsubstitution notwendig machen (Fleseriu & Petersenn, 2015). Die symptomatische Therapie des Bluthochdrucks, des Diabetes mellitus, der Hyperkoagulabilität und der Osteoporose ist von wesentlicher Bedeutung. Insbesondere

unbehandelt geht das Cushing-Syndrom mit einer stark erhöhten Mortalität einher, die sich vor allem in einem erhöhten kardiovaskulären Risiko zeigt (Dekkers et al., 2013).

### 1.2.3 Metabolisches Syndrom

Auch wenn die Genese des metabolischen Syndroms mit hyperkalorischer Ernährung und Bewegungsmangel eine andere ist, gibt es dennoch in der klinischen Ausprägung Überschneidungen mit dem Cushing-Syndrom. Die Betroffenen sind adipös und können an einem erhöhten Blutdruck, einer Dyslipidämie und einem gestörten Glucosestoffwechsel leiden. Bei Adipositas kann sogar ein milder Hypercortisolismus bestehen (Kuehl et al., 2015). Die Diagnosestellung eines Cushing-Syndroms dauert häufig lange Zeit, weil zunächst von dem wesentlich häufigeren metabolischen Syndrom ausgegangen wird (Nieman et al., 2008). Populationsbasierte Erhebungen gehen von einer Prävalenz von über 20 % aus (Schipf et al., 2010).

Die *International Diabetes Federation* hat 2005 einen Konsensus zu diagnostischen Kriterien des metabolischen Syndroms erarbeitet, wobei als Hauptkriterium die stammbetonte Adipositas mit einem BMI  $> 30 \text{ kg/m}^2$  oder einem Bauchumfang von  $> 94 \text{ cm}$  bei Männern bzw.  $80 \text{ cm}$  bei Frauen gilt. Dazu kommen mindestens zwei der folgenden Kriterien: erhöhte Triglyceridwerte  $> 150 \text{ mg/dl}$ , erniedrigtes HDL-Cholesterin  $< 40 \text{ mg/dl}$  (Männer) bzw.  $< 50 \text{ mg/dl}$  (Frauen), arterielle Hypertonie: systolisch  $\geq 130 \text{ mmHg}$  oder diastolisch  $\geq 85 \text{ mmHg}$  und erhöhte Nüchtern-glucosewerte von  $> 100 \text{ mg/dl}$  bzw.  $5,6 \text{ mmol/l}$  (Alberti, Zimmet, & Shaw, 2006).

Das metabolische Syndrom umfasst wesentliche kardiovaskuläre Risikofaktoren und ist mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität assoziiert (Ju, Lee, & Kim, 2017). Dies ist die häufigste Todesursache in der westlichen Welt. Ein tieferes Verständnis der Pathomechanismen und die Entwicklung spezifischer Therapien haben also einen großen Einfluss auf die Gesundheit weiter Teile der Bevölkerung.

### 1.2.4 Aktuelle klinische Diagnostik der Störungen des Cortisolhaushalts

Da ein akuter Hypocortisolismus ein lebensbedrohliches Krankheitsbild ist, sollte hier bei schwer erkrankten Patienten und hinreichendem Verdacht eine schnelle Diagnostik eingeleitet werden. Bei Verdacht auf Cushing-Syndrom sollte zunächst das Augenmerk auf klinische Hinweise gelegt werden im Rahmen einer gründlichen Anamnese und körperlichen Untersuchung. Erst wenn ein berechtigter Verdacht besteht und eine exogene Cortisolzufuhr ausgeschlossen werden kann, sollte mit diagnostischen Tests begonnen werden. Hierfür stehen eine Reihe von Verfahren zur Messung von Elektrolyt- und Hormonkonzentrationen in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie Blut, Speichel

und Urin zur Verfügung. Aufgrund der physiologischerweise schwankenden Hormonkonzentrationen und stressbedingten Cortisolserhöhung zeigen die meisten Tests eine geringe Sensitivität und Spezifität (Alwani et al., 2014). Um einen besseren zeitlichen Verlauf zu erhalten, werden daher wiederholte Messungen an einem Tag oder in einem bestimmten Zeitraum vorgenommen (Pruessner et al., 2003). Dies ist jedoch umständlich und erfordert eine große Zuverlässigkeit des Patienten. Die Funktion der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse kann durch Stimulationstests nach Gabe verschiedener Hormone geprüft werden. Die Anzahl der diagnostischen Möglichkeiten weist bereits darauf hin, dass sich noch kein Test als ideal erwiesen hat. Je nach klinischer Symptomatik sollten weitere Tests durchgeführt oder zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt werden (Charmandari et al., 2014). Erst bei Nachweis der Störung in der Hormonproduktion sollte mittels Bildgebung oder invasiver Diagnostik nach der Ursache gesucht werden (Bornstein et al., 2016; Gilbert & Lim, 2008).

Bei der Interpretation der Ergebnisse und Festlegung der diagnostischen Grenzwerte ist zu beachten, dass der Cortisolgehalt des Blutes abhängig ist von verschiedenen Faktoren. Besonders relevant ist dabei, dass Bluttests nicht nur das aktive freie Cortisol messen, sondern auch das an Transportproteine gebundene Cortisol. Die Konzentration des CBG wird durch Einnahme oraler Kontrazeptiva stark erhöht und damit der gemessene Cortisolspiegel im Blut. Bei Patienten mit Nephrotischem Syndrom oder Lebererkrankungen kann Albumin, an das Cortisol – wenn auch in geringerem Maße – bindet, verringert sein, und damit der gemessene Cortisolwert. Eine gesteigerte Synthese von Cortisol wird durch Stress ausgelöst, daher erhöhen z. B. Operationen und schwere Erkrankungen, aber auch Schwangerschaften den Cortisolgehalt im Blut. Bei Verdacht auf eine insuffiziente Synthese muss beachtet werden, dass Erkrankungen, die intensivmedizinische Therapien erfordern, meist mit einer geringeren Synthese von CBG und Albumin einhergehen, also auch mit einer geringeren Gesamtmenge Cortisol im Blut (Husebye et al., 2014). Besonderes Augenmerk sollte dabei auf mögliche medikamentöse Inhibition adrenaler Enzyme wie Mitotan, Ketoconazol und Etomidat gelegt werden. Die Cytochrom-P-450-Induktion verschiedener Medikamente wie Phenytoin, Carbamazepin, Johanneskraut, Thyroxin oder Rifampicin kann eine verstärkte Verstoffwechslung von Cortisol und Dexamethason verursachen (Bornstein et al., 2016; Nieman et al., 2008).

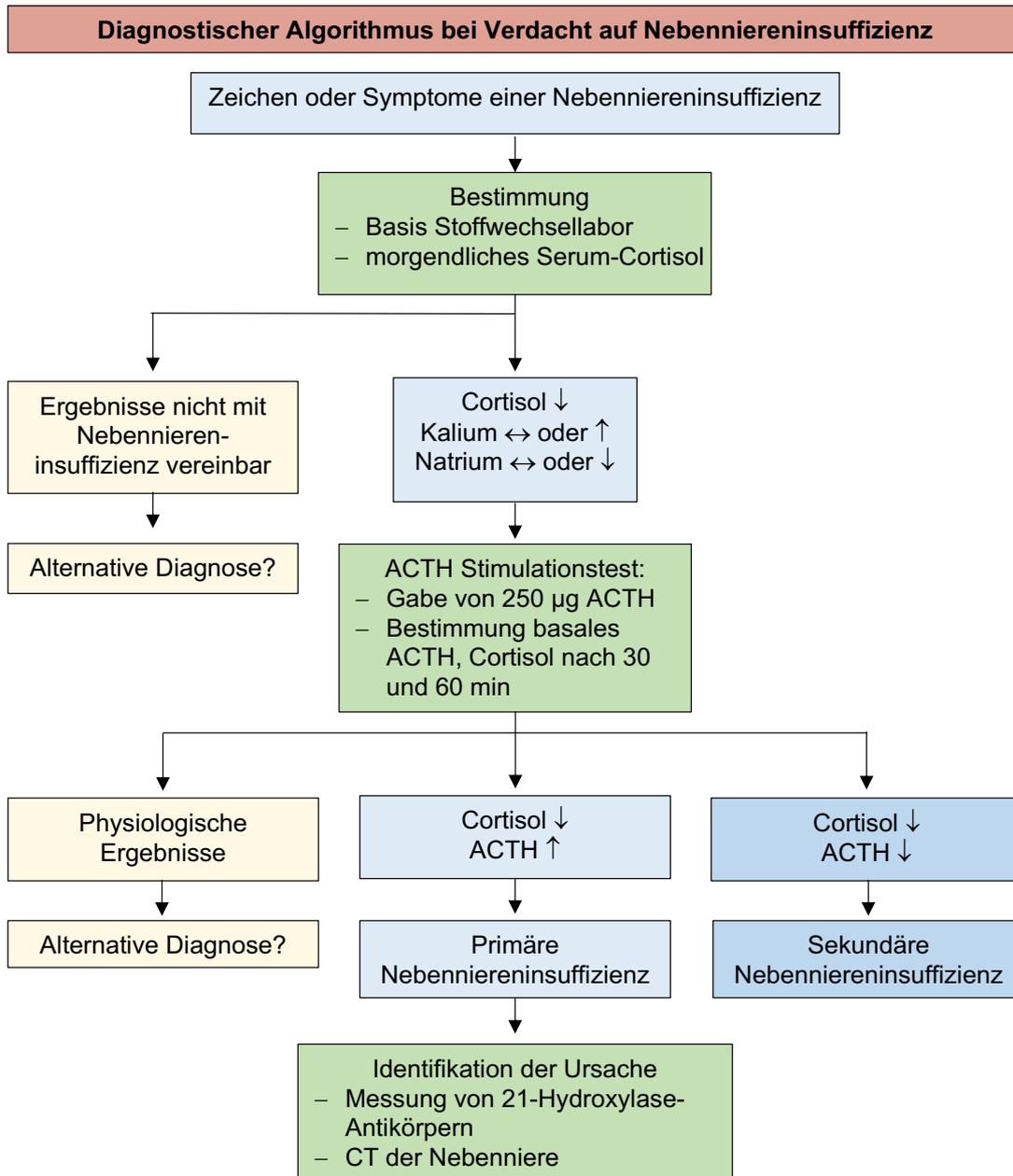
Ein weiterer wesentlicher Faktor, der die Bestimmung des Cortisols und anderer Hormone beeinflusst, ist die Methode der Probenaufbereitung und die genaue Konfiguration der Assays, wodurch sich große Unterschiede in Genauigkeit und Messrahmen ergeben. Bei Messungen basierend auf Antikörpern wie *Radio-immuno-*

Assay (RIA), *Chemilumineszenz-immuno-Assay* (CLIA) oder *Enzyme-linked-immunosorbent-Assay* (ELISA) können Kreuzreaktivitäten mit Metaboliten oder ähnlichen Medikamenten die Messgenauigkeit beeinträchtigen. Daher finden massenspektrometrische Verfahren eine immer weitere Verbreitung, bei denen die Bestimmung eines definierten Substrates sicherer gelingt und sogar mehrere Substrate gleichzeitig bestimmt werden können. Dies wird von einer allmählich zunehmenden Kostenverhältnismäßigkeit begünstigt. Bei diesen Verfahren treten allerdings Interaktionen mit Medikamenten wie Carbamazepin oder Fenofibraten auf. Interessanterweise ergeben sich zwischen den immunologischen und massenspektrometrischen Methoden große Unterschiede in der Höhe des detektierten Cortisols, mit bis zu 40 % geringeren Werten durch die Massenspektrometrie (MS) (Deutschbein & Petersenn, 2013; Lin, Wu, Machacek, Jiang, & Kao, 1997; Nieman et al., 2008).

In letzter Zeit wurde verstärkt eine Vereinheitlichung und Überprüfung der diagnostischen Aussagekraft der verschiedenen Tests gesucht, so gibt es eine Reihe von Veröffentlichungen, die die Anwendbarkeit von Testverfahren untersucht haben (Alwani et al., 2014; Arnaldi et al., 2003; Deutschbein et al., 2012; Elamin et al., 2008). Zusammenfassend ergab sich die Leitlinie zur Diagnostik und Behandlung der primären Nebenniereninsuffizienz 2016 und die Leitlinie der Endokrinen Gesellschaft zur Diagnostik des Cushing-Syndroms 2008 (Bornstein et al., 2016; Nieman et al., 2008).

#### 1.2.4.1 Diagnostik bei Verdacht auf Nebenniereninsuffizienz

Die aktuellen Leitlinien empfehlen einen diagnostischen Algorithmus bei Verdacht auf Nebenniereninsuffizienz (Bornstein et al., 2016; Michels & Michels, 2014). Hierbei soll bei klinischem Verdacht zunächst eine laborchemische Bestätigung der Erniedrigung des Cortisolspiegels im Serum oder ein Funktionstest erfolgen, siehe Abbildung 4.



**Abbildung 4:** Algorithmus bei Verdacht auf Nebenniereninsuffizienz (in Anlehnung an Michels & Michels, 2014).

Zur Diagnostik einer Nebenniereninsuffizienz ist der **ACTH-Kurztest**, auch ACTH-Stimulationstest genannt, der diagnostische Goldstandard. Für ihn werden 250 µg von meist synthetisch hergestelltem ACTH oder ACTH-Analoga intravenös verabreicht und anschließend die Cortisolspiegel im Blut nach 30 bzw. 60 Minuten gemessen. Die Testprotokolle selbst unterscheiden sich teilweise, für die Vorteile der jeweiligen Verwendung gibt es jedoch wenig Evidenz. Die Grenzwerte zur Diagnose einer Nebenniereninsuffizienz sind abhängig von der Messmethode und insbesondere von dem verwendeten Antikörper bei *Immunoassays*. Sie liegen jedoch ungefähr bei

18 µg/dl. Die Sensitivität des hier beschriebenen Kurztests für die Diagnose einer primären Nebenniereninsuffizienz ist mit 92 % (Konfidenzintervall = 81–97 %) beschrieben. Die gemessene Cortisolkonzentration ist durch die vorhergehende Stimulation nicht tageszeitabhängig. Es kann bei Patienten in kritischem Allgemeinzustand von einem ACTH-Kurztest abgesehen werden, der nach der zunächst dringlichen Substitution im späteren Verlauf durchgeführt werden muss. Bei der Interpretation müssen jedoch allgemeine Faktoren berücksichtigt werden, die den Cortisolspiegel im Blut verändern, wie die CBG-Konzentration (Bornstein et al., 2016).

Zur Diagnosestellung in lebensbedrohlichen Situationen oder als Screeningtest kann die **Messung des ACTH-Spiegels** möglichst verbunden mit der **morgendlichen Cortisolbestimmung im Blut** ausreichen, denn die Therapie sollte schnellstmöglich eingeleitet werden. Hierbei gilt für Cortisol ein Grenzwert von 5 µg/dl bei einer ACTH-Konzentration zweifach über dem Referenzintervall des verwendeten Assays für die Diagnose einer primären Nebenniereninsuffizienz. Im Unterschied dazu ist bei der sekundären bzw. tertiären Nebenniereninsuffizienz der ACTH-Spiegel (grenzwertig) erniedrigt (Charmandari et al., 2014). Jedoch sollte immer ein ACTH-Kurztest nachfolgen (Bornstein et al., 2016). Schwierig macht die Interpretation allerdings, dass der morgendliche Serumcortisolspiegel einer gesunden Referenzpopulation mit 4–20 µg/dl in einem ähnlichen Bereich liegt wie der *Cut-off* (Charmandari et al., 2014; El-Farhan et al., 2013; Endert, Ouwehand, Fliers, Prummel, & Wiersinga, 2005). So wurden in der Literatur Werte zwischen 10 µg/dl und 20 µg/dl verwendet, um eine Nebenniereninsuffizienz sicher ausschließen zu können (Erturk, Jaffe, & Barkan, 1998; Michels & Michels, 2014; Schmidt, Lahner, Mann, & Petersenn, 2003). Eine weitere Form der Bestimmung der Cortisolkonzentration im Körper ist die Messung des **Cortisols im Speichel**. Dies hat sich in letzter Zeit als Alternative entwickelt und wird meist im Rahmen der Basalratenbestimmung oder bei Stimulationstest anstelle der Cortisolbestimmung im Blut verwendet. Wohingegen die **Cortisolbestimmung im Urin** zur Diagnostik der Nebenniereninsuffizienz nicht eingesetzt wird (Charmandari et al., 2014).

Der **Insulin-Hypoglykämie-Test** ist der Goldstandard, um weitere Auskunft über die Ursache der Nebenniereninsuffizienz zu erhalten. Dafür wird dem nüchternen Patienten ca. 0,15 IE/kg Körpergewicht Insulin i. v. als Bolus gegeben. Dadurch tritt eine Hypoglykämie ein, dabei werden die Blutzuckerwerte alle fünf Minuten gemessen sowie alle 15 Minuten der Cortisolgehalt des Blutes. Zusätzlich kann das Wachstumshormon (engl. *growth hormon*) und ACTH bestimmt werden. Bei der ACTH-Bestimmung ist die Präanalytik durch Eiskühlung anspruchsvoller und durch eine große Variabilität begrenzt

in seiner Aussagekraft (Erturk et al., 1998). Dabei gilt ein Cortisol-*Peak*  $< 18 \mu\text{g/dl}$  als pathologisch, je nach Höhe des ACTH-Anstiegs lässt sich eine Aussage über die Ursache – primär oder zentral – treffen. Da eine Hypoglykämie potentiell lebensbedrohlich sein kann, darf dieser Test nicht bei Patienten mit zerebro- oder kardiovaskulären Erkrankungen oder Epilepsie durchgeführt werden (Charmandari et al., 2014; Schmidt et al., 2003; Stalla, Lusa, Oeckler, Muller, & von Werder, 1988).

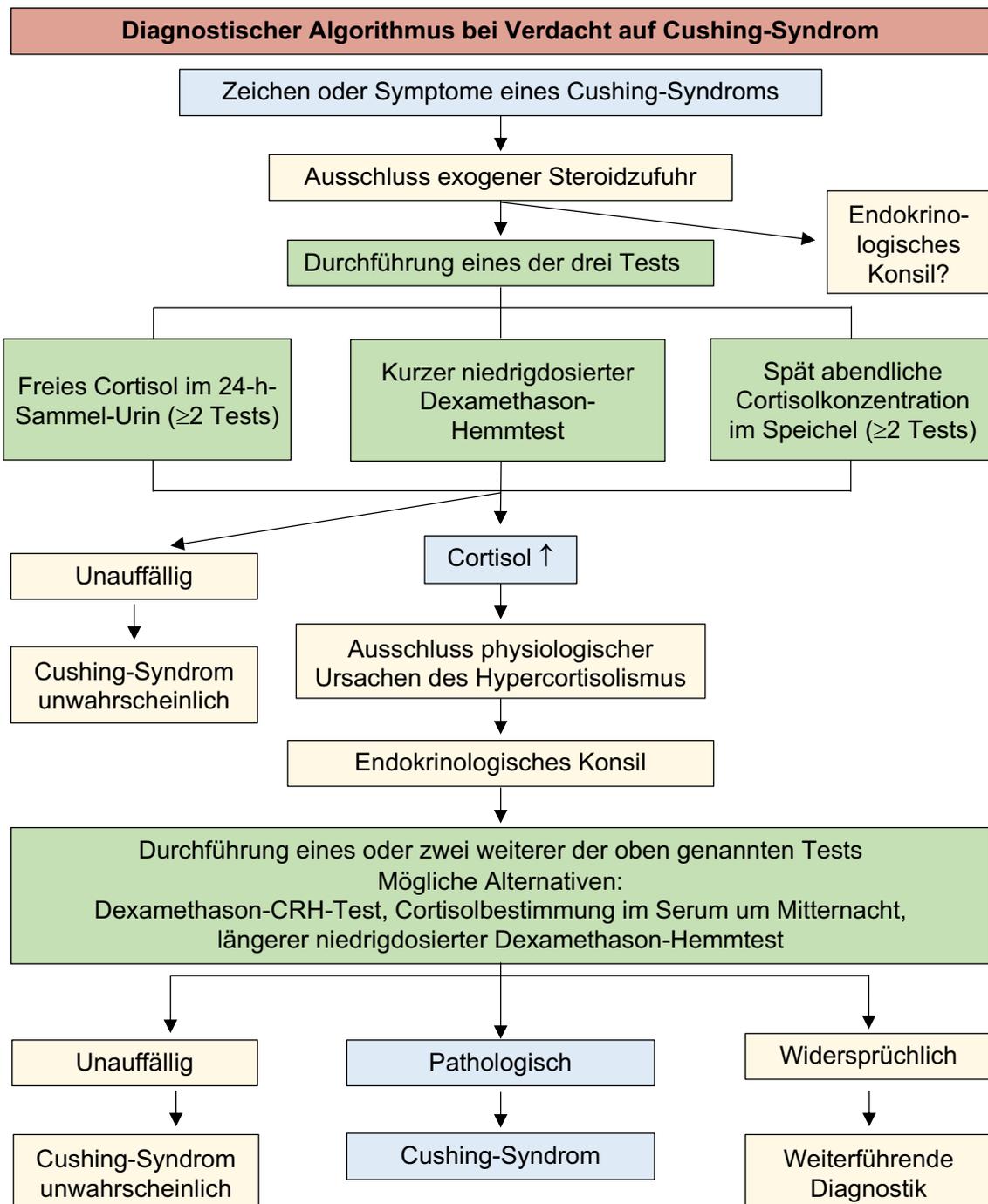
Der **ACTH-Langtest** kann auch zur Unterscheidung zwischen primärer und zentraler Nebenniereninsuffizienz herangezogen werden. Hierfür wird über 8 Stunden  $250 \mu\text{g}$  ACTH intravenös verabreicht. Kann durch die davor und danach gemessenen Cortisolwerte in Blut und Urin eine Stimulierbarkeit der Nebennierenrinde festgestellt werden, ist die Ursache zentral. Auch hier gibt es unterschiedliche Testprotokolle.

Durch einen **CRH-Stimulationstest** kann zwischen einer sekundären und tertiären Form der Nebenniereninsuffizienz unterschieden werden. Hierfür wird  $1 \mu\text{g/kg}$  CRH intravenös appliziert und die Serum-Cortisol- und Plasma-ACTH-Spiegel zwei Stunden lang mehrfach gemessen. Patienten mit einer verminderten Biosynthese von CRH durch eine Störung des Hypothalamus haben einen starken Anstieg von Cortisol und ACTH. Dies bleibt bei der sekundären Nebenniereninsuffizienz mit Störung der Hypophyse aus (Charmandari et al., 2014).

In seltenen Fällen kann eine **Bildgebung** von Kopf oder Nebennieren Hinweise auf die Ursache geben. Bei häufigem Vorkommen von Inzidentalomen sollte jedoch nicht allein wegen einer auffälligen Bildgebung die Diagnose gestellt werden.

#### 1.2.4.2 Diagnostik bei Verdacht auf Cushing-Syndrom

Zur Diagnostik bei Verdacht auf Cushing-Syndrom wird in der Regel zunächst ein orientierender Test durchgeführt. Danach sollte ein Bestätigungstest erfolgen und anschließend die Ursache untersucht werden, siehe Abbildung 5.



**Abbildung 5:** Diagnostischer Algorithmus bei Verdacht auf Cushing-Syndrom (in Anlehnung an Nieman et al., 2008).

Ein orientierender Test kann die Bestimmung des **freien Cortisols im 24-h-Sammel-Urin** sein. Dazu wird jeweils der Urin eines ganzen Tages bis zum nächsten Morgenurin gesammelt. Durch die Bestimmung allein des freien Cortisols kommt es nicht zu Messfehlern durch proteingebundenes Cortisol wie im Blut. Allerdings ist die Bestimmung abhängig von der Nierenfunktion. Ab einer Kreatinin-Clearance < 60 ml/min kann es zu falsch niedrigen Werten kommen. Eine erhöhte Flüssigkeitsaufnahme (> 5 l/d) erhöht den Cortisolwert im Urin. Zur Verbesserung der diagnostischen Qualität sollte die Sammlung an mindestens zwei Tagen erfolgen. Da der Test stark abhängig

von der *Compliance* der Patienten ist, sollte eine genaue Aufklärung und detaillierte Anleitung erfolgen. Korrekt durchgeführt zeigt dieser Test eine hohe Sensitivität und Spezifität (Deutschbein et al., 2011; Maidana et al., 2013; Popp, 2018).

Ein weiterer orientierender Test ist die **spät abendliche Cortisolkonzentration im Speichel**, wobei um Mitternacht (oder beim Zubettgehen) über ein Wattestäbchen oder ein kleines Gefäß Speichel gesammelt wird. Die Cortisolkonzentrationen im Speichel zeigen eine gute Korrelation mit den Blutkonzentrationen und sind bei Gesunden normalerweise  $< 145$  ng/dl. Durch die recht problemlose und kostengünstige Durchführbarkeit, kann dieser Test zur Aufdeckung eines zyklischen Cushing-Syndroms mehrfach angewendet werden (Deutschbein et al., 2012; Deutschbein et al., 2009; Nieman et al., 2008; Trifonova, Gantenbein, Turner, & Muller, 2013).

Als weiterer Test kann ein **kurzer niedrigdosierter Dexamethason-Hemmtest** erfolgen. Dieser wird durch die Einnahme von 1 mg Dexamethason am Abend um 23 Uhr eingeleitet, am nächsten Morgen zwischen acht und neun Uhr wird dann der Cortisolspiegel im Blut gemessen. Sollte der Cortisolspiegel erniedrigt sein, weist dies auf eine hypophysäre Ursache hin. Falls sich keine Suppression des Cortisols zeigen lässt, handelt es sich meist um eine ektope Ursache. Mit einem *Cut-off* bei  $1,8$   $\mu\text{g/dl}$  weist der Test bei einer hohen Sensitivität eine niedrige Spezifität auf (Deutschbein et al., 2009; Nieman et al., 2008; Popp, 2018).

Auch ein **längerer niedrigdosierter Dexamethason-Hemmtest** bietet sich mit einer höheren Spezifität an, allerdings, je nach Studie, mit geringerer Sensitivität. 48 Stunden lang wird  $0,5$  mg Dexamethason alle sechs Stunden eingenommen (insgesamt also  $2$  mg täglich) mit Beginn um neun Uhr morgens. Am darauffolgenden Tag wird Cortisol im Serum um neun Uhr gemessen. Je nach Autor ergeben sich Unterschiede im Protokoll und in den Grenzwerten (Newell-Price, Bertagna, Grossman, & Nieman, 2006; Nieman et al., 2008).

Die Bestimmung des freien Cortisols im Urin und der niedrig dosierte Dexamethason-Hemmtest scheinen am ehesten ein Cushing-Syndrom detektieren zu können. Für einen Ausschluss der Diagnose in nicht vorselektiertem Patientenkollektiv scheinen diese wie die anderen genannten Tests nur begrenzt anwendbar zu sein (Elamin et al., 2008). Bei Hinweisen auf pathologische Testergebnisse sollte immer noch ein zweiter Test durchgeführt werden und der Patient in eine endokrinologische Behandlung verwiesen werden. Für die zweite Testung kann ein anderer der oben beschriebenen Tests angewendet werden oder einer der beiden nachfolgenden Tests (Guignat & Bertherat, 2010).

Die Bestimmung des **Cortisols im Serum um Mitternacht** gibt Anhalt für ein Cushing-Syndrom, falls der Wert nicht das physiologische nächtliche Absinken zeigt, sondern weiterhin erhöht bleibt. Allerdings muss dieser Test in stationärem Umfeld erfolgen, da die Blutentnahme beim schlafenden Patienten erfolgen soll.

Durch einen **kombinierten Dexamethason-CRH-Test** soll die Testschärfe verbessert werden. Das Testprotokoll ähnelt dem längeren niedrigdosierten Dexamethason-Hemmtest, allerdings erfolgt hier zwei Stunden nach der letzten Dexamethason-Gabe eine einmalige intravenöse CRH-Gabe. Die Cortisolmessung erfolgt nach 15 Minuten. Bei Gesunden wird die Cortisolausschüttung unterdrückt. Patienten mit Morbus Cushing zeigen so häufiger eine Erhöhung des Cortisol- und des ACTH-Wertes als bei alleiniger Dexamethason-Gabe. Allerdings ist auch hier die Spezifität und Sensitivität unterschiedlich je nach Studie (Alwani et al., 2014; Nieman et al., 2008).

Erhärtet sich der Verdacht auf einen Hypercortisolismus durch übereinstimmende pathologische Ergebnisse hilft bei der Ursachenforschung der Blick auf den **ACTH-Spiegel im Blut**. Hierbei ist die Präanalytik anspruchsvoll, denn die Bestimmung erfordert die Blutabnahme in ein gekühltes EDTA-Röhrchen, das weiterhin gekühlt im Labor sofort analysiert werden sollte. Die Verwendung von hochsensiblen Assays ist besonders wichtig, um ACTH nachweisen zu können und die Konzentration adäquat bestimmen zu können. Falls ACTH dennoch nicht nachweisbar sein sollte ( $< 10$  pg/ml), Cortisol aber erhöht ist, spricht dies für ein adrenales Cushing-Syndrom. Allerdings kann der ACTH-Spiegel in manchen Fällen nicht vollständig unterdrückt und der Cortisolspiegel zeitweise normal sein. ACTH-Spiegel über 20 pg/ml sprechen für eine ACTH-abhängige Ursache. Ein höherer ACTH-Spiegel spricht für eine ektope Produktion, allerdings gibt es hier Überlappungen mit hypophysärem Cushing-Syndrom. Bei dazwischen liegenden Werten muss ein weiterer Test vorgenommen werden (Arnaldi et al., 2003; Nieman et al., 2008; Raff & Carroll, 2015).

Ein weiterer Test ist der **höherdosierte Dexamethason-Hemmtest**. Die Sekretion der meisten hypophysären Adenome ist durch hohe Dexamethason Dosen noch unterdrückbar, im Gegensatz dazu sind ektope Tumore meist unabhängig von den Rückkopplungsmechanismen. Auch in adrenalem Cushing-Syndrom findet keine Unterdrückung der Cortisolsekretion statt, da sie bereits unabhängig von den stark erniedrigten ACTH-Spiegeln sind. Wiederum sind die beschriebenen Testprotokolle nicht einheitlich, doch mit keinem kann eine vollständige Diskrimination zwischen Morbus Cushing und ektope Cortisolproduktion erreicht werden (maximale Sensitivität 80 %). Unter den beschriebenen Tests ist ein zweitägiger oraler hoch dosierter Dexamethasontest (2 mg alle 6 Stunden), eine einmalige orale 8 mg

Dexamethasongabe und eine einmalige intravenöse 4–7 mg Dexamethasongabe vor Mitternacht. Die Bestimmung des Cortisolspiegels erfolgt in Plasma oder Urin und wird vor, während und nach der Dexamethasongabe bestimmt (Arnaldi et al., 2003).

Der im Zusammenhang mit einer verminderten Cortisolproduktion beschriebene **Corticotropin-Stimulationstest** kann auch zur Unterscheidung zwischen adrenalem und hypophysärem Cushing dienen. Die Durchführung erfolgt analog. Bei der Interpretation spricht keine oder eine geringe Cortisol- oder ACTH-Antwort auf den CRH-Stimulus für eine adrenale Genese. Die meisten hypophysären, aber auch wenige ektope, ACTH-produzierende Tumore verstärken auf den CRH-Stimulus hin ihre sekretorische Aktivität (Arnaldi et al., 2003).

Wenn nun also durch die Hormonbestimmung und Stimulationstests ein eindeutiger Verdacht auf die Ursache des Hypercortisolismus gegeben ist, sollte eine zielgerichtete **Bildgebung der Hypophyse oder der Nebennieren** erfolgen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass ca. 10 % der Bevölkerung ein Inzidentalom in der Hypophyse aufweisen (Labeur et al., 2006). Zur Sicherung der Diagnose kann bei ansonsten nicht zielführender Diagnostik eine spezielle Blutentnahme mit ACTH-Bestimmung bei einer **Sinus-Petrosus-Katheterisierung** in spezialisierten Zentren erfolgen. Bei V.a. eine ektope ACTH-Produktion sollte ein Computertomogramm oder Magnetresonanztomogramm von Hals, Thorax oder Abdomen erfolgen (Arnaldi et al., 2003; Schäffler, 2015).

#### 1.2.4.3 Diagnostische Verfahren unter Hydrocortisonsubstitution

Das Therapiemonitoring bei Substitution mit Hydrocortisonpräparaten ist vielgestaltig. Zur Bestimmung der adäquaten Hydrocortisondosierung konnte sich noch kein einfaches Verfahren durchsetzen. Einige Autoren verzichten auf ACTH-Konzentrations-Bestimmungen und passen die Dosis nach klinischen Kriterien an, wie Gewicht, Blutdruck und Stimmung (Bornstein et al., 2016). Betroffenen Patienten bereitet ihre Medikation jedoch Schwierigkeiten, so geben einige sogar an sie zu hassen. Hierdurch ist die Lebensqualität reduziert (Tiemensma et al., 2014). Zu den Möglichkeiten ein Rezidiv im Falle eines Hypercortisolismus möglichst frühzeitig erkennen zu können, zählen die biochemischen Tests, die auch zur Primärdiagnostik angewendet werden. So sind die Messung des nächtlichen Cortisolspiegels im Speichel, die Messung des freien Cortisols im Sammelurin oder ein niedrigdosierter Dexamethason-Hemmtest dafür geeignet, problematisch ist dabei jedoch, dass die Substitution ggf. kurzzeitig abgesetzt werden muss (Findling et al., 2016).

### 1.3 Aktueller Stand der Forschung zur Nachweisbarkeit von Cortisol im Haar

Während Haaranalysen schon längere Zeit vor allem zur qualitativen Detektion körperfremder Substanzen in Drogen- oder Dopingscreenings genutzt werden (Gaillard, Vayssette, & Pepin, 2000; Raul et al., 2004), zeigt sich in den letzten Jahren ein besonderes Augenmerk auf quantitativen Analysen körpereigener Substanzen zum besseren Verständnis pathophysiologischer Zusammenhänge (Cassani & Spiehler, 1993; Meyer & Novak, 2012; Russell et al., 2012; Stalder & Kirschbaum, 2012; Wennig, 2000).

Verschiedenen kleinere Studien zeigen, dass Cortisol im Haar nachweisbar ist und die körpereigene Cortisolsekretion über einen längeren Zeitraum hinweg widerspiegelt (Manenschijn et al., 2012; Thomson et al., 2010; Wester et al., 2017). Die Stärke des Zusammenhangs zwischen den Haarproben und den korrespondierenden jeweiligen Speichel-, Blut- oder Urinproben nimmt mit der Anzahl der zueinander in Beziehung stehenden Proben zu (D'Anna-Hernandez et al., 2011; Herane Vives et al., 2015; Iglesias et al., 2015; Short et al., 2016; Stalder & Kirschbaum, 2012; van Holland, Frings-Dresen, & Sluiter, 2012; Xie et al., 2011).

Zunächst wurde Haarcortisol vor allem in Studien zu Stress gemessen (Bates, Salsberry, & Ford, 2017; Gow et al., 2010; Sauve et al., 2007; Stalder & Kirschbaum, 2012). Später wurden weitere Erkrankungen wie Angststörungen (Luo et al., 2012; Steudte et al., 2011), Depression (Staufenbiel, Penninx, de Rijke, van den Akker, & van Rossum, 2015; Wei et al., 2015), Übergewicht und kardiovaskuläre Erkrankungen (Manenschijn, Koper, Lamberts, & van Rossum, 2011) in einzelnen kleineren Studien untersucht.

Um 2012 erschienen verschiedene Metaanalysen, die zum einen den Zusammenhang von Haarcortisol mit psychiatrischen oder somatischen Erkrankungen näher beleuchteten und zum anderen die Methoden der Haaranalysen selbst zusammenfassten und kritisch hinterfragten (Meyer & Novak, 2012; Russell et al., 2012; Stalder & Kirschbaum, 2012; Staufenbiel, Penninx, Spijker, Elzinga, & van Rossum, 2013). Um eine größere Vergleichbarkeit zu ermöglichen wurden vereinzelt Ringversuche verschiedener Laboratorien und Vergleiche verschiedener Messmethoden wie ELISA und Massenspektrometrie unternommen (Russell et al., 2015; R. Slominski, Rovnaghi, & Anand, 2015). 2016 veröffentlichte Abell Daten eines großen Kollektivs. Im Rahmen der Whitehall II Studie wurde bei über 3000 britischen Beamten zusammen mit anderen Parametern der Haarcortisolspiegel bestimmt (Abell et al., 2016). Immer mehr Zusammenfassungen und größere epidemiologische Studien

konnten veröffentlicht werden (Herane Vives et al., 2015; Staufenbiel, Penninx, et al., 2015; Wester & van Rossum, 2015; Wosu, Valdimarsdottir, Shields, Williams, & Williams, 2013).

Zunehmend rücken endokrinologische Erkrankungen mit Veränderungen des Cortisolspiegels in den Vordergrund (Manenschijn et al., 2012; Thomson et al., 2010; Wester et al., 2017). Auch der Zusammenhang der endogenen Cortisolproduktion mit dem metabolischen Syndrom ist Gegenstand der Forschung (Constantinopoulos et al., 2015; Kuehl et al., 2015; Stalder et al., 2013).

## 1.4 Einflussfaktoren des Haarcortisolspiegels in der Literatur

In der Literatur wurden verschiedene Faktoren, die einen Einfluss auf die Konzentration des Cortisols im Haar haben könnten, untersucht und beschrieben. Weder stimmten die Ergebnisse immer überein, noch wurden dieselben Parameter erhoben.

Frauen scheinen, ebenso wie jüngere Personen, einen geringeren Haarcortisolspiegel aufzuweisen als Männer (Abell et al., 2016; Staufenbiel, Penninx, et al., 2015), wobei die Einnahme von oralen Kontrazeptiva dies zusätzlich beeinflusst (Staufenbiel, Penninx, et al., 2015). Dies wurde zuvor bereits für Cortisol im Speichel bestätigt (Martens, Lemmens, Adam, & Westerterp-Plantenga, 2012). Sowohl Haarwachstum als auch Haarfarbe weisen interindividuelle wie ethnische Unterschiede auf, bei denen sich teilweise eine Auswirkung auf den Haarcortisolspiegel zeigen ließ (Loussouarn et al., 2005; Luo et al., 2012; Staufenbiel, Penninx, et al., 2015).

Recht eindeutig zeigt sich der Einfluss von größeren mit Stress verbundenen Lebensereignissen oder Erkrankungen, die eine Erhöhung des Haarcortisolspiegels mit nachfolgender Erniedrigung bewirken (Grassi-Oliveira et al., 2012; Karlen, Ludvigsson, Frostell, Theodorsson, & Faresjo, 2011; Steudte et al., 2011).

Weitere Faktoren, denen ein Einfluss auf den Cortisolgehalt im Haar zugerechnet wurde, waren Alkohol und Nikotinkonsum (Braig et al., 2015; Dettenborn, Tietze, Kirschbaum, & Stalder, 2012) sowie physische Aktivität (Staufenbiel, Penninx, et al., 2015) und Parameter des metabolischen Syndroms wie Übergewicht und hoher Blutdruck (Braig et al., 2015; Kuehl et al., 2015).

Der Cortisolgehalt im Haar, unabhängig vom individuellen systemischen Cortisolspiegel, wird durch Haarfärben und eine längere Lagerung der Proben verringert (Hoffman, Karban, Benitez, Goodteacher, & Laudenslager, 2014). Auch Haarwaschen und Seife

verringern den messbaren Cortisolgehalt im Haar (Hamel et al., 2011). Widersprüchliche Angaben werden zu jahreszeitliche Schwankungen gemacht, Abell fand im Sommer verringerte Werte (Abell et al., 2016) und Staufenbiel im Winter (Staufenbiel, Penninx, et al., 2015). Die Haarcortisolkonzentration nimmt vom Haaransatz bis zu den Spitzen normalerweise stetig ab (Dettenborn, Tietze, Bruckner, & Kirschbaum, 2010).

Darüber hinaus gibt es Zusammenhänge, die über den Einzelnen hinausgehen. So beeinflusst der mütterliche Bildungsgrad den kindlichen Stress, der sich im Haarcortisolspiegel des Kindes widerspiegelt (Bosma et al., 2015; Vaghri et al., 2013). Bei niederländischen Grundschulkindern korrelierten sogar die Postleitzahlen im Sinne sozioökonomischer Unterschiede mit dem Haarcortisolspiegel (Vliegthart et al., 2016).

Die Messung des Haarcortisols in verschiedenen Laboren erfolgte auf verschiedene Arten und erbrachte unterschiedliche Messbereiche. Grundsätzlich wurden entweder immunologische Methoden verwendet, wie *Electro-chemiluminescence-immuno-Assay* (Wei et al., 2015), *Chemiluminescence-immuno-Assay* (Dettenborn et al., 2012), *Radio-immuno-Assay* (Karlen et al., 2011) und ELISA (Xiang, Sunesara, Rehm, & Marshall, 2016), oder Massenspektrometrie (Abell et al., 2016; Noppe, de Rijke, Dorst, van den Akker, & van Rossum, 2015). Die Vorbereitung der Haarproben, ob pulverisiert oder geschnitten, beeinflusste den Haarcortisolspiegel (Herane Vives et al., 2015). Meistens wurde allein Cortisol bestimmt, aber auch Cortison zeigte sich in einigen Studien als aussagekräftiger Parameter (Kuehl et al., 2015; Stalder & Kirschbaum, 2012).

## 1.5 Aktueller Stand der Forschung zur Nachweisbarkeit von Cortisol im Fingernagel

Bisher wurden wenige Versuche veröffentlicht, Cortisol in Fingernägeln zu messen. Bereits 2010 wurde DHEA und Cortisol in Fingernägeln mittels antikörperbasierter Methoden gemessen, allerdings erschien dabei DHEA zuverlässiger zu messen (Russell et al., 2012; Warnock et al., 2010). Mit der zunehmenden Verbreitung von Massenspektrometern konnten zahlreichere und größer angelegte Studien damit durchgeführt werden (Ben Khelil et al., 2011; Binz et al., 2018; Higashi et al., 2016; Voegel et al., 2018). Hierbei zeigten sich wiederum psychiatrische Kohortenstudien als aussagekräftig. Von Vorteil ist, dass Fingernagelschneiden in den meisten Kulturen als weniger belastend empfunden wird als die Entnahme von Haarsträhnen. Genauere Analysen der Einflüsse auf den Cortisolspiegel in Fingernägeln stehen allerdings noch aus (Doan, DeYoung, Fuller-Rowell, Liu, & Meyer, 2018; Herane-Vives et al., 2018; Izawa et al., 2015).

## 1.6 Zielsetzung

In Zusammenschau der aktuellen Literatur zeigt sich die Messung des Cortisolspiegels in Haar und Fingernagel als vielversprechender Parameter zur Diagnostik bei endokrinologischen Erkrankungen, die den Cortisolhaushalt betreffen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung dieser kürzlich beschriebenen Methode zur Cortisolbestimmung im Rahmen der endokrinologischen klinischen Forschung, die Erprobung alternativer Bestimmungsmöglichkeiten des Cortisolspiegels und die Implementierung der Haarcortisolmessung in die klinische Routine. Es wurden verschiedene Messprotokolle miteinander verglichen, ihre Praktikabilität überprüft und mögliche beeinflussende Variablen des Haarcortisolspiegels untersucht. Dabei konnte auf bereits veröffentlichte Erfahrungen aus großen Kohortenstudien oder Einzelfallbeschreibungen zurückgegriffen werden. Der Fokus der Arbeit liegt auf der Notwendigkeit der Etablierung von Einflussfaktoren, laborinternen Referenzwerten sowie der externen Validierung.

Ergänzend wird im Rahmen einer monozentrischen, nicht-interventionellen Studie ein Vergleich des Haarcortisolspiegels zwischen einem Kollektiv gesunder Probanden und einem Kollektiv von Patienten mit Störungen des Cortisolstoffwechsels gezogen. Damit wird die Anwendbarkeit der Methode in der klinischen Routine hinsichtlich ihrer diagnostischen Aussagefähigkeit zum Vorliegen einer Erkrankung des Cortisolstoffwechsels, insbesondere zur Feststellung der Krankheitsaktivität bei Hypercortisolismus und zur Angemessenheit der Hydrocortisonsubstitution bei Nebenniereninsuffizienz auf individueller Ebene eingeschätzt.



## **2 Methodik**

### **2.1 Ethische Aspekte**

Vor Studienbeginn wurde die Erklärung der Übereinstimmung der Studie mit der Deklaration von Helsinki abgegeben und die zuständige Ethikkommission erkannte ihr am 29.12.2015 die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zu. Die Studie wurde an erwachsenen Probanden und Patienten durchgeführt, deren schriftliche Einwilligung nach Aufklärung vorlag. Die Teilnahme an der Studie war freiwillig. Die Probanden erhielten eine Aufwandsentschädigung in Höhe von zehn Euro. Alle Daten wurden direkt nach der Erhebung anonymisiert und einer zufälligen Identifikationsnummer zugeordnet. Die Patienten wurden im Rahmen der nationalen Datenbank NeoExNet (Exzellenz-Netzwerk für neuroendokrine Tumoren) rekrutiert.

### **2.2 Zusammensetzung der Studienkohorte**

Zunächst wurden gesunde Probanden gesucht per Annonce auf der Website des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie, über das Onlineportal der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München und über neue soziale Medien und Online-Plattformen. Dabei waren Haare am Hinterkopf kürzer als drei Zentimeter sowie eine systemische Cortisolbehandlung innerhalb des letzten Monats Ausschlusskriterien.

Weiterhin konnte auf Studiendaten sowie Haarproben von Patienten mit Störungen des Cortisolhaushaltes, vornehmlich Morbus Cushing und Nebenniereninsuffizienz, zurückgegriffen werden, die sich in Behandlung der endokrinologischen Ambulanz des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie befanden und ihr Einverständnis zur Studienteilnahme im Rahmen des Exzellenz-Netzwerkes für neuroendokrine Tumoren gegeben hatten.

#### **2.2.1 Probandenkollektiv**

An der Studie nahmen 112 gesunde Personen teil. Ein Proband wurde wegen Medikamenteneinnahme nicht bei den weiteren Analysen aufgeführt, da eine Veränderung des Cortisolhaushalts nicht ausgeschlossen werden kann. Die Sammlung der Haarproben und die Erhebung der Daten fand im Zeitraum vom 05.01.2016 bis 22.08.2016 statt.

#### **2.2.2 Patientenkollektiv**

Von 63 Patienten der endokrinologischen Ambulanz des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie in München konnten Haarsträhnen von z.T. verschiedenen Zeitpunkten und

klinische Routineparameter verwendet werden. Die Haarproben stammten aus dem Zeitraum vom 18.09.2013 bis 06.04.2016. Bei neun Patienten, die sich in der endokrinologischen Ambulanz vorgestellt hatten, konnte nach eingehender Untersuchung die Verdachtsdiagnose Cushing-Syndrom wieder verworfen werden. So wurden sie zur Gruppe der gesunden Probanden gezählt. Die meisten Haarsträhnen wurden zur Untersuchung der Einflussfaktoren auf den Haarcortisolspiegel verwendet. Strähnen von 3 Patienten wurden ausschließlich für methodologische Untersuchungen verwendet.

## 2.3 Erhebung der Parameter

### 2.3.1 Datenerhebung durch Fragebögen

Die gesunden Probanden füllten verschiedene Fragebögen aus, um mögliche Einflussfaktoren auf den Haarcortisolspiegel zu erfassen. Ein eigens für diesen Zweck entworfener Fragebogen beinhaltete Alter und Geschlecht, Medikamenteneinnahme, Rauch- und Trinkverhalten, Fragen zu Haar- und Fingernagelbehandlungen sowie bei Frauen Angaben zur hormonellen Verhütung.

Weiterhin wurden standardisierte Fragebögen zu Persönlichkeit und neuropsychiatrischen Aspekten verwendet. Der Spielberger *State-Trait*-Angstinventar, kurz STAI, besteht aus zwei Fragebögen mit je 20 Punkten zu Gefühlen. Der erste Fragebogen misst die momentane Angst, der zweite das Angstgefühl im Allgemeinen. Dabei werden sowohl positive wie negative Aspekte angesprochen, die dann entsprechend ausgewertet werden. Jede Skala ergibt Ergebniswerte zwischen 20 und 80 Punkten, wobei Werte zwischen 20 und 40 Punkten ein normales Angstverhalten nahelegen, als *Cut-off* gelten 50 Punkte zu einem übermäßigen Angstempfinden (Iglesias et al., 2015).

Der Beck-Depressions-Inventar-II (BDI-II) wurde verwendet, um depressive Symptome zu detektieren. Der Fragebogen enthält 21 Gruppen von Fragen über den Gemütszustand in den letzten zwei Wochen mit einem Grad der Ausprägung von jeweils 0 bis 3. Bei einer Spanne von 0-63 Punkten liegt bei 13 Punkten der *Cut-off* zu einer milden Depression. ((AWMF), 2015; Hautzinger, Bailer, Worall, & Keller, 1994; Olivera-Figueroa et al., 2015).

### 2.3.2 Körperliche Untersuchung

Eine körperliche Untersuchung zu Größe, Gewicht, Blutdruck, Puls, Hüft- und Taillenumfang wurde durchgeführt. Zur Berechnung des *Body-Mass-Index* (BMI) wurde zum einen das Gewicht, das durch eine geeichte Waage der Ambulanz des Max-Planck-

Instituts für Psychiatrie (*Body Composition Analyzer BC-418 MA* Tanita Corporation, Tokyo) bestimmt wurde, verwendet, und zum anderen die Größe der Probanden, die mithilfe einer Messlatte Dr. Keller I (Längenmeßtechnik GmbH Limbach-o.) ermittelt wurde. Der Blutdruck wurde mit einer Blutdruckmanschette auskultatorisch manuell und der Puls palpatorisch ermittelt. Mit einem Maßband wurde an der stärksten Stelle über der Hüfte der Hüftumfang und zwei Zentimeter unterhalb der Rippen waagrecht der Taillenumfang gemessen.

Bei den Patienten konnte weiterhin auf Laborwerte zurückgegriffen werden. Eine Einordnung des Blutfettgehalts wurde im Serum über die Höhe der Triglyceridwerte in mg/dl vorgenommen. Die Bestimmung der  $\gamma$ -GT in U/l als ein Leberenzym gab Auskunft über die Leberfunktion. Über den HbA1c-Wert in % aus dem EDTA-Plasma ließ sich eine Aussage über die Blutzuckerkonzentrationen der letzten sechs Wochen treffen.

Die Substitutionsdosis einer möglichen Hydrocortisontherapie und das verwendete Präparat, wie etwa sofort wirksames Hydrocortison oder das *dual-release* Präparat Plenadren<sup>®</sup> wurde den Aufzeichnungen der Patientenakte entnommen.

Von einigen gesunden Probanden wurden Speichelproben zur DNA-Untersuchung entnommen, diese wurden jedoch für diese Studie noch nicht ausgewertet.

### 2.3.3 Entnahme der Haarsträhnen

Da am Hinterkopf das Haarwachstum am regelmäßigsten ist und somit ein ungefähres Wachstum von einem Zentimeter pro Monat angenommen werden kann, wurden zwei Haarsträhnen von dort entnommen (Sauve et al., 2007; Wennig, 2000). Dazu wurden zunächst mit einem Faden die im Durchmesser 2–3 mm dicken Haarsträhnen abgeteilt und dann mit einer Friseurschere direkt am Haaransatz abgeschnitten. Zur Aufbewahrung wurden die Haarsträhnen in Aluminiumfolie eingeschlagen, bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert und vor Feuchtigkeit und Sonnenlicht geschützt.

### 2.3.4 Entnahme der Fingernägel

Die Fingernägel wurden mit einer haushaltsüblichen Nagelschere so nah wie möglich am Hyponychium von den Probanden selbst abgeschnitten und ebenfalls in Aluminiumfolie aufbewahrt. Verwendet wurden diejenigen Nagelstücke, die zusammen mindestens 5 mg wogen, um genügend Material für die Messungen zu erhalten.

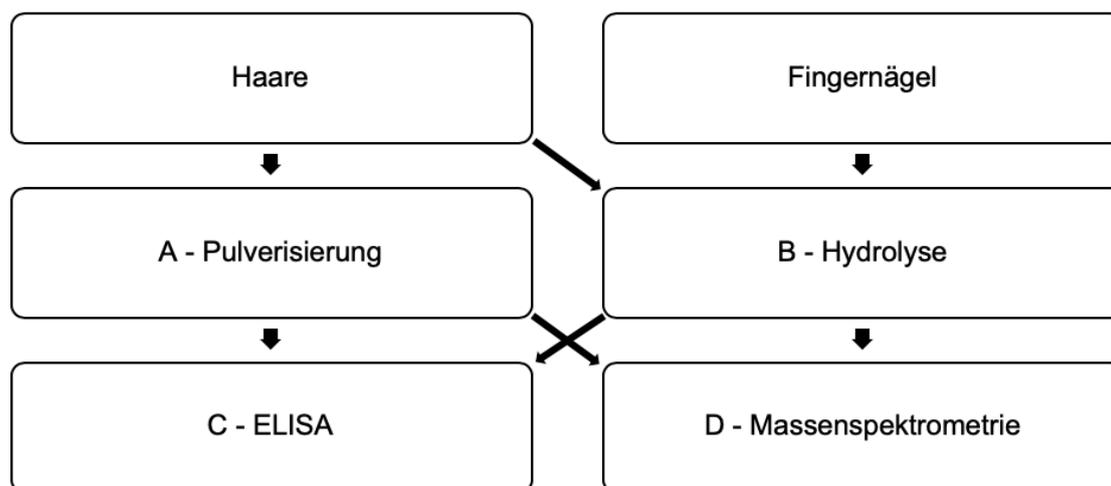
## 2.4 Probenaufbereitung

### 2.4.1 Aufbereitung der Materialien

Bei allen Haarproben wurde der zu messende Anteil der Haarsträhne mit einer handelsüblichen Haarschere abgeschnitten. Für die meisten Versuche wurden die ersten 30 mm Haare verwendet, die je nach Strähnendicke zwischen 10 und 80 mg Haar enthielten. Bei methodologischen Untersuchungen wurden teilweise auch längere Haarsträhnen verwendet. Die Haare wurden nicht gewaschen.

Der größte Teil der Proben wurde mit einer Retsch Schwingmühle MM400 in einem Mahlbecher gemahlen. Mithilfe des YSTP-01 Stat-Pen Ionisierungsstabes (Sartorius) konnten 10 mg Haar auf der Analysenwaage *New Classic MS* von Mettler Toledo abgewogen werden. Dieser Teil wurde mit A bezeichnet. Ein kleinerer Teil wurde alkalisch hydrolysiert. Dies wurde Teil B genannt. Anschließend wurde bei allen Haarproben das Cortisol mit Methanol (Sigma 494437) extrahiert. Der Cortisolgehalt der Proben wurde immunologisch (Teil C) und teilweise massenspektrometrisch (Teil D) bestimmt. Massenspektrometrische Analysen wurden zum einen im *Genome Analysis Center* des Helmholtz Zentrums München und zum anderen im Labor der Klinischen Chemie des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie durchgeführt.

Die Fingernägel wurden analog Teil B aufbereitet, allerdings stand dabei weniger Material zu Verfügung, so dass 5 mg Fingernagel verwendet wurden. Die Methoden sind in Abbildung 6 in einer Übersicht dargestellt und werden im Folgenden genauer erläutert.



**Abbildung 6:** Übersicht der verwendeten Methoden zur Cortisolbestimmung.

### 2.4.2 Pulverisierung (Teil A)

30 mm Haare vom Haaransatz wurden ohne weitere Vorbehandlung mithilfe des *Stat-Pen* Ionisierungsstabes in einen 25 ml fassenden Mahlbecher eingefüllt und mit einer Stahlkugel von 15 mm Durchmesser durch die Retsch Schwingmühle MM 400 fünf Minuten lang bei 30 Hz fein gemahlen. Von den gemahlenden Proben wurden 10 mg auf der Analysenwaage *New Classic* MS von Mettler Toledo abgewogen und in ein Polystyrol-(PS)-Spitzröhrchen gegeben. Die verbleibende Haarmenge wurde für eventuelle Nachmessungen und weitere Versuche in verschlossenen PS-Spitzröhrchen im Kühlschrank gelagert. In Vorversuchen zeigte PS günstigere Eigenschaften für die Wiederfindung zugesetzten Hydrocortisons als Polypropylen oder Glas. In den mit Stopfen verschlossenen PS-Spitzröhrchen wurde für die Extraktion das Cortisol mit 1 ml 100 % Methanol (Sigma 494437) über 24 Stunden bei Raumtemperatur im Haake Buchler *Instruments Evapotec Vortex Evaporator* 4322000 auf Stufe 2 geschüttelt. Nach 10-minütiger Zentrifugation durch die Heraeus Multifuge 4KR mit 4000 upm wurde der Überstand abpipettiert bzw. abgegossen. Das Haarpellet am Boden wurde verworfen. Der Überstand wurde in einem neuen PS-Spitzröhrchen über weitere mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur evaporiert bis zur vollständigen Trocknung der Cortisollösung. Danach wurden die Proben entweder sofort weiterverarbeitet oder mit Stopfen verschlossen lichtgeschützt bei 6 °C gelagert.

### 2.4.3 Alkalische Hydrolyse (Teil B)

Die geschnittenen und abgewogenen Proben wurden in ein PS-Spitzröhrchen gegeben und mit 400 µl 1-molarer Kalilauge bei 54 °C 30 Minuten lang inkubiert. Durch eine anschließende Zentrifugation (4000 upm, 5 min) wurde sichergestellt, dass das gesamte Material von der Lauge bedeckt war, danach wurde die Inkubation weitere 18 Stunden bei 54 °C fortgesetzt. Die Neutralisation erfolgte mit 67 µl 3-molarer Schwefelsäure. Anschließend wurde das Cortisol mit 1 ml 100 % Methanol (Sigma 494437) herausgelöst und der Überstand nach Zentrifugation durch die Heraeus Multifuge 4KR bei wiederum 4000 upm für fünf Minuten abpipettiert bzw. abgegossen, der Überstand über weitere mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur bzw. im *SpeedVac* evaporiert und das Cortisol luftgetrocknet. Danach wurden die Proben wiederum entweder sofort weiterverarbeitet oder mit Stopfen verschlossen lichtgeschützt bei 6 °C gelagert.

### 2.4.4 Messung mit ELISA (Teil C)

Das verwendete ELISA *DetectX<sup>®</sup> Cortisol Enzyme Immunoassay Kit* stammte von *Arbor Assays* und kann dazu verwendet werden, den Cortisolgehalt in getrockneten Fäzes, Speichel, Urin, Serum, Plasma und Gewebeproben zu messen.

Die Bestimmung des Cortisolgehalts bei dem verwendeten Kit beruhte auf einer Antikörper-Antikörper-Reaktion. Der ELISA zeigte diese immunologische Reaktion mit einem Farbumschlag an, der indirekt proportional der in der Probe enthaltenen Cortisolmenge entsprach. Durch verschiedene Cortisolstandards, die bei jeder Platte mitgemessen wurden, konnte eine Standardkurve zur Umrechnung erstellt werden.

Zur Vorbereitung wurde das getrocknete Haarextrakt aus den Teilen A bzw. B wieder in 250 µl Assay-Puffer gelöst, zehn Minuten im Evaporator bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend zehn Minuten bei 4000 upm zentrifugiert.

Die cortisolhaltigen Standards und verwendeten Wasch- bzw. Assay-Puffer wurden nach Vorschrift des ELISA-Kits vorbereitet. Zunächst wurden je 50 µl der cortisolhaltigen Proben bzw. Standards sowie 25 µl des Cortisol-Peroxidase-Konjugates mit einer Mehrkanalpipette Multipette von Eppendorf auf eine mit Anti-Maus-IgG-Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert. Die Reaktion begann nach Zugabe von 25 µl eines gegen Cortisol gerichteten Ziegen-Anti-Maus-Antikörpers wiederum mit Mehrkanalpipette in alle Kavitäten. Nach einer Stunde Schütteln mit Duomax 1030 von Heidolph bei Raumtemperatur wurden die ungebundenen Substrate viermal mit 300 µl Waschlösung mithilfe einer Mehrkanalpipette abgewaschen und danach mit einem Papierhandtuch vorsichtig abgetrocknet. Durch Zugabe von 100 µl des Substrates der Peroxidase (TMB) konnte eine Lichtreaktion ausgelöst werden. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl einer Stopp-Lösung beendet. Direkt im Anschluss wurde die optische Dichte im Photometer Dynatech MR 5000 *Microplate Reader* bei 450 nm vermessen. Die Reaktion des ELISA ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

Bei allen Proben und Standards wurde der cortisolhaltige Überstand als Doppelwert im ELISA gemessen und die Ergebnisse gemittelt. Anschließend wurde mit *Microsoft Office Excel* 2016 die in den Proben enthaltene Cortisolmenge berechnet und auf die Haarmenge umgerechnet.

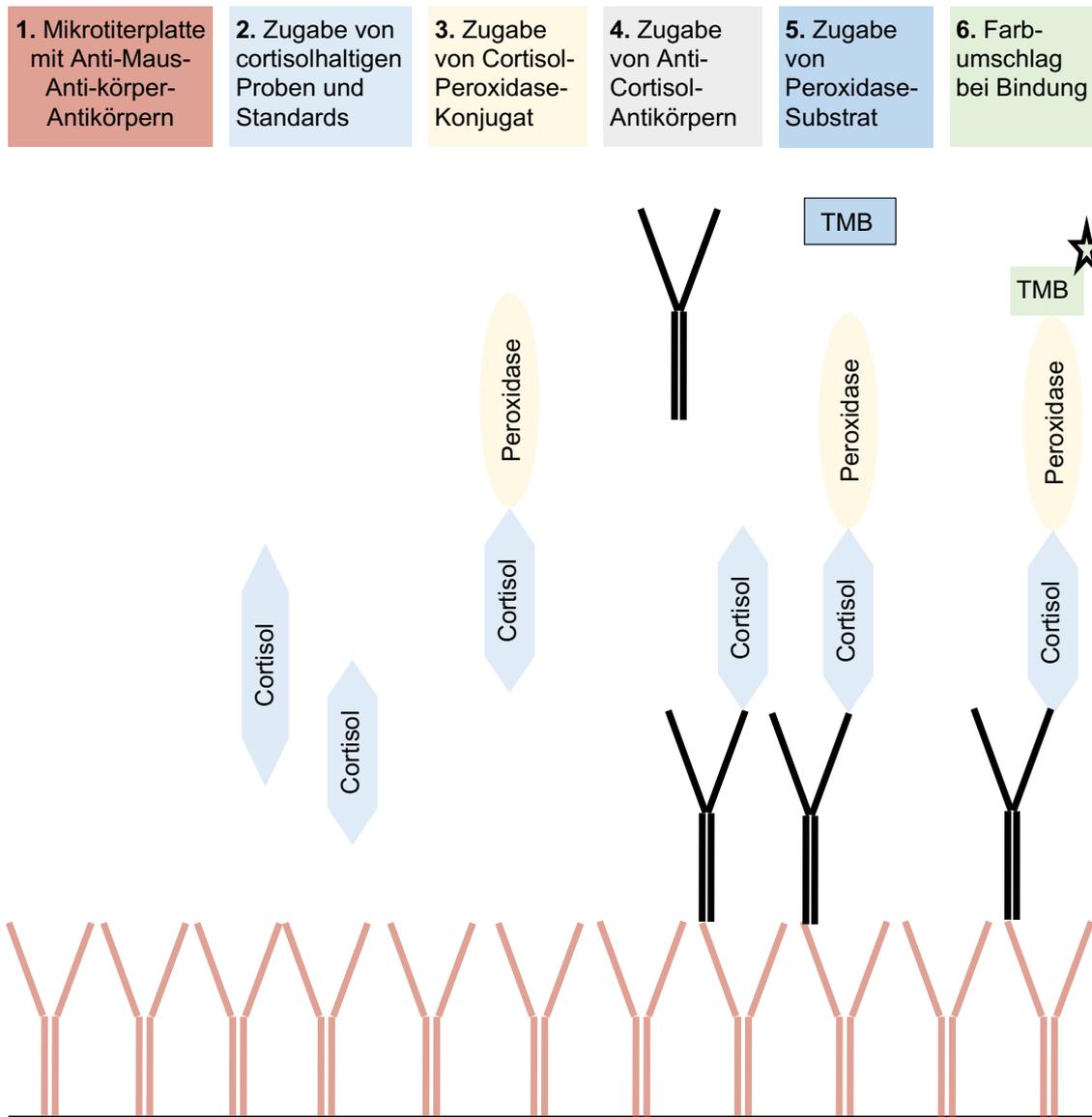


Abbildung 7: Schema der Reaktion des ELISA.

### 2.4.5 Validierung der Messmethode des Haarcortisols mit ELISA

In der Literatur wurden verschiedene Methoden beschrieben, mit denen der Haarcortisolspiegel gemessen wurde. Nach Vorversuchen und aufgrund der Erfahrung mit ähnlichen Messmethoden wurde der ELISA *DetectX<sup>®</sup> Cortisol Enzyme Immunoassay Kit* von *Arbor Assays* verwendet. Diese Methode ist zur Messung des Cortisolgehalts in verschiedenen Medien wie Blut und Speichel bereits validiert. Die Validierung der Messung des Haarcortisols im Rahmen dieser Studie wurde zu Beginn durchgeführt. Durch mehrfache Messungen mit Referenzproben wurde die Messgenauigkeit intern überprüft. Auf die weiterführenden externen Vergleiche mit Massenspektrometrie und Chemielumineszenz durch andere Labore wird im Verlauf genauer eingegangen.

Die Genauigkeit der Messungen wurde auf zweifache Art überprüft. Zur Aufdeckung systematischer Messfehler wurde die Wiederfindung bei Proben mit einem festgesetzten

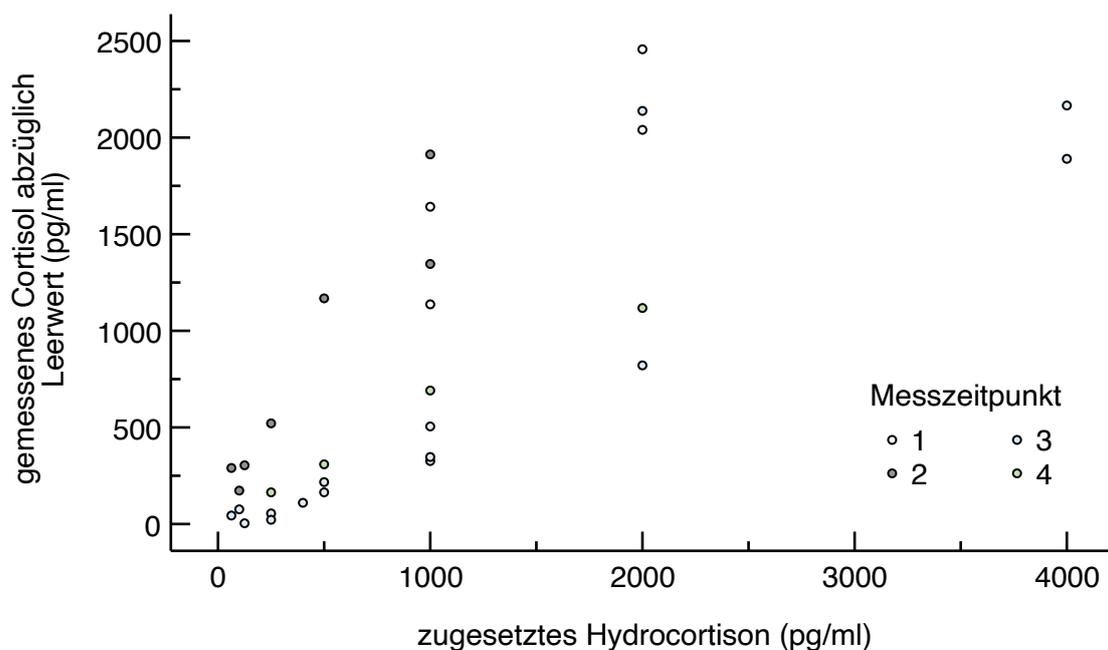
Cortisolgehalt analysiert. Zur Aufklärung zufälliger Messabweichungen wurde die Streuung bei Wiederholungsmessungen untersucht.

#### 2.4.5.1 Richtigkeit anhand von Wiederfindungsraten

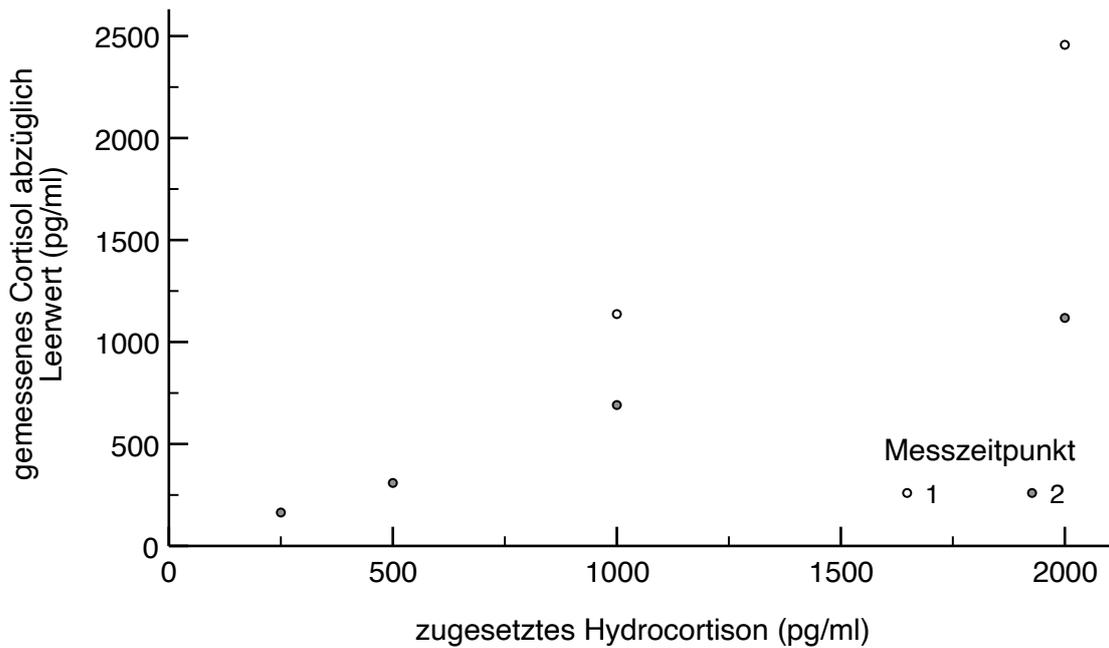
Die Überprüfung der Wiederfindung wurden durchgeführt mit Zugabe von definierten Mengen Hydrocortison von Sigma (H0888-1G) zu in Methanol gelösten Haaren mit niedrigem Cortisolgehalt sowie mit Zugabe von definierten Mengen Hydrocortison zu 100 % Methanol ohne Haare. Die Messungen fanden zu vier verschiedenen Messzeitpunkten von Oktober 2015 bis März 2016 statt. Alle Proben wurden weiter analysiert wie bei Teil A und Teil C beschrieben.

Anhand einer Verdünnungsreihe wurden Messpunkte von 4000 pg, 2000 pg, 1000 pg, 500 pg, 250 pg, 125 pg bis 62,5 pg Hydrocortison/ml Lösungsmittel abgedeckt. Bei Messung ohne Haare konnte der unterste Wert teilweise nicht bestimmt werden, da ohne den zusätzlichen Cortisolgehalt der Haare die untere Nachweisgrenze, die sich aus der Eichkurve des ELISA ergibt, unterschritten wurde.

Mathematisch wurde bei Messungen mit Haaren der mitbestimmte Cortisolgehalt und bei Messungen ohne Haare der Leerwert der Methanollösung - falls messbar - subtrahiert. Die Wiederfindung lag in einem Bereich zwischen 3 % und 243 % bei Hydrocortison in Haaren gelöst (siehe Abbildung 8) und zwischen 56 % und 123 % bei Lösung nur in Methanol (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 8:** Vergleich des zugesetzten und gemessenen Cortisols in Haaren.



**Abbildung 9:** Vergleich des zugesetzten und gemessenen Cortisols in Methanollösung.

#### 2.4.5.2 Präzision anhand von Messwiederholungen

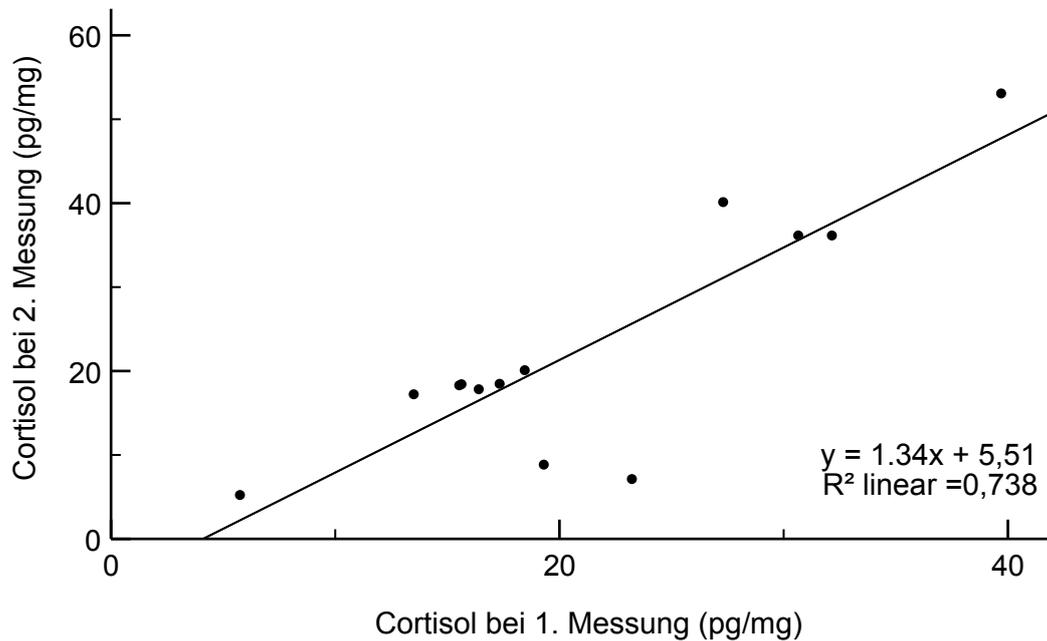
Mittels Messwiederholungen sollte nun eine zufällige Streuung der Messwerte überprüft werden. Zunächst wurden dieselben Haare auf derselben Platte zum gleichen Zeitpunkt wiederholt gemessen. Dafür wurde dieselbe Strähne eines Probanden verwendet, von dieser 5-mal 10 mg abgewogen und nach Protokoll A und C weiterbehandelt. Davon wurden jeweils zwei Proben an verschiedenen Stellen gemessen. Für jedes dieser Probenpaare berechnet ergibt sich ein Variationskoeffizient (CV) von 2,9 % – 9,7 %, allerdings für alle zehn Proben gemeinsam berechnet ergibt sich ein CV von 69 % (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Anordnung der Wiederholungsmessungen auf der Platte.

	Reihe 1	Reihe 2	CV
Spalte 1	7,0	-	-
Spalte 2	10,8	12,0	7,0 %
Spalte 3	10,9	9,7	8,6 %
Spalte 4	36,2	34,7	2,9 %
Spalte 5	12,7	11,1	9,7 %

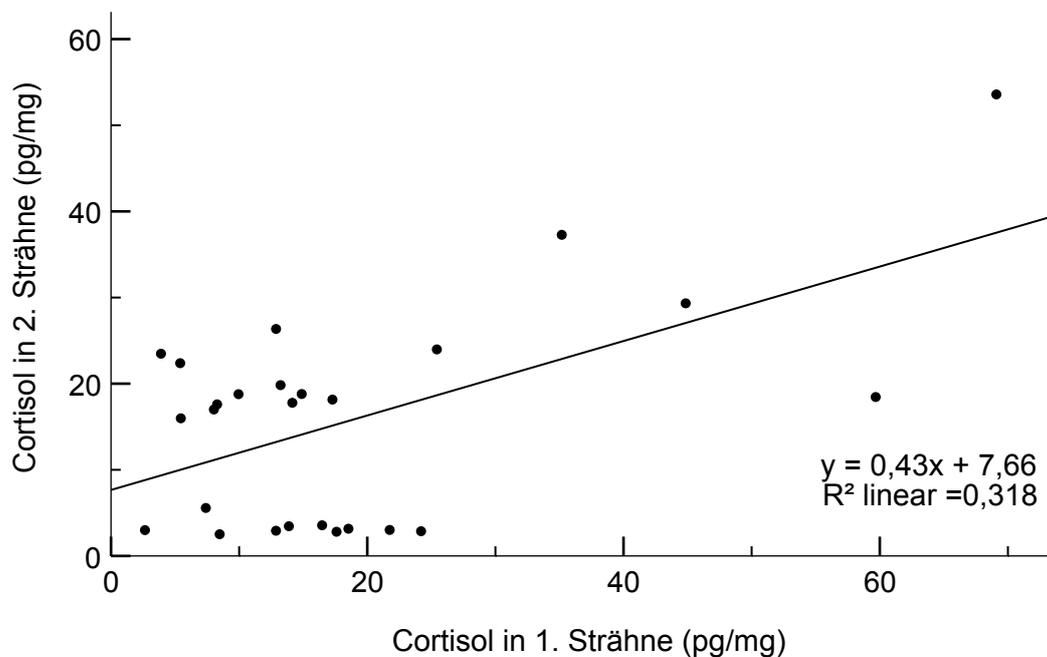
Zur Überprüfung der Variabilität wurden jeweils zwei Messungen verglichen und über deren Mittelwert (M) sowie Standardabweichung (SD) ein Korrelationskoeffizient bestimmt. Dies wurde bei 13 Probanden von derselben Strähne durchgeführt und so

Korrelationskoeffizienten von  $19,9 \pm 21,0$  % berechnet. In Abbildung 10 ist der Vergleich grafisch dargestellt.



**Abbildung 10:** Messvergleich bei Verwendung derselben Haarsträhne (n=13).

Außerdem wurden bei 26 Probanden zwei verschiedene Strähnen, die zum selben Zeitpunkt abgenommen worden waren, gemessen (Abbildung 11). Hier ergab sich ein CV von  $55,3 \pm 37,4$  %.



**Abbildung 11:** Messvergleich bei verschiedenen Haarsträhnen derselben Probanden (n=26).

### 2.4.5.3 Sensitivität, Spezifität und Kreuzreaktivität

Laut Hersteller erreicht der ELISA eine vergleichsweise hohe Sensitivität, angegeben mit 17,3 pg/ml. Dies entspricht 0,4 pg/mg Haar. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 1,2 pg/mg Haar, ein Wert, der für eine ungefähre mittlere Cortisolmenge von 20 pg/mg Haar eines gesunden Menschen, wie sie in anderen Publikationen beschrieben wird, angemessen ist. Die Intra- und Inter-Assay-Variabilität liegen laut *Arbor Assays* bei 5,6–14,7 %, bzw. 7,2–10,9 %.

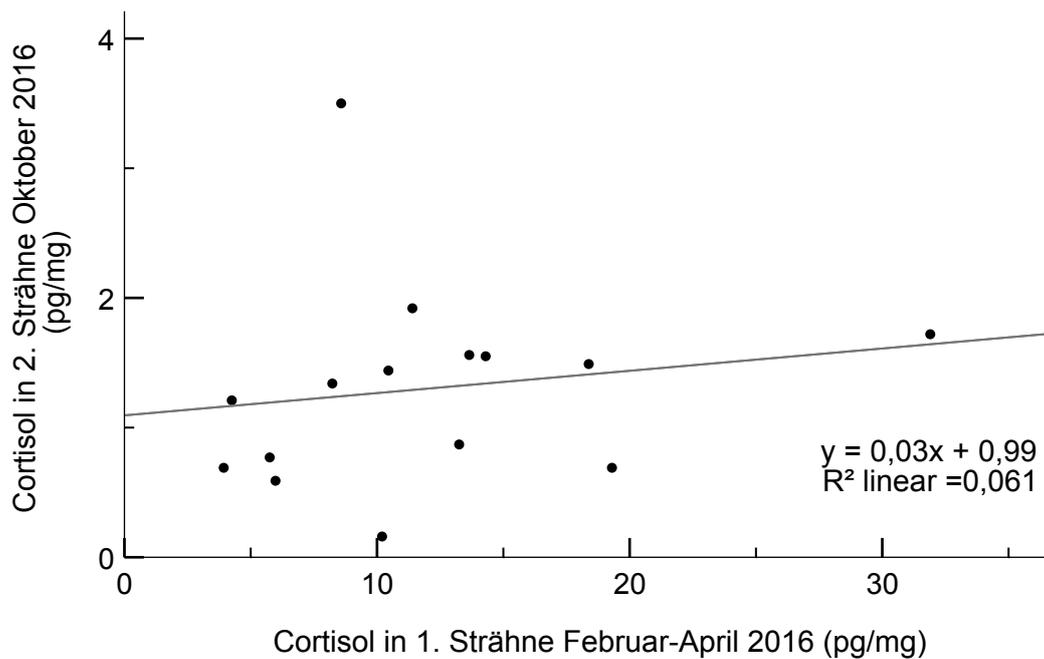
Die Kreuzreaktivität des *DetectX<sup>®</sup> Arbor Assay Cortisol Enzyme Immunoassay Kit* laut *Arbor Assays* ist bei körpereigenen Hormonen recht gering: Cortison mit 1,2 %, bei Progesteron < 0,1 % und bei Östradiol < 0,1 %. Für synthetische Glucocorticoide gibt es relevante Kreuzreaktivitäten: Dexamethason 18,8 % und Prednisolon 7,8 %.

### 2.4.5.4 Messbereich

Durch die Eichkurve des ELISA ergibt sich ein Messbereich von 100 bis 3200 pg Cortisol pro Milliliter Lösungsmittel. Durch Verwendung von 10 mg Haar auf 250 µl Assay-Puffer ergibt sich ein Messbereich von 2,5–80 pg Cortisol pro mg Haar. Alle Probanden konnten innerhalb dieses Messbereiches gemessen werden. Bei den Patienten mit vermehrter Cortisolsynthese wurden zur Erfassung des Cortisolgehalts der Haare die mit Assay-Puffer gelösten Cortisolextrakte teilweise noch 1:10 verdünnt.

### 2.4.5.5 Robustheit

Ein wichtiger Parameter zur Validierung einer Messmethode ist die Robustheit, die die Genauigkeit auch noch bei hoher Probenvariabilität oder Variation physikalischer Parameter während des Messvorgangs oder der Lagerung der Proben beschreibt. Hier können sowohl Licht, Hitze, Feuchtigkeit, Säure oder Laugen und Oxidierung einen Einfluss haben. In diesem Zusammenhang konnten wir verschiedene Haarproben derselben Probanden vergleichen (Abbildung 12). Die erste Strähne wurde wenige Wochen nach Sammlung gemessen. Die zweite Strähne wurde nach Versendung per Post nach einem halben Jahr gemessen, im Rahmen des Ringversuchs mit der Technischen Universität Dresden allerdings auch mit leicht verändertem Protokoll. Dabei konnte nur eine geringere Menge Haarcortisol nachgewiesen werden.



**Abbildung 12:** Inter-Assay-Variabilität. Zwei Strähnen derselben Probanden nach sechs Monaten (n=15).

#### 2.4.6 Messung mit Massenspektrometrie (Teil D)

Die Steroidhormonanalytik mittels Massenspektrometrie wurde von zwei verschiedenen Laboren durchgeführt, zum einen im *Genome Analysis Center* des Helmholtz Zentrums München und zum anderen in der Abteilung der Klinischen Chemie des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie.

##### 2.4.6.1 Messung mit Massenspektrometrie am Genome Analysis Center des Helmholtz Zentrums München

Durch die *Metabolomics*-Plattform des *Genome Analysis Center* des Helmholtz Zentrums München wurden 19 verschiedene Steroide mittels einer erweiterten Version des AbsoluteIDQ™ Stero17 Kit und Flüssigchromatographie mit Elektrospray-Massenspektrometrie-Kopplung (LC-ESI-MS/MS) quantifiziert. Für die Bestimmung des Haarcortisols relevant waren vor allem Cortisol und Cortison. Die Identifikation und Quantifizierung der chemischen Verbindungen basierten auf *Scheduled-multiple-Reaction-Monitoring-Measurements* (sMRM). Die Probenvorbereitung und Messungen mit Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) wurden wie im Manual UM-STERO17 des Herstellers beschrieben durchgeführt. Für die Methode des AbsoluteIDQ™ Stero17 Kit konnte die Übereinstimmung mit der EMEA-Richtlinie *Guideline on bioanalytical method validation* (European Medicines Agency, 2011) gezeigt werden, die den Nachweis der Reproduzierbarkeit innerhalb eines gewissen Fehlerbereichs beinhaltet. Analytische Charakteristika wie *Limit-of-Detection* (LOD), *Lower-and-upper-Limit-of-Quantification* (LLOQ und ULOQ), Spezifität,

Linearität, Präzision, Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und Stabilität wurden durch Biocrates experimentell bestimmt und sind im Handbuch AS-STERO17 beschrieben.

Die Methode wurde folgendermaßen im Labor gehandhabt: Die Haarproben wurden nach Pulverisierung und Methanolextraktion als getrockneter Überstand dem Labor im Helmholtz Zentrum zugestellt und dort lyophilisiert. Alle Proben wurden bis zu ihrer Aufbereitung für die Messungen bei -80 °C gelagert. Im *Metabolomics*-Labor wurde jede Probe mit 50 µl Methanol/Wasser (50/50 v/v) wieder aufgefüllt und für 15 Minuten mittels Reagenzglasschüttler gemischt. Nach Zugabe von 450 µl destilliertem Wasser und erneutem Schütteln wurden die Proben für zehn Minuten bei 3880 x g zentrifugiert. Die sich ergebende Methanolkonzentration betrug nun 5 %. Der gesamte Überstand (500 µl) samt sehr kleiner Schwebeteilchen wurde für die Steroidmessung benutzt.

Für die Messungen wurden 400 µl destilliertes Wasser in jede Kavität einer 2-ml-96-*well*-Mikrotiterplatte pipettiert. Außer für den Leerwert wurden jeweils 20 µl des internen Standards dazugemischt. Danach wurden 250 µl jeweils für Leerwert-, Kalibrationsstandard- und Qualitätskontrollproben und 500 µl der Proben mit Haarextrakt in die respektiven Kavitäten pipettiert. Der Inhalt wurde von robotergeführten Pipetten aspiriert und vermischt. Währenddessen wurde die *Solid-Phase-Extraction-Plate* (SPE-Platte) des Kits nacheinander mit 1 ml Dichloromethan, 1 ml Acetonitril, 1 ml Methanol und 1 ml destilliertem Wasser vorbereitet. Bei allen SPE-Reinigungsschritten (Vorbereitung, Waschen, Trocknen und Elution) wurden die Flüssigkeiten unter Stickstoffüberdruck in die Kavitäten gedrückt. Nach der Vorbereitung wurden die vermischten Proben auf die SPE-Platte langsam durch Schwerkraft getropft. Die SPE-Platte wurde mit 500 µl Wasser gewaschen und für eine Stunde unter Stickstoffbegasung getrocknet (58 psi). Die Steroide wurden danach in zwei Schritten gelöst. Zuerst zweimal nacheinander jeweils mit 500 µl Dichloromethan gelöst und 20 Minuten bei 45 psi getrocknet und danach mit 600 µl Acetonitril auf eine andere Platte gegeben. Die erste Dichloromethanfraktion wurde in 50 µl Methanol-Wasser-Gemisch (25/75 v/v) gelöst und die Platte verschlossen. Um die Löslichkeit zu begünstigen, wurde die Platte für eine Minute in ein Ultraschallbad gelegt und danach fünf Minuten lang bei 600 rpm geschüttelt. Die zweite Actonitrilfraktion wurde in 400 µl Wasser gelöst und danach wie die erste Fraktion behandelt. Beide Platten wurden bei 50 x g zentrifugiert und in einen gekühlten *Autosampler* (10 °C) für die LC-MS/MS-Messungen gelegt. Die LC-Trennung der beiden Fraktionen wurde durchgeführt mittels 470 ml destilliertem Wasser mit dem Inhalt der drei Ampullen des Kits als mobile Phase A bzw. einem Acetonitril/Methanol/Wasser Gemisch v/v/v 85/10/5 als mobile Phase B. Die Steroide wurden auf der *High-Performance-liquid-Chromatography*-(HPLC-)Säule für das

AbsoluteIDQ™ Stero17 Kit getrennt, zusammen mit der Vorsäule des *SecurityGuard Cartridge* C18 4 x 2 mm (für HPLC, Phenomenex Cat No. AJ0-4286). Alle Lösungsmittel, die für die Probenvorbereitung und Messung benutzt wurden, waren in HPLC-Qualität.

Die Proben wurden mit einem Hamilton *MicroLab* START™ *robot* (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Switzerland) und einem Waters *Positive Pressure-96 Processor* (Waters GmbH, Eschborn, Germany) gehandhabt, sowie weiterer üblicher Laborausstattung. Massenspektrometrische Messungen wurden in einem QTRAP 5500 *triple quadrupole system* (Sciex Deutschland GmbH, Darmstadt, Germany) mit einem 1260 Series HPLC (*Agilent Technologies* Deutschland GmbH, Böblingen, Germany) und einem HTC PAL *Autosampler* (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) gesteuert durch die *Analyst* 1.6.2. Software durchgeführt. Die Berechnung der Daten zur Quantifizierung der Metabolitkonzentrationen und der Qualitätsprüfung wurde mit der Software MultiQuant 3.0.1 (Sciex) und MetIDQ™ durchgeführt, dies ist ein Teil des AbsoluteIDQ™ Stero17 Kits. Die Konzentrationen der Metabolite wurde mithilfe der internen Standardproben berechnet und in nM oder ng/ml angegeben.

#### 2.4.6.2 Messung mit Massenspektrometrie am Max-Planck-Institut für Psychiatrie

Im Labor der Klinischen Chemie am Max-Planck-Institut für Psychiatrie wurden durch die *Core Unit Analytics and Mass Spectrometry* zu zwei Zeitpunkten Messungen mit Massenspektrometrie durchgeführt.

Zunächst wurden Messungen mittels ELISA und Massenspektrometrie verglichen. Hierzu wurden die Proben wie unter A beschrieben vorbereitet, allerdings wurden 30 mg Haar abgemessen. Für den späteren Vergleich von Hydrolyse, Pulverisierung, ELISA und Massenspektrometrie wurden von zehn Probanden und fünf Strähnen einer Kontrollperson je 80 mg Haare zur Hälfte nach Teil A und zur anderen Hälfte nach Teil B vorbereitet. Die Proben zur Hydrolyse wurden in Reagenzgläsern vorbereitet. Nach Methanolextraktion und Trocknung wurde der Überstand jeweils in 2 ml Eppendorf-*Tubes* (Eppendorf, Deutschland) in Methanol gelöst. Die Trocknung erfolgte im *SpeedVac*. Die Kontrollhaare wurden mit Cortison- bzw. Cortisol-Standard nach Verdünnungsreihe versetzt. Vor der Extraktion wurden noch 10 µl markiertes Cortison (Cortison-D8), Testosteron-D3 sowie DHEA-Sulfat-D6 dazugegeben und als interner Standard verwendet.

Die Analyse wurde mit einem *Acquity* UPLC (Waters, Eschborn, Deutschland) Flüssigkeits-Chromatographen durchgeführt, der mit der Elektrospray-Ionisations-Quelle des QTRAP 5500 *Triple Quadrupole* Massenspektrometer (Sciex, Darmstadt,

Deutschland) verbunden war. Alle Proben wurden mit Oasis HLB Platten (Waters, Eschborn, Deutschland) vorbereitet. Die Chromatographie wurde durch einen Elutionsgradienten erreicht in einer ACE Excel C18-PFP 2µm Säule (2.1 x 150 mm, *Advanced Chromatography Technologies Ltd*, Aberdeen, Scotland) bei einem Fluss von 0.3 ml/min und 40 °C. Die Zusammensetzung des Lösungsmittels A war Wasser mit Isopropylalkohol und Ammoniumformiat. Das Lösungsmittel B war Acetonitril mit Ammoniumformiat. Die gesamte Laufzeit waren 20 Minuten und das Injektionsvolumen war 1 µl. Die Ionenquelle wurde mit einer positiven Spannung bei 400 °C betrieben und das *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) mit kollisionsinduzierter Dissoziation (CID) unter Stickstoff-Begasung durchgeführt.

## 2.5 Statistische Analysen

Zur statistischen Auswertung wurde eine Datenbank in *Excel* von *Microsoft Office* 2016 erstellt und mithilfe von *IBM SPSS Statistics* 24 berechnet. Dabei wurden demographische Daten und medizinische Parameter, insbesondere der Cortisolgehalt der Haare, miteinander verglichen. Fehlende Daten wurden als 'nicht bekannt' bezeichnet und bei der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt, außer es war aus dem Kontext klar erkennbar, dass eine negative Aussage gemeint war. Es wurde auf statistische Signifikanz untersucht, wobei ein p-Wert < 0,05 als signifikant erachtet wurde.

Mittelwert und Standardabweichung wurden für kontinuierliche Daten angegeben, Häufigkeiten und Interquartilsbereiche (IQR) für kategoriale Daten. Die graphische Darstellung erfolgte bei kontinuierlichen Daten als Punktdiagramm und bei kategorialen Variablen meist als Kreisdiagramm. Bei Normalverteilung der kontinuierlichen Daten wurde zur Überprüfung eines Unterschiedes zwischen zwei Gruppen ein T-Test verwendet. Bei nicht normalverteilten Daten wurde ein Mann-Whitney-U-Test verwendet. Für Überprüfung der Unterschiede zwischen mehr als zwei Gruppen wurde bei ordinalskalierten Variablen der Kruskal-Wallis-Test verwendet, bei intervallskalierten Daten mit annähernder Normalverteilung wurde die mehrfaktorielle Varianzanalyse verwendet und die mehrfaktorielle Varianzanalyse mit Kovariaten. Zur Überprüfung von Zusammenhängen wurden Korrelationen nach Spearman verwendet, falls es sich um intervallskalierte Daten handelte. Bei ordinalskalierten Daten wurde auf die Rangkorrelation nach Pearson zurückgegriffen. Bei intervallskalierten Daten und *Dummy*-kodierte Variablen wurde zur Überprüfung der Zusammenhänge eine multiple Regression durchgeführt. Mithilfe einer *Receiver-Operating-Characteristic*-Analyse

(ROC-Analyse) wurden *Cut-off*-Werte zur Überprüfung der diagnostischen Anwendbarkeit der Methoden berechnet.





## 3 Ergebnisse

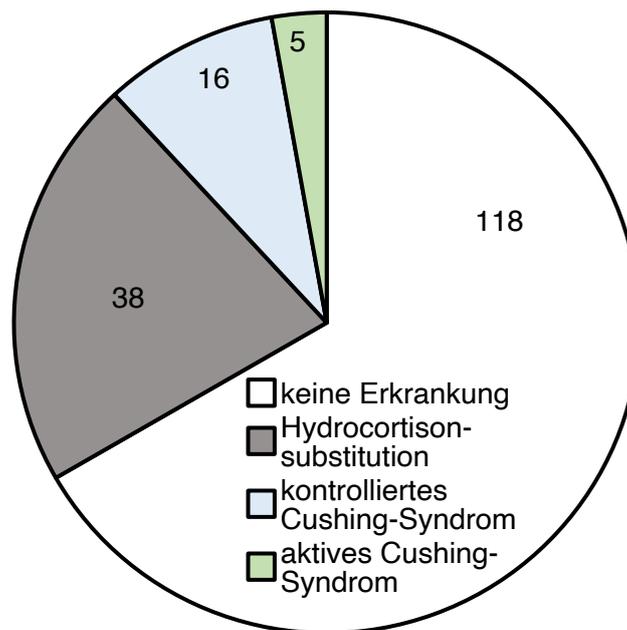
### 3.1 Charakterisierung der Probanden und Patienten

#### 3.1.1 Einteilung der Probanden und Patienten nach Krankheitsmerkmalen

Für die Untersuchung der Einflussfaktoren auf den Haarcortisolspiegel konnte auf Daten von 111 gesunden Probanden, die für diese Studie rekrutiert worden waren, und von 60 Patienten der endokrinologischen Ambulanz des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie zurückgegriffen werden.

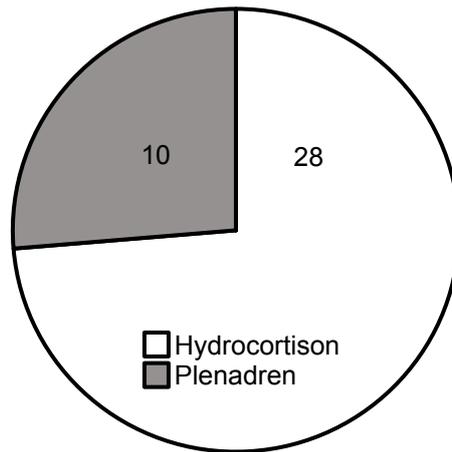
Zunächst wurden die Teilnehmer der Studie den verschiedenen Gruppen nach Parametern der Erkrankung zugeteilt. So wurden diejenigen ohne Störung des Cortisolstoffwechsels zusammengefasst, also zum einen die Probanden, bei denen sich keine Hinweise auf eine Erkrankung oder Einflüsse durch Medikamenteneinnahme ergeben hatten, und zum anderen die Patienten der endokrinologischen Ambulanz, bei denen eine Störung des Cortisolstoffwechsels ausgeschlossen werden konnte. Die verbliebenen Patienten wurden aufgeteilt in diejenigen mit exogener Hydrocortisonsubstitution, also z. B. mit primärer Nebenniereninsuffizienz oder sekundär nach Therapie eines Morbus Cushing, und diejenigen mit einer erhöhten endogenen Cortisolproduktion, einem Cushing-Syndrom. Die letzteren wurden nach klinischen Parametern noch weiter unterteilt in diejenigen mit kontrollierter oder aktiver Krankheitsaktivität. 5 Patienten hatten mehr als eine Haarprobe in ausreichender Menge abgegeben. Zudem hatten sich im Verlauf die Krankheitsausprägung und erhobenen Parameter teilweise geändert, daher wird im Folgenden auf die Anzahl der Haarproben eingegangen. Zum Beispiel konnte bei einem Patienten im Verlauf die Aktivität des Morbus Cushing von aktiv auf kontrolliert eingestuft werden.

Aufgrund der Anzahl der im Zeitraum der Studie behandelten Patienten ergab sich eine heterogene Stichprobenverteilung. Zur Untersuchung der Einflussfaktoren auf den Haarcortisolspiegel wurden Haarproben von 118 gesunden Probanden, 38 Patienten mit Hydrocortisonsubstitution, 16 Patienten mit kontrollierter Krankheitsaktivität bei Cushing-Syndrom und fünf Patienten mit aktivem Cushing-Syndrom verwendet. Abbildung 13 zeigt die Verteilung der Haarsträhnen der Probanden und Patienten.

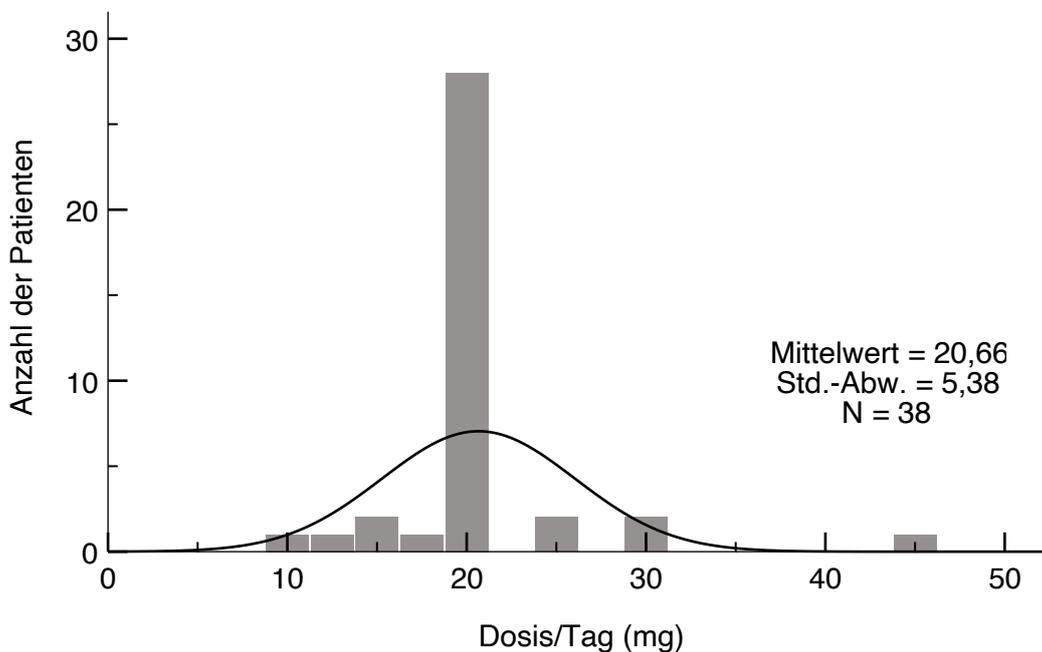


**Abbildung 13:** Verteilung der Probanden und Patienten.

Bei den meisten Patienten war der Hypercortisolismus hypophysärer Genese, lediglich bei einem Patienten mit kontrolliertem Cushing-Syndrom lag eine adrenale Ätiologie zugrunde und ein Patient mit aktivem Cushing-Syndrom hatte eine ektope Cortisolproduktion. Bei den meisten Patienten (31) lag eine sekundäre Ursache der Nebenniereninsuffizienz vor, acht Patienten litten an einer primären Nebenniereninsuffizienz. Die Gruppe der Patienten mit Hydrocortisonsubstitution unterschied sich in dem verwendeten Substitutionspräparat, dabei nahmen 28 Patienten zum Zeitpunkt der Haarprobenentnahme sofort wirksames Hydrocortison ein, zehn Patienten erhielten Plenadren® (Abbildung 14). Beide Präparate enthalten Hydrocortison, allerdings ist die Wirkstofffreisetzung bei Plenadren® zweistufig. Zunächst kommt es zu einer schnellen Freisetzung, anschließend zu einer verlangsamten. Somit soll mit einer morgendlichen Gabe der physiologische Cortisolspiegel besser imitiert werden können (Johannsson et al., 2012). Die meisten Patienten erhielten 20 mg Gesamtdosis Hydrocortison am Tag (siehe Abbildung 15).



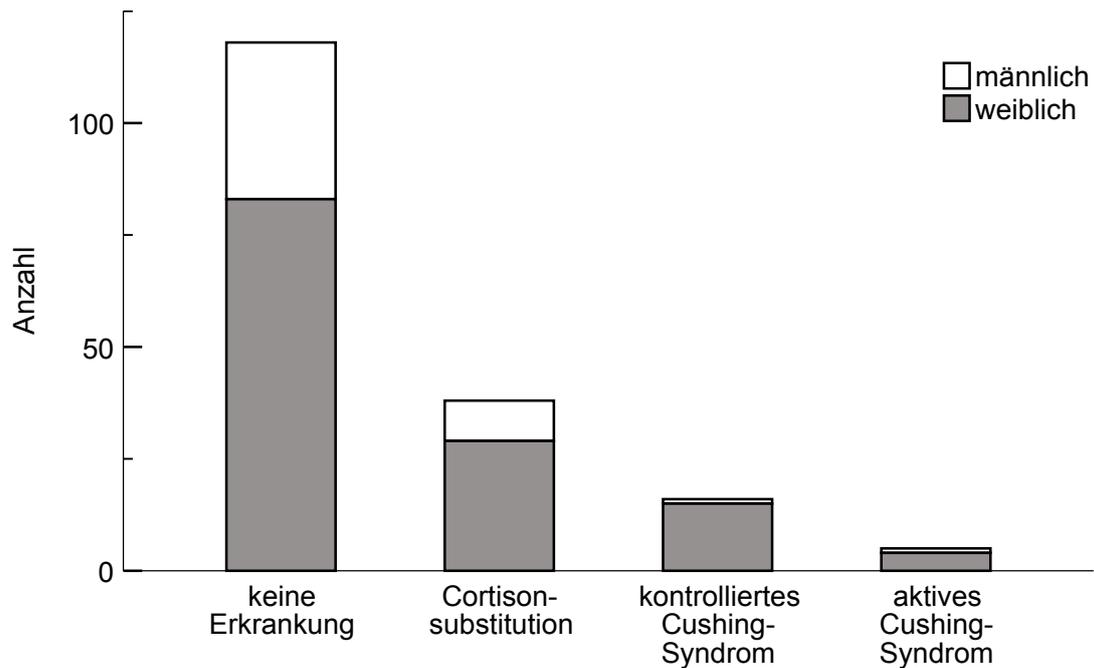
**Abbildung 14:** Verteilung der Medikation zur Hydrocortisonsubstitution.



**Abbildung 15:** Gesamtdosis der Hydrocortisonsubstitution pro Tag.

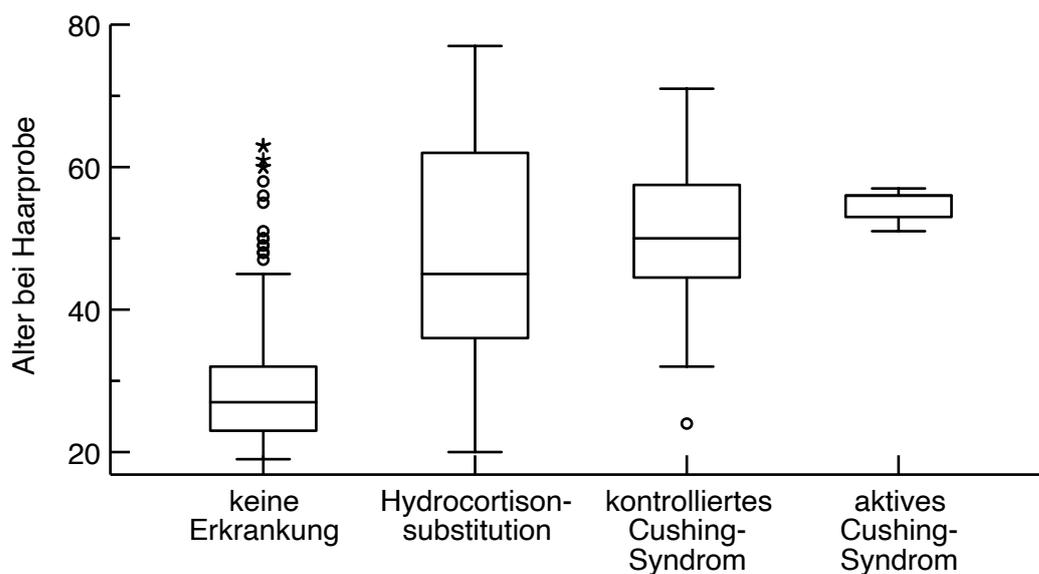
### 3.1.2 Allgemeine Merkmale

Das Geschlechterverhältnis des gesamten Kollektivs war zugunsten der Frauen (Abbildung 16). Die beiden größten Gruppen, die gesunden Probanden und die Patienten mit Hydrocortisonsubstitution, zeigten einen ähnlichen Frauenanteil von ungefähr 70 %. 83 gesunde Frauen ergaben einen Anteil von 70,3 % und 29 Patientinnen mit Hydrocortisonsubstitution einen Anteil von 76,3 %. In den anderen beiden Patientengruppen gab es jeweils einen Mann, allerdings ergab dies bedingt durch die Gruppengröße einen Frauenanteil von 80 % (aktives Cushing-Syndrom) und 94 % (kontrolliertes Cushing-Syndrom). Der Unterschied des Geschlechterverhältnisses zwischen den Gruppen war nicht signifikant ( $\chi^2_{(3)} = 4,3$ ;  $p = 0,234$ ).



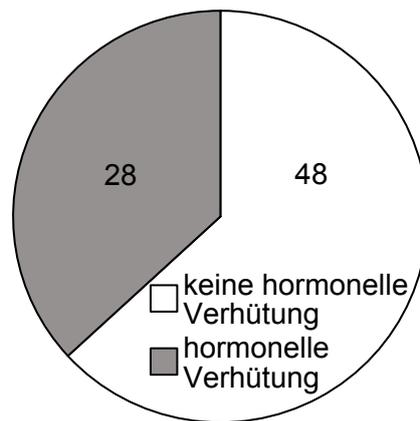
**Abbildung 16:** Verteilung der Männer und Frauen bei Probanden und Patienten.

Das Durchschnittsalter unterschied sich laut Kruskal-Wallis-Test zwischen den Gruppen statistisch signifikant ( $\chi^2_{(3)} = 58,7$ ,  $p < 0,01$ ). Nach Bonferroni Korrektur zeigten sich die gesunden Probanden mit  $30,6 \pm 11,1$  Jahren jünger wie jede einzelne Gruppe der Patienten (gegenüber den  $48,5 \pm 15,7$  Jahre alten Patienten mit Hydrocortisonsubstitution:  $z = 6,2$ ;  $p < 0,01$ ; gegenüber den  $49,7 \pm 12,5$  Jahre alten Patienten mit kontrolliertem Cushing-Syndrom:  $z = 4,7$ ;  $p < 0,01$ ; gegenüber den  $54,6 \pm 2,5$  Jahre alten Patienten mit aktivem Cushing-Syndrom:  $z = 3,4$ ;  $p < 0,005$ ). Die Altersverteilung ist in Abbildung 17 dargestellt.



**Abbildung 17:** Verteilung des Alters bei Probanden und Patienten.

Die Angabe über hormonelle Verhütung wurde nur bei den gesunden Probanden verwendet, da die Anwendung von Geschlechtshormonen bei den Patienten zur Verhütung oder auch zur Substitution von ebenfalls alterierten Sexualhormonachsen zu heterogen war. 76 gesunde Frauen machten Angaben über hormonelle Verhütung. Diese bestand bei 28 Frauen, siehe Abbildung 18. Laut eigenen Aussagen war keine Frau schwanger, eine stillte. Fünf Frauen waren postmenopausal.



**Abbildung 18:** Hormonelle Verhütung bei gesunden Frauen.

Im Probandenkollektiv waren fünf Raucher mit mehr als 14 Zigaretten pro Monat und fünf Personen mit einem Alkoholkonsum an mehr als sechs Tagen pro Monat. 16 Patienten gaben Auskunft über ihr Rauchverhalten, davon rauchten zwei mehr als 15 Zigaretten im Monat. Informationen zu Alkoholkonsum lagen bei den Patienten nicht vor. Die persönlichen Merkmale der Probanden und Patienten sind in Tabelle 2 zusammengefasst sowie jeweils die Unterschiede der zentralen Tendenzen zwischen den Gruppen und ihr Signifikanzniveau.

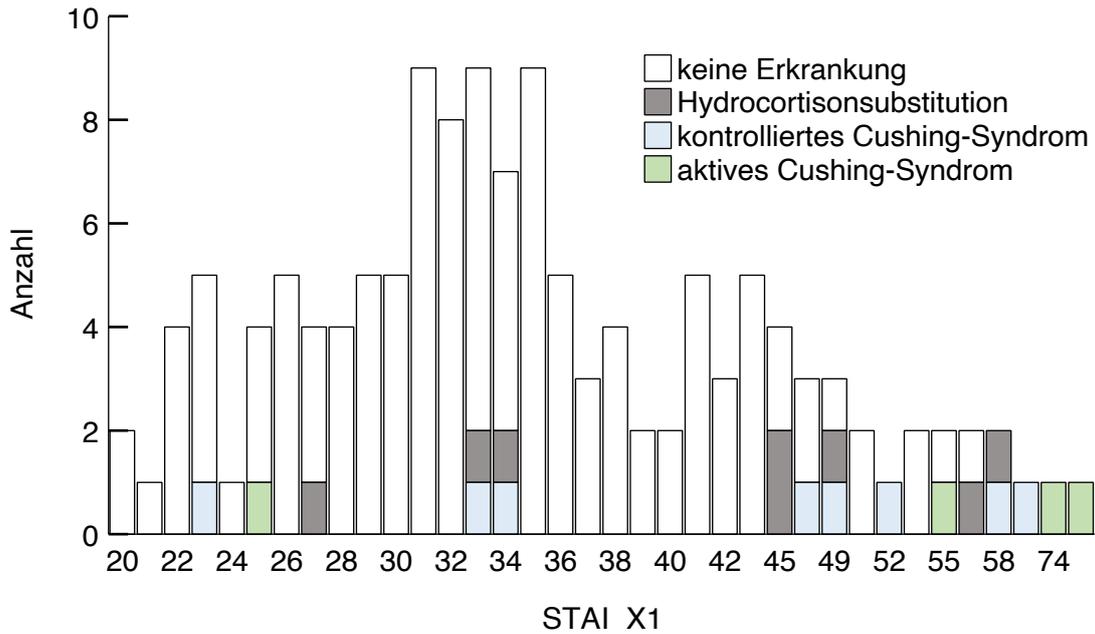
**Tabelle 2:** Allgemeine Merkmale der Probanden und Patienten.

allgemeine Merkmale	keine Erkrankung	Hydrocortison-substitution	kontrolliertes Cushing-Syndrom	aktives Cushing-Syndrom	$\chi^2$ (3)	p-Wert
Geschlecht						
männlich	29,7 (35)	23,7 (9)	6,3 (1)	20,0 (1)	4,3	0,234
weiblich	70,3 (83)	76,3 (29)	93,8 (15)	80,0 (4)		
hormonelle Verhütung						
Nein	40,7 (48)					
Ja	23,7 (28)					
Alter bei Haarprobe in Jahren						
	30,6 ± 11,1 (118)	48,5 ± 15,7 (38)	49,7 ± 12,5 (16)	54,6 ± 2,5 (5)	58,7	< 0,001
Rauchen aktuell (Zigaretten pro Monat)						
≤14	95,7 (110)	100 (2)	88,9 (8)	100 (1)	1,0	0,801
>14	4,3 (5)		11,1 (1)			
Alkoholkonsum (Tage pro Monat)						
≤7	89,8 (106)					
>7	4,2 (5)					

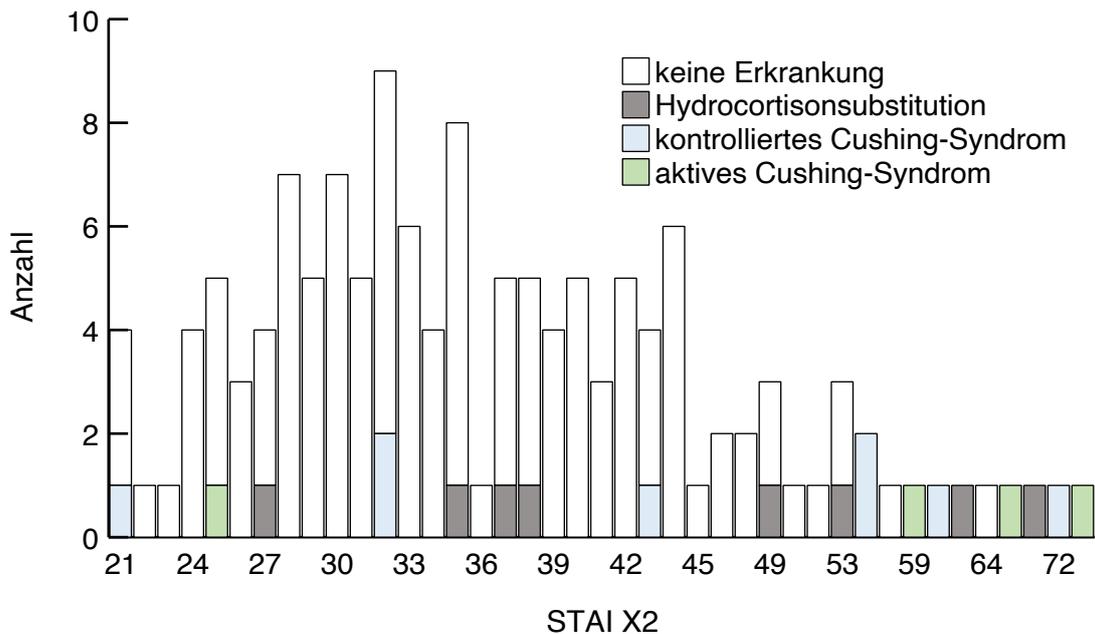
Die Angaben erfolgten bei kategorialen Variablen jeweils als Mittelwert ± Standardabweichung (absolute Anzahl), bei intervallskalierten Variablen als Median mit Interquartilsrange (absolute Anzahl) und bei kontinuierlichen Variablen als Prozent (absolute Anzahl).

### 3.1.3 Psychologische Merkmale

Sowohl Probanden als auch Patienten wurden mit standardisierten Fragebögen auf psychologische Merkmale des Angstempfindens und der Depression untersucht. Beim *State-Trait*-Angstinventar zur Untersuchung des momentanen und allgemeinen Angstempfindens liegt der Ergebnisbereich der beiden Skalen jeweils zwischen 20 und 80 Punkten. Im vorliegenden Probandenkollektiv ergab sich beim *State-Trait*-Angstinventar ein Median des momentanen Angstzustandes (STAI X1) von 33 (IQR: 29–38) Punkten und der Angst im Allgemeinen (STAI X2) ein Median von 34 (IQR: 29–41) Punkten. Höhere Ergebnisbereiche zeigten die Patienten. Diejenigen mit aktivem Cushing-Syndrom (STAI X1: Median = 65, IQR = 33–75; STAI X2: Median = 63, IQR = 34–72) jeweils höhere als diejenigen mit kontrollierter Krankheitsaktivität (STAI X1: Median = 48, IQR = 33–57; STAI X2: Median = 50, IQR = 32–60) und diese wiederum höhere als diejenigen mit Hydrocortisonsubstitution (STAI X1: Median = 45, IQR = 33–55; STAI X2: Median = 44, IQR = 36–60). Die Verteilung des STAI X1 bei Probanden und Patienten ist in Abbildung 19 dargestellt, die Verteilung des STAI X2 in Abbildung 20.



**Abbildung 19:** Verteilung des STAI X1 bei Probanden und Patienten.

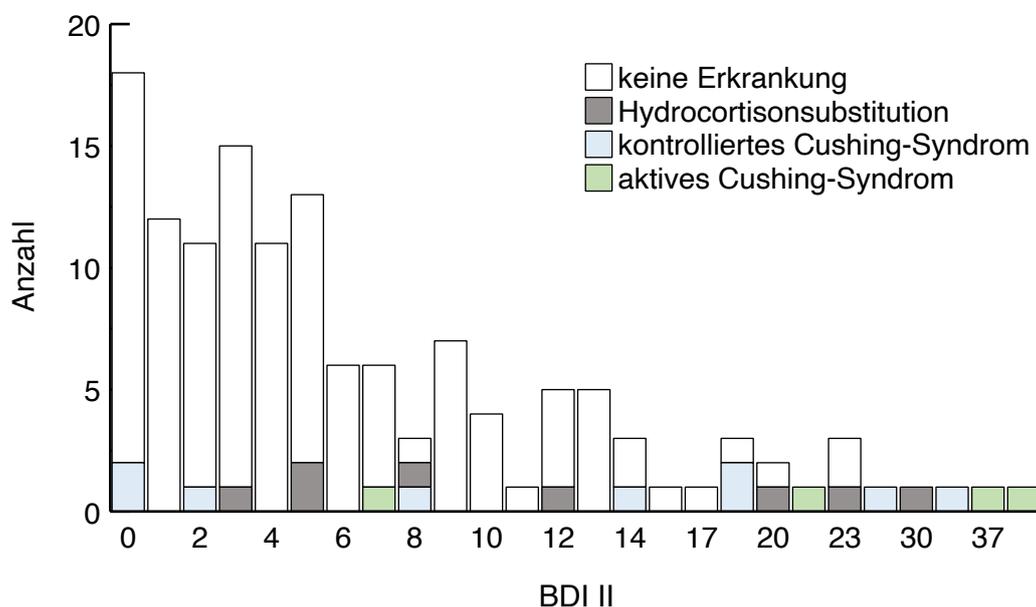


**Abbildung 20:** Verteilung des STAI X2 bei Probanden und Patienten.

Als *Cut-off* zur Diagnostik eines pathologischen Angstempfindens wird normalerweise 49–50 verwendet (Iglesias et al., 2015), dabei zeigte sich bei den Patienten eine Tendenz zu vermehrten pathologischen Ergebnissen. Während sechs der 115 gesunden Personen beim *State*-Teil bei 50 Punkten oder darüber lagen bzw. fünf beim *Trait*-Teil, lagen von den acht Patienten mit Nebenniereninsuffizienz zwei (STAI X1) bzw. drei (STAI X2) über dem *Cut-off*. Bei den acht Patienten mit Cushing-Syndrom mit kontrollierter Krankheitsaktivität zeigten sich drei (STAI X1) bzw. vier (STAI X2) auffällig, bei den Patienten mit aktivem Cushing-Syndrom waren es jeweils drei von vier (STAI X1

und X2). Ein statistisch signifikanter Unterschied bestand laut Kruskal-Wallis-Test zwischen den Gruppen (STAI X1:  $\chi^2_{(3)} = 13,2$ ;  $p = 0,004$ ; STAI X2:  $\chi^2_{(3)} = 10,8$ ;  $p = 0,013$ ), der allerdings bei genauerer Betrachtung der Untergruppen mit Post-Hoc-Tests keine weitere Differenzierung erlaubte. Dennoch zeigt sich eine klare Tendenz zu größerem Angstpfinden bei Menschen mit Störung des Cortisolstoffwechsels und einer Verstärkung des Angstpfindens mit vermehrter Krankheitsaktivität.

Der Beck-Depressions-Inventar-II zur Depressionsdiagnostik hat einen Ergebnisbereich von 0 bis 63 Punkten. Die Verteilung des BDI II bei Probanden und Patienten ist in Abbildung 21 dargestellt. Die Ergebnisse der gesunden Probanden wiesen einen Median von 4 mit einer IQR von 2 bis 9 auf. Der Median der acht Patienten mit Hydrocortisonsubstitution lag bei 10 (IQR = 5–22). Neun Patienten mit kontrolliertem Cushing-Syndrom hatten Punktwerte mit einem Median von 14 und IQR von 1 bis 24, die vier Patienten mit aktivem Cushing-Syndrom zeigten einen Median von 29 (IQR = 11–38). Damit unterschieden sich die Gruppen signifikant ( $\chi^2_{(3)} = 16,4$ ;  $p < 0,001$ ). Nach Bonferroni Korrektur unterschieden sich die gesunden Probanden und die Patienten mit Cushing-Syndrom mit starker Krankheitsaktivität mit  $z = 3,0$  auf einem Signifikanzniveau von  $p = 0,019$ .



**Abbildung 21:** Verteilung des BDI II bei Probanden und Patienten.

In Übereinstimmung mit der S3-Leitlinie/NVL über Unipolare Depression ergaben sich bei den gesunden Probanden bei fünf Personen Hinweise auf eine milde Depression (14–19 Punkte) und bei dreien auf eine mittlere Depression (20–28 Punkte) ((AWMF), 2015). Zwei Patienten mit Hydrocortisonsubstitution zeigten Hinweise auf eine mittlere Depression, ein Patient auf eine schwere Depression (ab 29 Punkten). Drei Patienten mit kontrolliertem Cushing-Syndrom zeigten Punktwerte einer milden und zwei

Punktwerte einer schweren Depression. Bei denjenigen mit aktivem Cushing-Syndrom ergaben sich eine mittlere und zwei schwere Depression.

Die bei den gesunden Probanden abgefragten belastenden Lebenserfahrungen (15 von 111) wurden bei den Patienten nicht erhoben, allerdings kann in Konkordanz mit den Ergebnissen der psychologischen Fragebögen davon ausgegangen werden, dass eine solche hormonelle Erkrankung selbst eine belastende Lebenserfahrung darstellt.

Weiterhin bestand eine starke Rangkorrelation zwischen den erhobenen psychiatrischen Parametern als Gesamtheit und in den Gruppen: STAI X1 zu STAI X2 ( $r_s = 0,651$ ;  $p < 0,001$ ) und BDI II ( $r_s = 0,552$ ;  $p < 0,001$ ) sowie STAI X2 zu BDI II ( $r_s = 0,800$ ;  $p < 0,001$ ). Dies zeigte sich für die Untergruppen ähnlich soweit aufgrund der Anzahl der Angaben eine Aussage möglich war.

**Tabelle 3:** Psychologische Merkmale der Probanden und Patienten.

psychologische Merkmale	keine Erkrankung	Hydrocortison-substitution	kontrolliertes Cushing-Syndrom	aktives Cushing-Syndrom	$\chi^2_{(3)}$	p-Wert
STAI X1	33 (29–38) (115)	45 (33–55) (8)	48 (33–57) (8)	65 (33–75) (4)	13,2	0,004
STAI X2	34 (29–41) (115)	44 (36–60) (8)	50 (32–60) (8)	63 (34–72) (4)	10,8	0,013
BDI II	4 (2–9) (115)	10 (5–22) (8)	14 (1–24) (9)	29 (11–38) (4)	16,4	0,001
Belastende Lebenserfahrung						
nein	81,4 (96)					
ja	12,7 (15)					

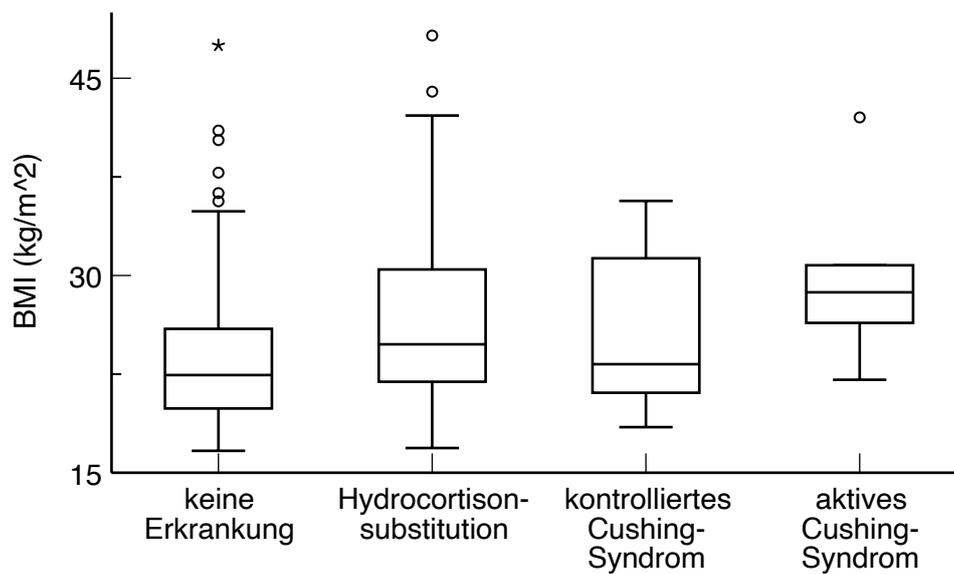
Die Angaben erfolgten bei kategorialen Variablen jeweils als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (absolute Anzahl), bei intervallskalierten Variablen als Median mit Interquartilsrange (absolute Anzahl) und bei kontinuierlichen Variablen als Prozent (absolute Anzahl).

### 3.1.4 Merkmale des metabolischen Syndroms

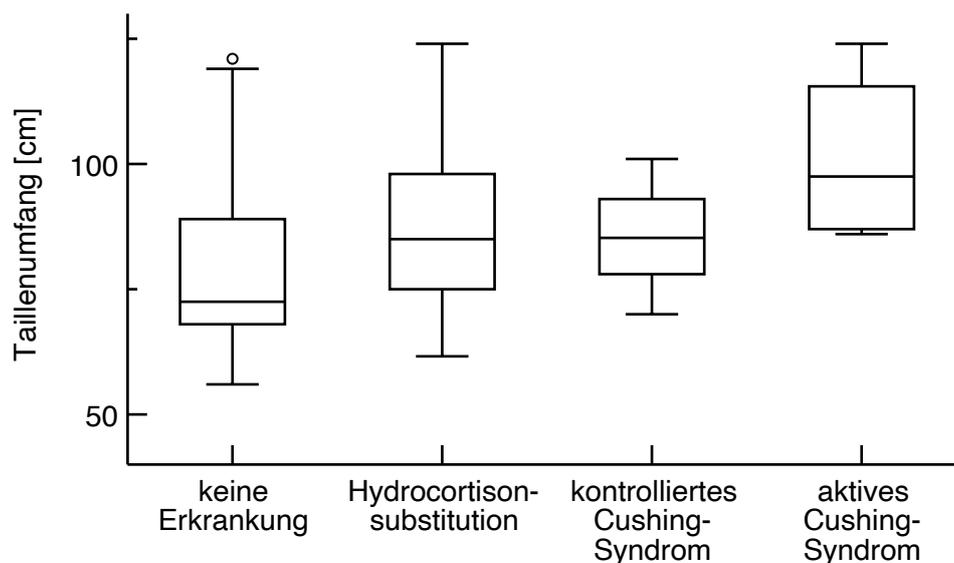
Zu einer orientierenden Einordnung in Bezug auf das metabolische Syndrom erwies sich bereits der BMI als hilfreich. Die Mittelwerte der Gruppen unterschieden sich hier signifikant ( $\chi^2_{(3)} = 8,8$ ,  $p = 0,032$ ), wenn auch beim Post-Hoc-Test keine genauere signifikante Differenzierung möglich war. Die 118 gesunden Probanden hatten in ihrer Gesamtheit mit  $23,9 \pm 5,4 \text{ kg/m}^2$  einen geringeren BMI als die Patienten. Die Gruppe der 37 Patienten mit Hydrocortisonsubstitution ( $\text{BMI} = 26,5 \pm 7,4$ ) und die Gruppe der 16 Patienten mit kontrolliertem Cushing-Syndrom ( $\text{BMI} = 25,4 \pm 5,8$ ) ähnelten sich dabei. Einen noch höheren BMI zeigten die fünf Patienten mit aktivem Cushing-Syndrom ( $\text{BMI} = 30,0 \pm 7,5$ ).

Die stammbetonte Adipositas lässt sich durch die Messung des Taillenumfangs differenzieren, von der ab  $\geq 80 \text{ cm}$  (Frauen) bzw.  $\geq 94 \text{ cm}$  (Männer) gesprochen wird.

Der Taillenumfang der gesunden Probanden betrug  $78,5 \pm 14,5$  cm, bei den Patienten mit Hydrocortisonsubstitution  $86,5 \pm 16,1$  cm, bei den Patienten mit Cushing-Syndrom mit kontrollierter Krankheitsaktivität  $93,3 \pm 31,1$  cm und bei denen mit aktiver Erkrankung  $101,3 \pm 17,9$  cm. Dabei war laut Kruskal-Wallis-Test ein Unterschied der zentralen Tendenz der Gruppen signifikant ( $\chi^2_{(3)} = 17,5$ ;  $p = 0,001$ ). Post-Hoc-Tests nach Bonferroni zeigten, dass sich nur die Gesunden von den Hydrocortisonsubstituierten signifikant unterschieden ( $z = 2,8$ ;  $p = 0,034$ ). Die Verteilungen des BMI und des Taillenumfangs bei Probanden und Patienten sind in den Abbildungen 22 und 23 dargestellt.



**Abbildung 22:** Verteilung des BMI der Probanden und Patienten.



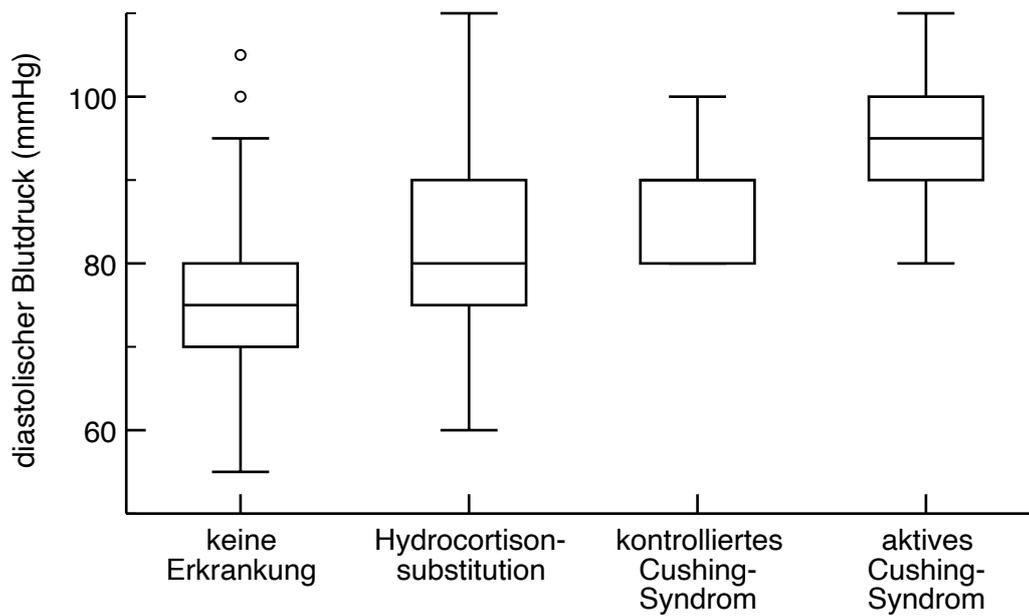
**Abbildung 23:** Verteilung des Taillenumfangs der Probanden und Patienten.

Bei den Patienten der endokrinologischen Ambulanz wurden zusätzlich Laborwerte erhoben. Hierbei zeigten sich im Kruskal-Wallis-Test keine Unterschiede bezüglich der

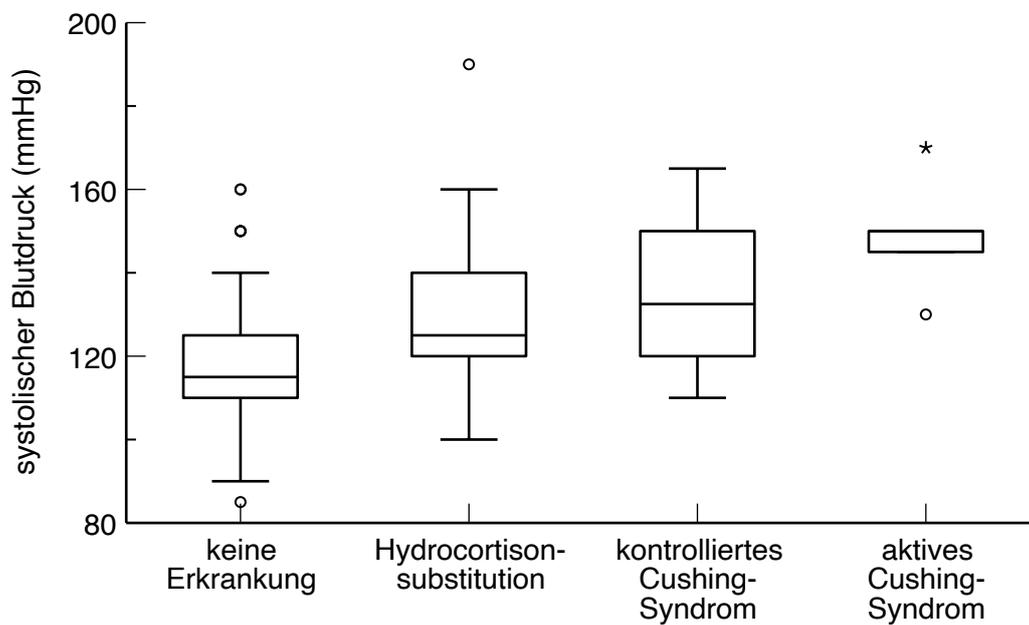
zentralen Tendenz. Auf alle Gruppen verteilt wurden mittlere Triglyceridwerte von  $138 \pm 74$  mg/dl gemessen, die  $\gamma$ -GT lag bei  $25 \pm 22$  U/l. Der mittlere HbA1c wurde mit  $5,3 \pm 0,4$  % bestimmt. Erst ab einem HbA1c Wert  $\geq 6,5$  % wird ein Diabetes mellitus diagnostiziert, Werte unter 5,7 % gelten als physiologisch.

Die Prüfung der Korrelation nach Pearson ergab, dass sowohl für die Gesamtheit der Haarproben als auch für die Aufteilung nach Erkrankung die meisten Parameter des metabolischen Syndroms miteinander korrelierten. Für die Gesamtheit der Proben korrelierte der BMI zum systolischen Blutdruck ( $r_p = 0,504$ ;  $p < 0,001$ ), zum diastolischen Blutdruck ( $r_p = 0,426$ ;  $p < 0,001$ ) und zum Taillenumfang ( $r_p = 0,785$ ;  $p < 0,001$ ). Der systolische Blutdruck wiederum korrelierte stark mit dem diastolischen Blutdruck ( $r_p = 0,781$ ;  $p < 0,001$ ), mittelstark mit dem Taillenumfang ( $r_p = 0,493$ ;  $p < 0,001$ ) und schwach mit dem HbA1c ( $r_p = 0,280$ ;  $p = 0,038$ ). Die Triglyceridwerte korrelierten mittelstark mit der Höhe der  $\gamma$ -GT ( $r_p = 0,323$ ;  $p = 0,015$ ). Allerdings zeigte sich auch eine mittlere Korrelation des BMI mit dem BDI II ( $r_p = 0,282$ ;  $p = 0,002$ ). Für die Gesamtheit der Proben korrelierte auch das Alter mit BMI ( $r_p = 0,359$ ;  $p < 0,001$ ), dem systolischen Blutdruck ( $r_p = 0,526$ ;  $p < 0,001$ ), dem diastolischen Blutdruck ( $r_p = 0,530$ ;  $p < 0,001$ ), dem Taillenumfang ( $r_p = 0,451$ ;  $p < 0,001$ ) und dem HbA1c ( $r_p = 0,424$ ;  $p < 0,001$ ). Das Alter korrelierte zudem mit den Ergebnissen der psychologischen Fragebögen (STAI X2:  $r_p = 0,214$ ;  $p = 0,022$ ; BDI II:  $r_p = 0,189$ ;  $p = 0,043$ ). Auch innerhalb der einzelnen Gruppen zeigte sich ähnliche Korrelationsmuster.

Ein Kruskal-Wallis-Test zeigte, dass sich die zentrale Tendenz der Blutdruckwerte der Patienten und Probanden untereinander signifikant unterschieden (systolischer Blutdruck:  $\chi^2_{(3)} = 27,1$ ;  $p < 0,001$ ; diastolischer Blutdruck:  $\chi^2_{(3)} = 30,4$ ;  $p < 0,001$ ). Die Abbildungen 24 und 25 veranschaulichen dies. Nachfolgende Post-Hoc-Tests ergaben, dass sich die systolischen Werte der gesunden Probanden von jeder einzelnen Gruppe der Patienten in ihrer zentralen Tendenz unterschieden (von den Patienten mit Hydrocortisonsubstitution:  $z = 2,8$ ;  $p = 0,028$ ; von den Patienten mit kontrolliertem Cushing-Syndrom:  $z = 3,6$ ;  $p = 0,002$ ; von den Patienten mit aktivem Cushing-Syndrom:  $z = 3,5$ ;  $p = 0,003$ ). Bei den diastolischen Werten unterschieden sich die Gesunden von den Patienten mit Cushing-Syndrom (kontrolliertes Cushing-Syndrom:  $z = 4,3$ ;  $p < 0,001$ ; aktives Cushing-Syndrom:  $z = 3,3$ ;  $p = 0,005$ ). In absoluten Werten ausgedrückt lag der durchschnittliche Blutdruck der gesunden Probanden bei 118/76 mmHg, bei den Patienten mit Hydrocortisonsubstitution bei 128/81, bei den Patienten mit kontrolliertem Cushing-Syndrom bei 134/86 und bei den Patienten mit aktivem Cushing-Syndrom bei 149/95.



**Abbildung 24:** Verteilung des diastolischen Blutdrucks bei Probanden und Patienten.



**Abbildung 25:** Verteilung des systolischen Blutdrucks bei Probanden und Patienten.

**Tabelle 4:** Merkmale des metabolischen Syndroms der Probanden und Patienten.

Merkmale des metabolischen Syndroms	keine Erkrankung	Hydrocortison-substitution	kontrolliertes Cushing-Syndrom	aktives Cushing-Syndrom	$\chi^2$ (3)	p-Wert
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	23,9 ± 5,4 (118)	26,5 ± 7,4 (37)	25,4 ± 5,8 (16)	30,0 ± 7,5 (5)	8,8	0,032
Taillenumfang [cm]	78,5 ± 14,5 (118)	86,5 ± 16,1 (34)	93,3 ± 31,1 (14)	101,3 ± 17,9 (4)	17,5	0,001
Blutdruck sys. [mmHg]	118,2 ± 14,2 (118)	128,3 ± 19,6 (38)	134,4 ± 15,6 (16)	149,0 ± 14,3 (5)	27,1	< 0,001
Blutdruck dia. [mmHg]	75,8 ± 9,7 (118)	80,9 ± 12,2 (38)	87,5 ± 7,1 (16)	95,0 ± 11,2 (5)	30,4	< 0,001
Triglyceride [mg/dl]	121,2 ± 47,9 (6)	144,7 ± 86,6 (32)	115,5 ± 46,2 (15)	205,0 ± 32,0 (3)	5,2	0,155
$\gamma$ -GT [U/l]	39,0 ± 31,4 (7)	23,1 ± 22,0 (37)	22,4 ± 17,0 (16)	30,6 ± 10,1 (5)	6,2	0,101
HbA1c [%]	5,4 ± 0,2 (5)	5,3 ± 0,5 (29)	5,3 ± 0,4 (16)	5,5 ± 0,2 (5)	3,4	0,330

Die Angaben erfolgten bei kategorialen Variablen jeweils als Mittelwert ± Standardabweichung (absolute Anzahl), bei intervallskalierten Variablen als Median mit Interquartilsrange (absolute Anzahl) und bei kontinuierlichen Variablen als Prozent (absolute Anzahl).

### 3.1.5 Merkmale der Haare und Haarbehandlungen

Bei den genetischen und verhaltensbedingten Merkmalen der Haare zeigten sich die Gruppen recht homogen. Allerdings lagen nicht von jedem Patienten alle Angaben vor. Die Hälfte der Probanden hatte eine helle natürliche Haarfarbe (59), die andere Hälfte dunklere Haare (59). 28 Patienten hatten eine helle natürliche Haarfarbe, 31 eine dunklere. Locken hatten 28 der gesunden Personen, acht der Patienten. Eine Haartönung gaben zwölf gesunde Probanden und sieben Patienten an, 19 gesunden Probanden und elf Patienten färbten sich die Haare. Weitere Haarbehandlungen wie Aufhellung oder Dauerwelle bejahten vier gesunde Probanden. Bei 21 Patienten lag keine Information über jede Art von Haarbehandlungen vor.

Zwei Drittel der gesunden Probanden (70) wuschen sich viermal pro Woche oder seltener die Haare, die restlichen 44 häufiger. Vier Patienten wuschen sich ihre Haare weniger als viermal pro Woche, 32 Patienten wuschen sich die Haare mehr als viermal pro Woche. Damit unterschieden sich die Gruppen bei einem Chi-Quadrat-Test auf einem Signifikanzniveau von  $p = 0,013$  mit  $\chi^2 = 10,8$ .

**Tabelle 5:** Merkmale der Haare und Haarbehandlung der Probanden und Patienten.

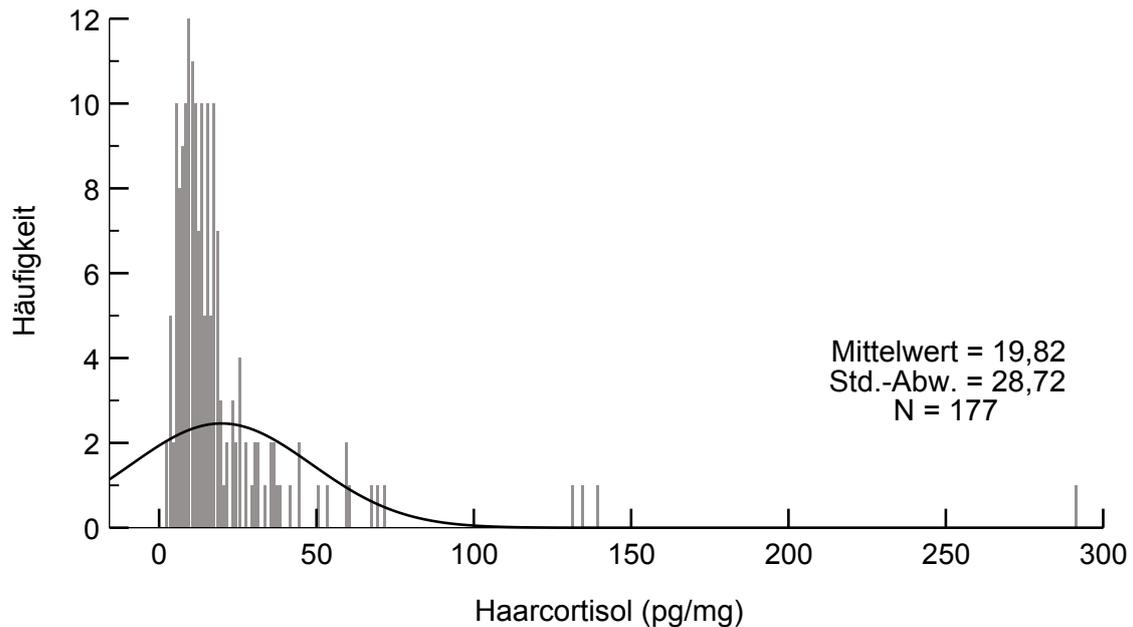
Merkmale der Haare und Haarbehandlung	keine Erkrankung	Hydrocortison-substitution	kontrolliertes Cushing-Syndrom	aktives Cushing-Syndrom	$\chi^2_{(3)}$	p-Wert
natürliche Haarfarbe						
hell	50 (59)	44,7 (17)	62,5 (10)	20,0 (1)	3,2	0,366
dunkel	50 (59)	55,3 (21)	37,5 (6)	80,0 (4)		
Locken						
nein	75,7 (87)	78,3 (18)	66,7 (6)	100 (4)	1,8	0,621
ja	27,4 (28)	21,7 (5)	33,3 (3)			
Haarwäschen						
≤4/Woche	61,4 (70)	95,7 (22)	77,8 (7)	75,0 (3)	10,8	0,013
>4/Woche	38,6 (44)	4,3 (1)	22,2 (2)	25,0 (1)		
Tönung						
nein	89,6 (103)	79,2 (19)	77,8 (7)	100 (4)	3,3	0,345
ja	10,4 (12)	20,8 (5)	1,1 (2)			
Färbung						
nein	83,5 (96)	72,0 (18)	77,8 (7)	50 (2)	4,2	0,241
ja	16,5 (19)	28,0 (7)	22,2 (2)	50 (2)		
Haarbehandlung <sup>a</sup>						
nein	96,5 (111)	100 (24)	100 (9)	100 (4)	1,322	0,724
ja	3,5 (4)					

Die Angaben erfolgten bei kategorialen Variablen jeweils als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (absolute Anzahl), bei intervallskalierten Variablen als Median mit Interquartilsrange (absolute Anzahl) und bei kontinuierlichen Variablen als Prozent (absolute Anzahl). <sup>a</sup>Haarbehandlung beinhaltet Dauerwelle und Aufhellungen.

## 3.2 Einflussfaktoren der Cortisolbestimmung im Haar

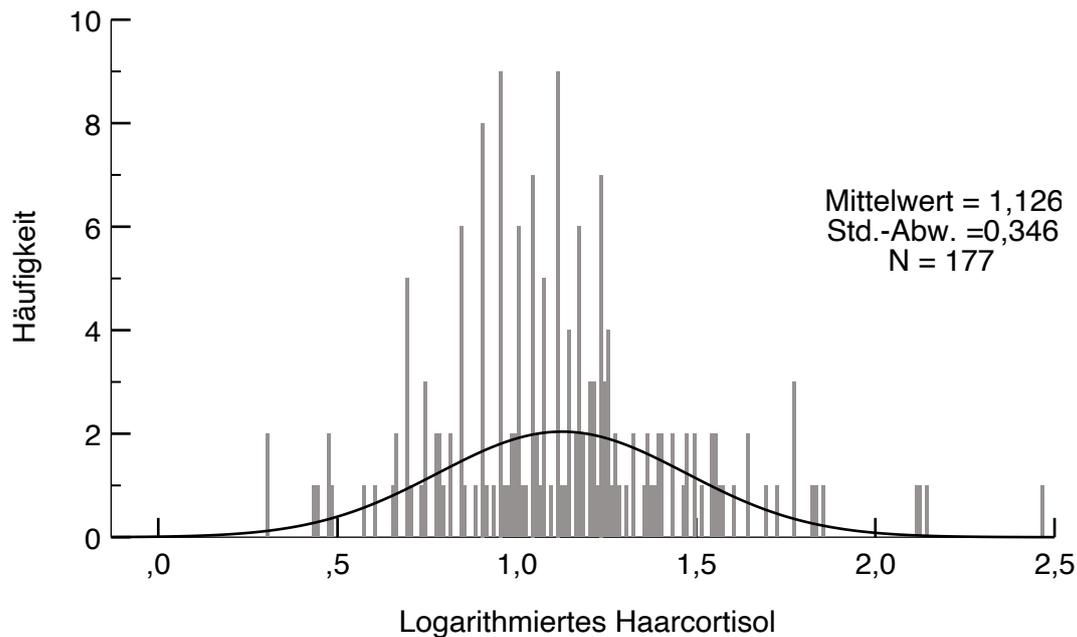
### 3.2.1 Verteilung der Messwerte des Haarcortisols

Die gemessenen Cortisolwerte aller Haarproben lagen zwischen 2 und 291 pg/mg Haar. Der Mittelwert lag bei  $19,8 \pm 28,7$  pg/mg Haar. Der Median lag bei 13,0 pg/mg Haar bei einer IQR von 8–18,5 pg/mg Haar. Die Verteilung zeigte eine Schiefe von  $6,1 \pm 0,2$  und eine Kurtosis von  $48,5 \pm 0,4$ . Sie ist in Abbildung 26 dargestellt.



**Abbildung 26:** Verteilung des Haarcortisols bei allen Haarproben.

Zunächst wurde die Verteilung der Messwerte des Cortisolgehalts im Haar graphisch auf ihre Übereinstimmung mit einer Gaußschen Normalverteilung überprüft. Ein Kolmogorow-Smirnow-Anpassungstest ließ für die Gesamtheit der Haarproben keine Normalverteilung annehmen ( $z = 0,280$ ,  $p < 0,001$ ,  $n = 177$ ). Daher wurden die Haarcortisolwerte logarithmiert, doch auch hier konnte ein Kolmogorow-Smirnow-Anpassungstest keine Normalverteilung zeigen, obwohl durch eine graphische Überprüfung eine ungefähre Normalverteilung noch anzunehmen wäre ( $z = 0,100$ ,  $p < 0,001$ ,  $n = 177$ ), siehe Abbildung 27.



**Abbildung 27:** Verteilung des logarithmierten Haarcortisols bei allen Haarproben.

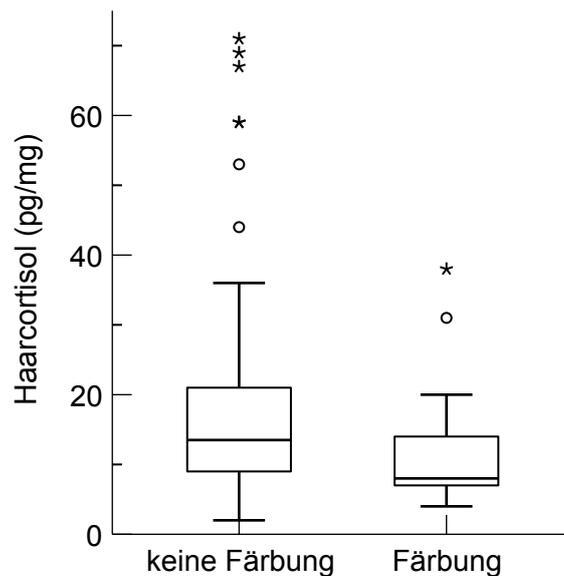
Diese Untersuchung wurde sowohl für die Gesamtheit der Proben als auch nach den Erkrankungsgruppen unterteilt durchgeführt, hier zeigte sich für die gesunden und die Patienten mit kontrolliertem und aktivem Cushing-Syndrom eine Annahme der Normalverteilung für die logarithmierten Haarcortisolwerte ( $p = 0,079$ ,  $p = 0,200$ ,  $p = 0,200$ ), aber nicht für die Patienten mit Hydrocortisonsubstitution ( $p = 0,007$ ). Daher konnte für die statistischen Tests keine Normalverteilung des Haarcortisolwertes angenommen werden. Allerdings wurden diejenigen Tests, die gegenüber geringen Abweichungen von der Normalverteilung robust sind, dennoch durchgeführt. In den anderen Fällen wurde auf nicht parametrische Tests zurückgegriffen bzw. der logarithmierte Haarcortisolwert verwendet. Zur Beschreibung der Charakteristika wurde jedoch wegen der leichteren Verständlichkeit der Cortisolwert in pg/mg Haar verwendet. Die Werte wurden als Mittelwert und Standardabweichung für kontinuierliche Variablen und in Prozentangaben für kategoriale Variablen dargestellt.

### 3.2.2 Einflussfaktoren der Cortisolbestimmung im Haar bei gesunden Probanden

Anhand der Angaben der gesunden Probanden ist geprüft worden, welche physiologischen Einflüsse es auf den Cortisolspiegel gibt. Dafür wurden für die intervallskalierten bzw. ordinalskalierten Variablen Korrelationskoeffizienten nach Pearson bzw. Spearman berechnet. Bei den 118 gesunden Probanden ließ sich jedoch keine statistisch signifikante Korrelation des Haarcortisolspiegels mit einem der erhobenen Parameter nachweisen. Für die ordinalen Parameter wurde ein Vergleich der

zentralen Tendenzen mittels Mann-Whitney-U-Test und die graphische Darstellung mittels Boxplot durchgeführt.

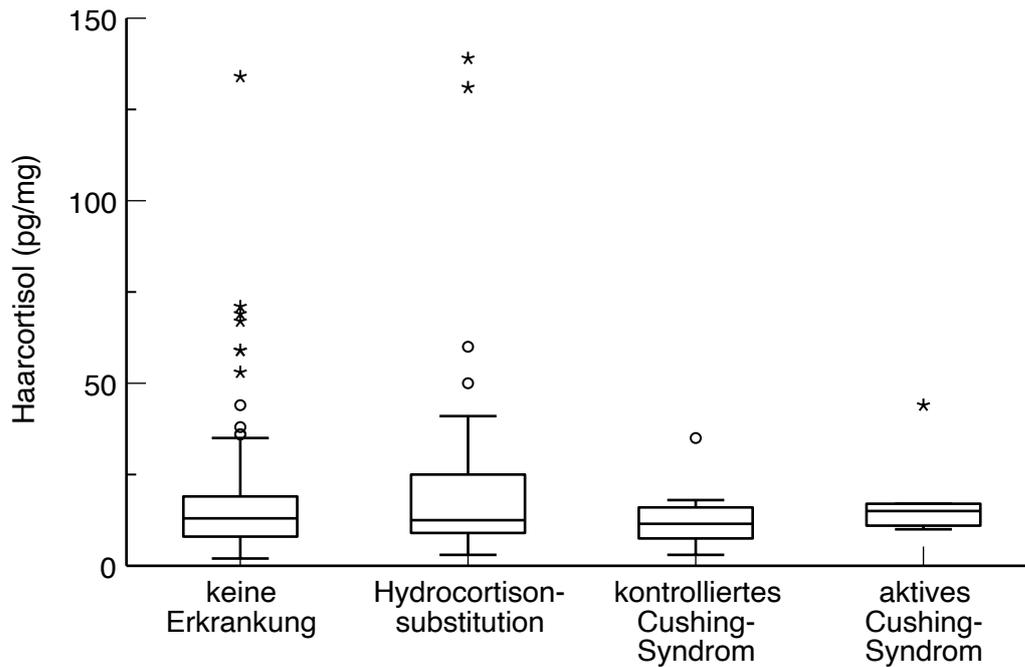
Es zeigte sich ein statistisch signifikanter, wenn auch schwacher Unterschied zwischen gefärbten und ungefärbten Haaren ( $z = -2,341$ ;  $p = 0,019$ ;  $r = 0,22$ ;  $n = 115$ ). Bei einem Median von 13,5 pg/mg Haar (IQR = 9–21 pg/mg) hatten ungefärbte Haare einen höheren Cortisolgehalt als gefärbte mit einem Median von 8 pg/mg (IQR = 7–15). Dies ist in Abbildung 28 dargestellt.



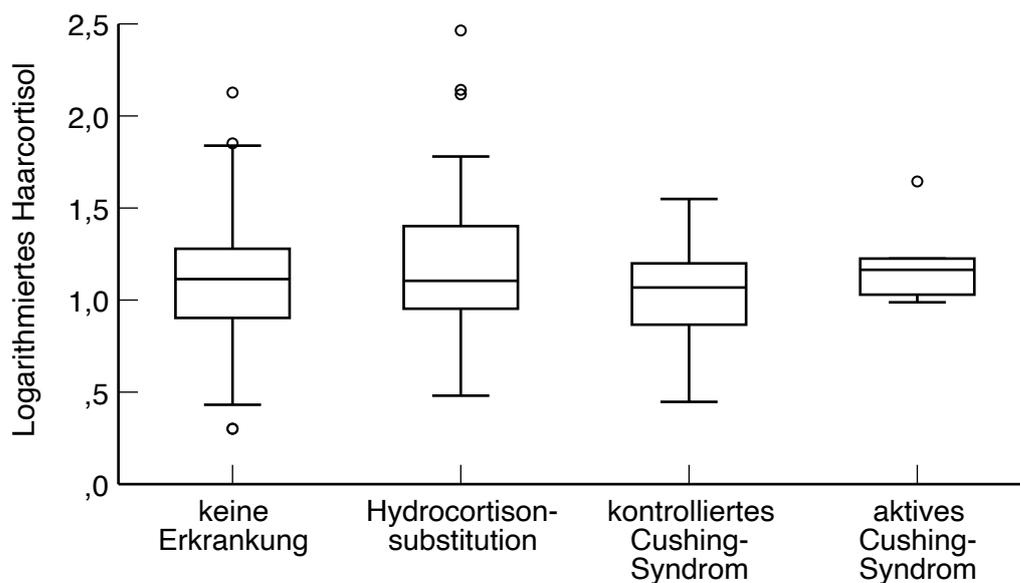
**Abbildung 28:** Haarcortisol bei gefärbten und ungefärbten Haaren der gesunden Probanden (ohne Ausreißer).

### 3.2.3 Einflussfaktoren der Cortisolbestimmung bei allen Haarproben

Die Prüfung der zentralen Tendenzen des Haarcortisols in den Gruppen nach Erkrankung konnte mittels Kruskal-Wallis-Tests keine Hinweise auf signifikante Unterschiede erbringen ( $H_3 = 1,956$ ;  $p = 0,582$ ; Abbildung 29). Um einen Einfluss nicht zu übersehen wurde eine einfaktorische Varianzanalyse durchgeführt mit den logarithmierten Haarcortisolwerten, doch hier konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede der Mittelwerte des logarithmierten Haarcortisols nach Erkrankungsgruppe gezeigt werden ( $F_{3,173} = 1,196$ ;  $p = 0,313$ ; Abbildung 30). Dabei zeigten die gesunden Probanden einen Haarcortisolspiegel von  $17,6 \pm 17,5$  pg/mg, ähnlich dem der Patienten mit kontrolliertem Cushing-Syndrom mit  $12,6 \pm 7,6$  pg/mg und diejenigen mit hoher Krankheitsaktivität mit  $19,4 \pm 14,0$  pg/mg. Die Patienten mit Hydrocortisonsubstitution lagen etwas höher und vor allem in einem breiteren Bereich mit  $29,9 \pm 52,6$  pg/mg.



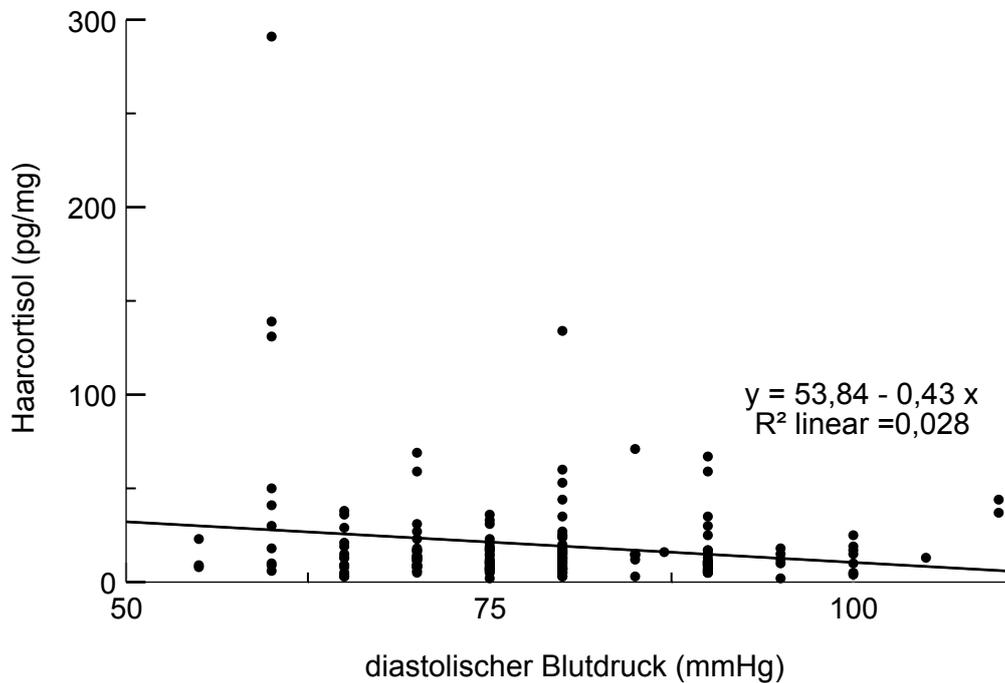
**Abbildung 29:** Vergleich des Haarcortisols der Probanden und Patienten (ohne Ausreißer).



**Abbildung 30:** Vergleich des logarithmierten Haarcortisols der Probanden und Patienten.

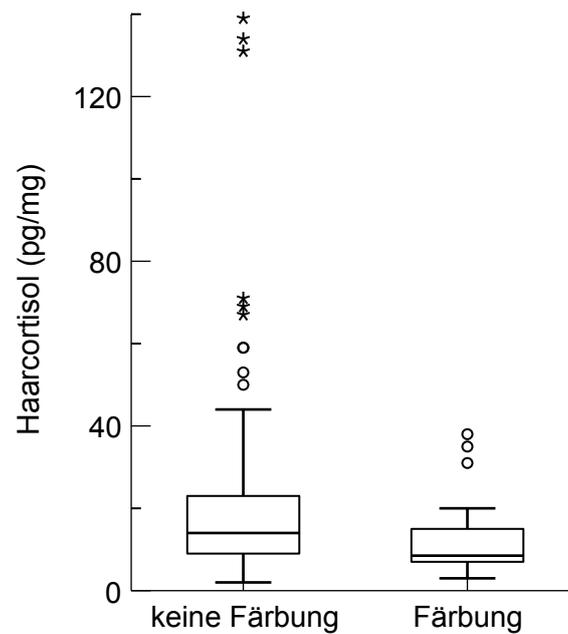
Es wurden in einer weiteren Untersuchung alle Haarproben zur Überprüfung eines Einflusses berücksichtigt. Es zeigte sich über alle Haarproben hinweg eine schwache Korrelation des Haarcortisols zum diastolischen Blutdruck ( $r_p = 0,167$ ;  $p = 0,027$ ). Die Höhe des diastolischen Blutdruckes ließ Rückschlüsse auf den Haarcortisolspiegel zu ( $F_{1,175} = 5,006$ ,  $p = 0,027$ ). Mit 1 mmHg höherem Blutdruck sank der Haarcortisolwert um 0,433 pg/mg. So konnten 2,2 % der Streuung des Haarcortisols über den

diastolischen Blutdruck vorhergesagt werden. Der Zusammenhang des Haarcortisols mit dem diastolischen Blutdruck ist in Abbildung 31 dargestellt.



**Abbildung 31:** Zusammenhang des Haarcortisols mit dem diastolischen Blutdruck der Probanden und Patienten.

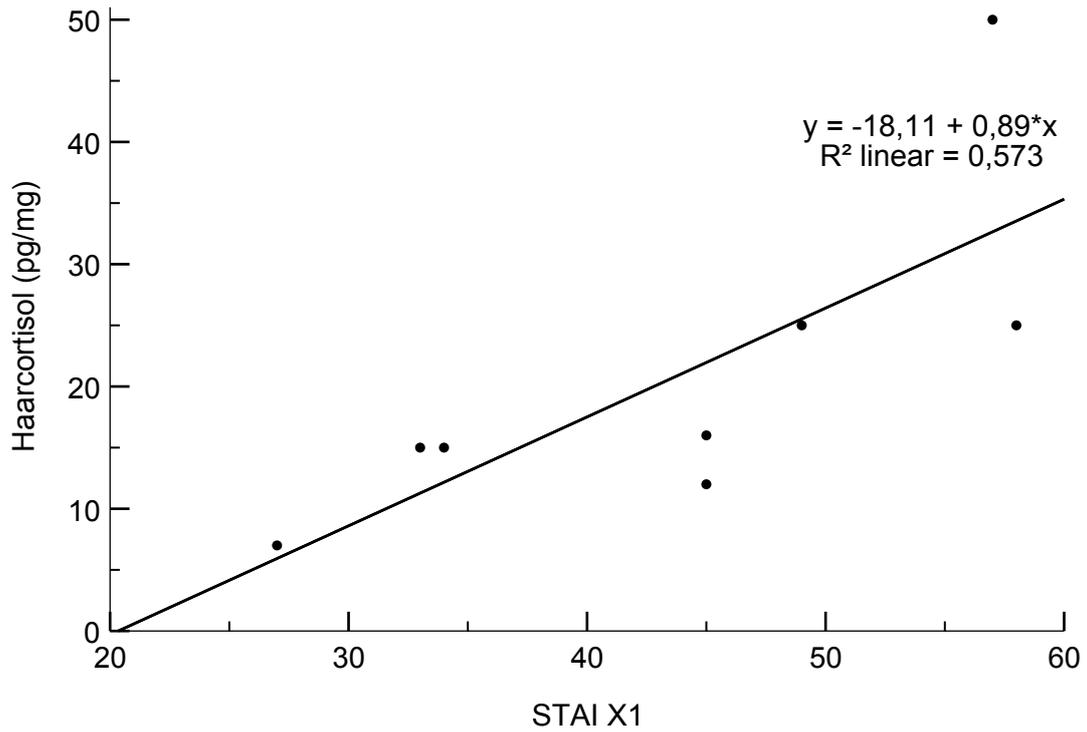
Unter Berücksichtigung aller Haarproben zeigte sich im Mann-Whitney-U-Test ein statistisch signifikanter Unterschied des Haarcortisolspiegels mit der Färbung des Haares ( $z = -2,585$ ,  $p = 0,010$ ). Nicht gefärbte Haare wiesen einen höheren Haarcortisolspiegel auf (Median = 14,0 pg/mg; IQR = 9–23 pg/mg) als gefärbte (Median = 8,5pg/mg; IQR = 7–15pg/mg). Dies zeigt Abbildung 32. Die Effektstärke nach Cohen (1992) lag bei  $r = 0,021$  und entsprach einem geringen Effekt.



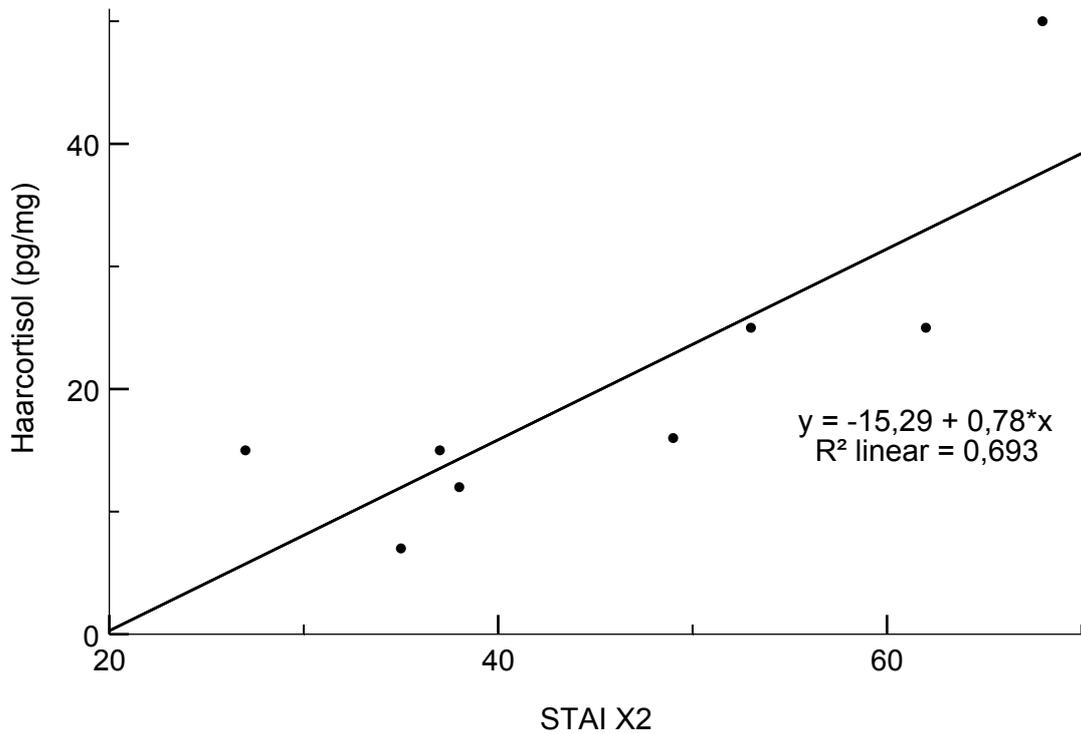
**Abbildung 32:** Haarcortisol der gefärbten und ungefärbten Haare bei Probanden und Patienten (ohne Ausreißer).

### 3.2.4 Einflussfaktoren der Cortisolbestimmung im Haar bei Patienten mit Hydrocortisonsubstitution

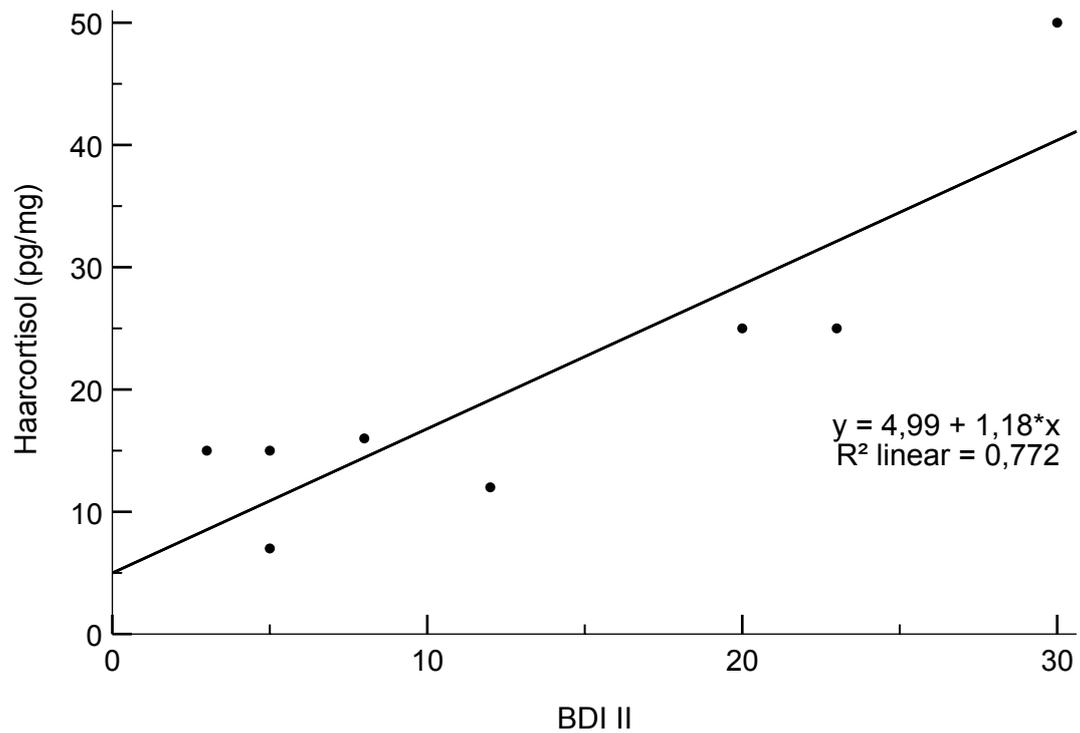
Bei den anschließenden Analysen nach Untergruppen korrelierte der Haarcortisolwert bei Patienten mit Hydrocortisonsubstitution stark gleichsinnig mit den Ergebnissen in den psychologischen Fragebögen über das momentane ( $r_s = 0,849$ ) und allgemeine Angsterleben ( $r_s = 0,855$ ) sowie über Ergebnissen des BDI ( $r_s = 0,758$ ). Es ergaben sich p-Werte von 0,007 bis 0,029. Die Regressionsmodelle waren signifikant ( $p = 0,030$ ;  $p = 0,010$ ;  $p = 0,004$ ). Sie sind in den Abbildungen 33-35 veranschaulicht.



**Abbildung 33:** Zusammenhang des Haarcortisols und des STAI X1 bei Patienten mit Hydrocortisonsubstitution.

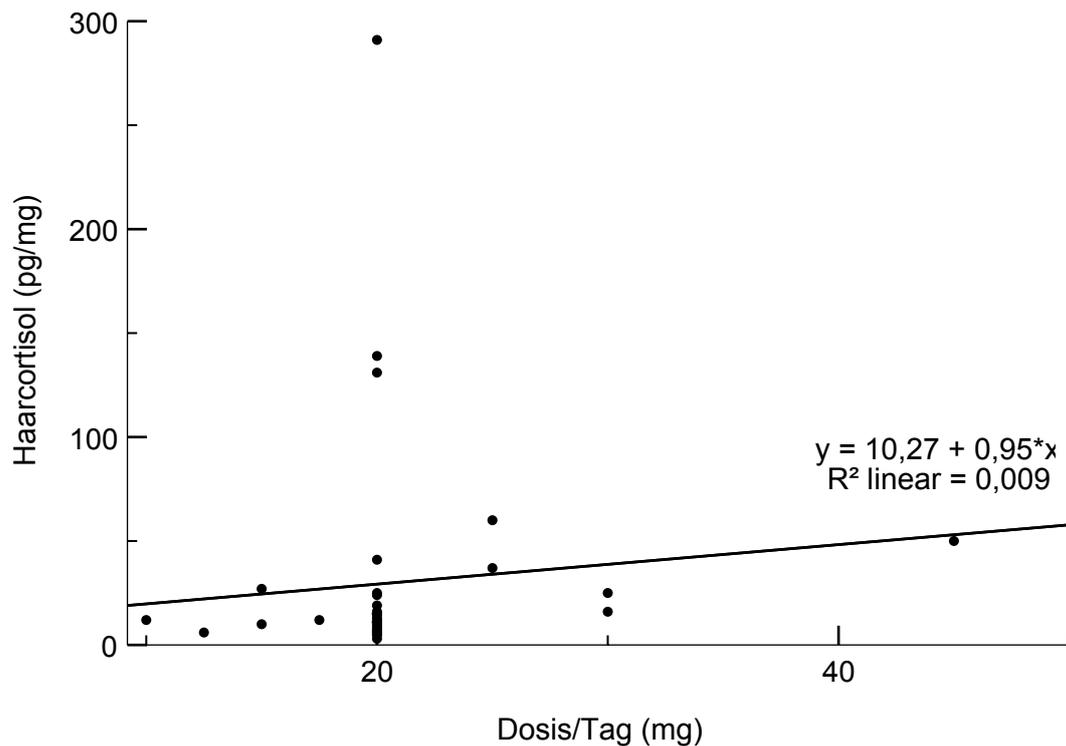


**Abbildung 34:** Zusammenhang des Haarcortisols und des STAI X2 bei Patienten mit Hydrocortisonsubstitution.



**Abbildung 35:** Zusammenhang des Haarcortisols und des BDI II bei Patienten mit Hydrocortisonsubstitution.

Auch die Substitutionsdosis Cortisol pro Tag in mg verhielt sich gleichsinnig zu dem Haarcortisolspiegel und korrelierte mittelstark mit einem Rangkorrelationskoeffizienten Spearmans rho von 0,342 und einem p-Wert von 0,036. Allerdings war das Regressionsmodell nicht signifikant. Der Zusammenhang des Haarcortisols und der Substitutionsdosis ist in Abbildung 36 dargestellt.



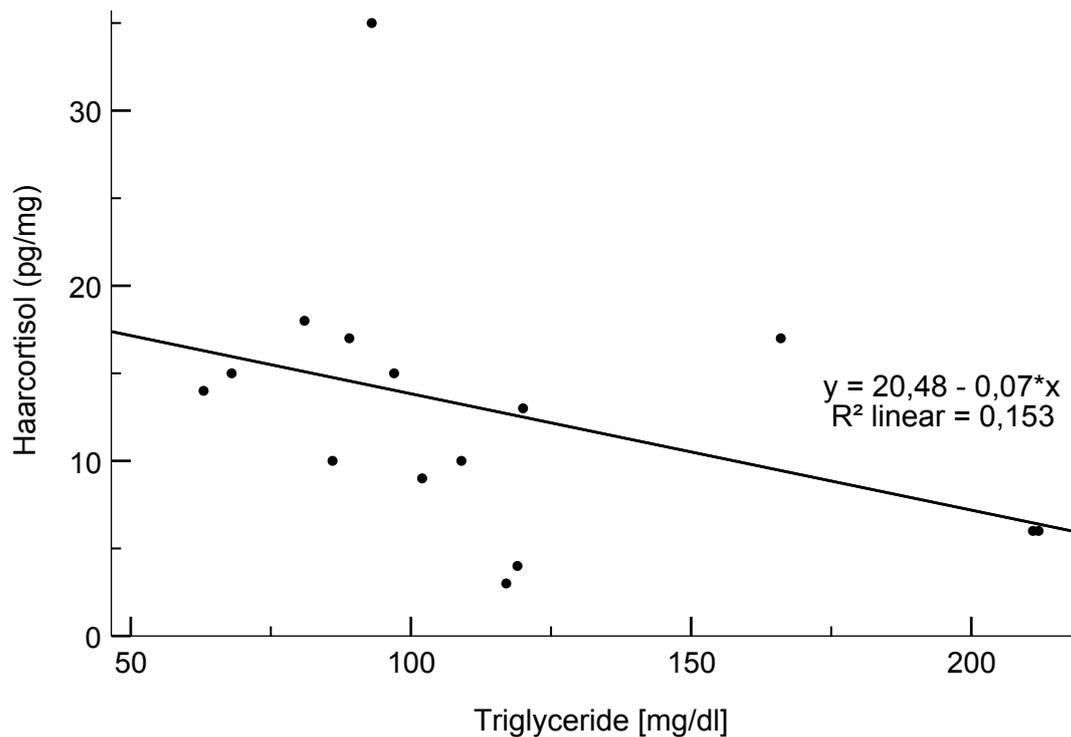
**Abbildung 36:** Zusammenhang des Haarcortisols und der Substitutionsdosis.

Ein Mann-Whitney-U-Test konnte keine Unterschiede bezüglich der Verteilung des Haarcortisols durch die unterschiedlichen Substitutionspräparate zeigen ( $U = 169,5$ ;  $p = 0,334$ ).

Auch bei alleiniger Betrachtung der Patienten mit Hydrocortisonsubstitution zeigte sich eine gleichsinnige Korrelation zwischen dem diastolischen und dem systolischen Blutdruck mit dem Haarcortisolspiegel ( $r_p = 0,479$ ;  $p = 0,002$ ,  $r_p = 0,336$ ;  $p = 0,039$ ).

### 3.2.5 Einflussfaktoren der Cortisolbestimmung im Haar bei Patienten mit kontrolliertem Cushing-Syndrom

Bei Patienten mit kontrolliertem Cushing-Syndrom zeigte sich ein statistischer Zusammenhang zwischen den Triglyceridwerten im Blut und dem Haarcortisolspiegel ( $r_s = 0,522$ ;  $p = 0,046$ ), wobei bei höheren Triglyceridspiegeln das Cortisol im Haar sank., dargestellt in Abbildung 37. Das Regressionsmodell war nicht signifikant.



**Abbildung 37:** Zusammenhang des Haarcortisols und der Triglyceridwerte bei Patienten mit kontrolliertem Cushing-Syndrom.

### 3.2.6 Einflussfaktoren der Cortisolbestimmung im Haar bei Patienten mit aktivem Cushing-Syndrom

Die vier Patienten mit aktivem Cushing-Syndrom zeigten eine absolute Rangkorrelation zwischen STAI X2 bzw. BDI II und dem Haarcortisolspiegel, allerdings ist diese aufgrund der geringen Fallzahl als nicht aussagekräftig einzuschätzen.

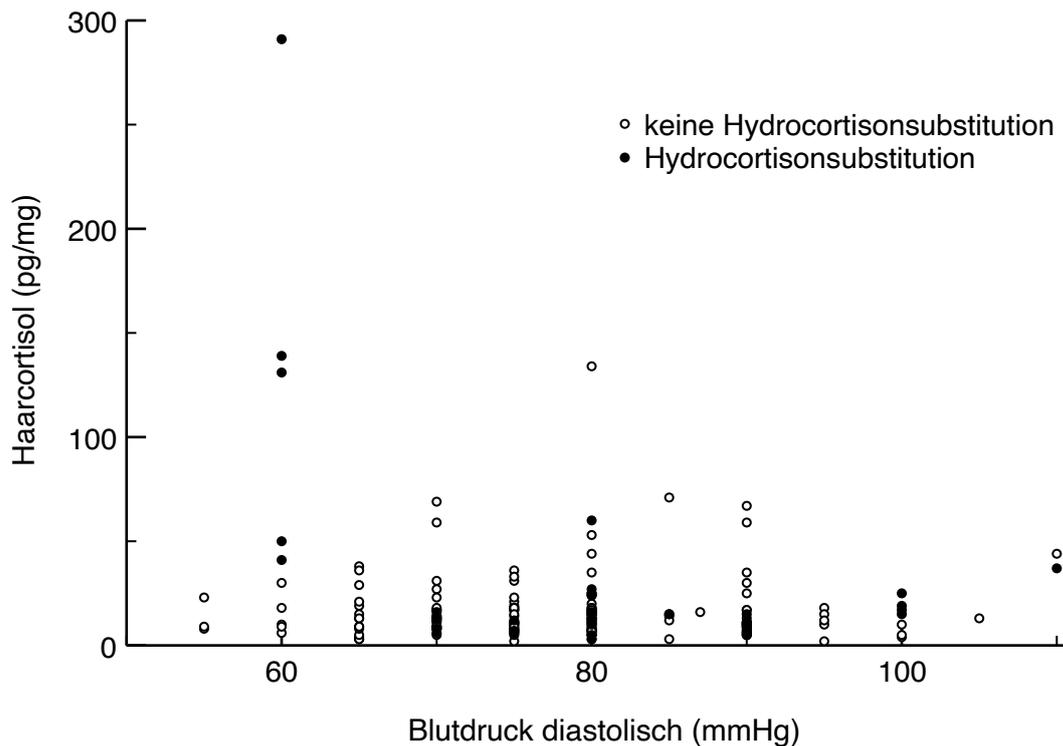
### 3.2.7 Zusammenhang der Einflussfaktoren der Cortisolbestimmung im Haar

Um eine adäquatere Vorhersage auf den Haarcortisolwert bei Kenntnis verschiedener Parameter treffen zu können, wurde eine multiple Regressionsanalyse erstellt.

Zunächst wurde die Überprüfung der Voraussetzungen durchgeführt. Dafür wurde eine Streumatrix angefertigt für alle Variablen, partielle Regressionsdiagramme sowie Diagramm der standardisierten Residuen. Es kann ein linearer Zusammenhang zwischen den Variablen angenommen werden (Gauss-Markov-Annahme 1). Die Daten entstammen einer Zufallsstichprobe (Gauss-Markov-Annahme 2) und die Ausprägungen der unabhängigen Variablen sind nicht konstant (Gauss-Markov-Annahme 4), ebenso hat ihr Fehlerwert ungefähr einen Erwartungswert von 0 (Gauss-Markov-Annahme 3). Die Unabhängigkeit und Normalverteilung der Fehlerwerte kann graphisch nur annäherungsweise angenommen werden. Die Homoskedastizität (Gauss-Markov-

Annahme 5), kann wenn auch nicht vollständig, dennoch annäherungsweise angenommen werden.

Die Regressionsanalyse wurde mit schrittweisem Variableneinschluss und paarweisem Fallausschluss der erhobenen Parameter durchgeführt. Wiederum wurden zunächst nur die gesunden Probanden betrachtet, wobei sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zeigen ließen. Bei Hinzunahme aller Haarproben unter *Dummy*-Kodierung der Erkrankungsgruppen sowie wiederum paarweisem Fallausschluss zeigte eine multiple Regressionsanalyse, dass nur der diastolische Blutdruck und die Hydrocortisonsubstitution einen signifikanten Einfluss auf die Streuung des Haarcortisols hatten,  $F(2, 122) = 4,557$ ,  $p = 0,012$ ,  $n = 124$ . Abbildung 38 veranschaulicht den Einfluss des diastolischen Blutdrucks in Abhängigkeit von der Hydrocortisonsubstitution auf den Haarcortisolspiegel. Steigt die Hydrocortisonsubstitution um ein Milligramm pro Tag, steigt auch das Cortisol im Haar um 14pg/mg an. Steigt der diastolische Blutdruck um 1 mmHg, sinkt das Cortisol im Haar um 0,5 pg/mg. Allerdings wurden gemeinsam nur 5,4 % der Streuung des Haarcortisols durch diese zwei unabhängigen Variablen erklärt. Für dieses Modell wurden Parameter ausgeschlossen, die zu viele fehlende Werte aufwiesen. Eingeschlossen wurden gesunde Probanden, Patienten mit Hydrocortisonsubstitution, mit kontrolliertem und aktivem Cushing-Syndrom, Alter, BMI, systolischer und diastolischer Blutdruck, Taillenumfang, Geschlecht, natürliche Haarfarbe, Locken, Häufigkeit der Haarwäschen, Tönung und Färbung der Haare, Ergebnisse aus STAI und BDI II sowie aktuelles Rauchen.



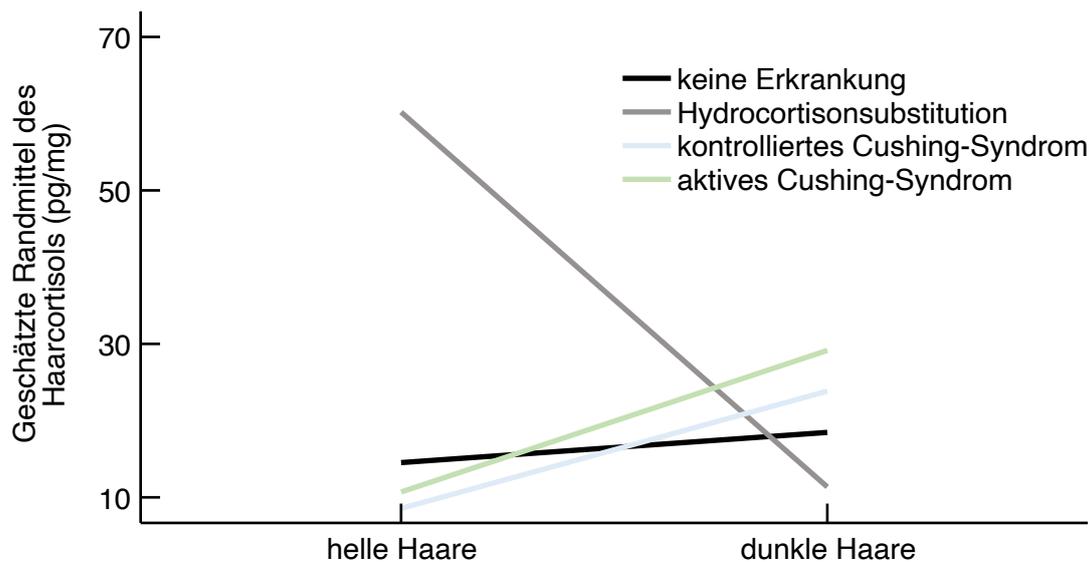
**Abbildung 38:** Einfluss des diastolischen Blutdrucks und der Hydrocortisonsubstitution auf den Haarcortisolspiegel.

Um Haupteffekte und Interaktionseffekte genauer betrachten zu können, wurde eine mehrfaktorielle Varianzanalyse mit Kovariaten durchgeführt. Zunächst wurden dafür wiederum die Voraussetzungen geprüft, die teilweise mit der Regressionsanalyse übereinstimmten. Eine Unabhängigkeit der Gruppen lag vor. Eine Normalverteilung der abhängigen Variablen innerhalb jeder der Gruppen lag nur näherungsweise vor, wegen der Gruppengröße kann diese Voraussetzung dennoch angenommen werden. Obwohl ein Levene-Test für Homogenität der Varianzen des Haarcortisols mit  $F_{18,133} = 8,870$  und  $p < 0,001$  keinen Ausschluss der Heterogenität der Varianzen zuließ, wurde trotzdem die Analyse durchgeführt, da die Gruppengröße recht groß war. Dennoch konnte eine Verzerrung des F-Tests nicht ganz ausgeschlossen werden.

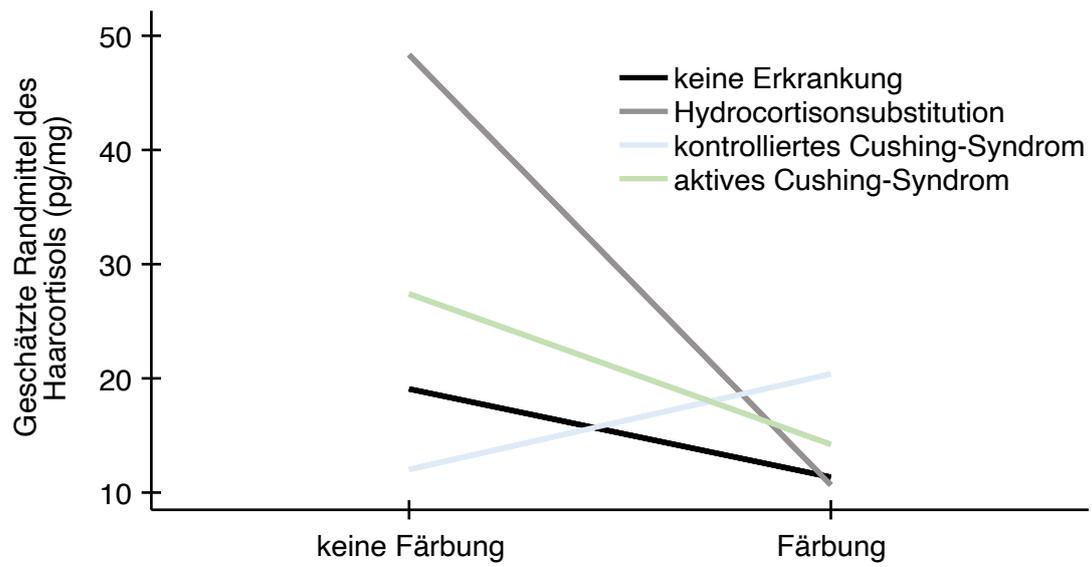
Aufgrund theoretischer Überlegungen zur Relevanz wurden folgende unabhängige Faktoren ausgewählt: Erkrankung, Geschlecht, natürliche Haarfarbe und Färbung. Mit einzig BMI als Kovariate zeigte dieses Gesamtmodell einen signifikanten Zusammenhang der Faktoren mit dem Haarcortisolspiegel ( $F_{19,132} = 3,624$ ,  $p < 0,001$ , partielles  $\eta^2 = 0,343$ ,  $n = 152$ , korrigiertes  $R^2 = 0,248$ , siehe Tabelle 6). Mit diesem Modell konnten 25 % der Streuung um den Gesamtmittelwert der Haarcortisolwerte erklärt werden. BMI selbst zeigte keinen statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem Haarcortisolspiegel ( $F_{1,132} = 0,008$ ,  $p = 0,927$ ). Auch bei keinem der Faktoren ließ sich ein signifikanter Haupteffekt auf den Haarcortisolspiegel nachweisen. Ohne

Berücksichtigung der Kovariate BMI wurden durch Bonferroni korrigierte Post-hoc-Tests signifikante Unterschiede zwischen den gesunden Probanden (Haarcortisol:  $17,81 \pm 17,67$  pg/mg) und den Patienten mit Hydrocortisonsubstitution (Haarcortisol:  $36,68 \pm 63,42$  pg/mg) erkennbar.

Interaktionseffekte zeigten sich statistisch signifikant für die Erkrankung bei natürlicher Haarfarbe ( $F_{2,132} = 6,095$ ,  $p = 0,003$ ) und Färbung ( $F_{2,132} = 4,952$ ,  $p = 0,008$ ) sowie miteinander ( $F_{2,132} = 5,486$ ,  $p = 0,005$ ). So enthielte dunklere Haaren eher einen höheren Cortisolgehalt, bei Patienten mit Hydrocortisonsubstitution hatten jedoch diejenigen mit helleren Haaren höhere Haarcortisolspiegel. Ebenso ließ sich in gefärbten Haaren weniger Cortisol nachweisen, nur bei den Patienten mit kontrolliertem Cushing-Syndrom war es umgedreht. Die Effektstärken waren für die Interaktionen zwischen Erkrankung und natürlicher Haarfarbe ( $f = 0,3$ ), zwischen Erkrankung und Haarfärbung ( $f = 0,27$ ) und zwischen Erkrankung, Haarfarbe und Haarfärbung ( $f = 0,29$ ) nach Cohen (1992) als mittel einzustufen. Die Abbildungen 39 und 40 verdeutlichen die Interaktionseffekte.



**Abbildung 39:** Profildiagramm für Haarcortisol und natürlicher Haarfarbe mit getrennten Linien für Probanden und Patienten, Berechnung der Kovariate im Modell mit  $BMI = 24,21$  kg/m<sup>2</sup>.



**Abbildung 40:** Profildiagramm für Haarcortisol und Haarfärbung mit getrennten Linien für Probanden und Patienten. Berechnung der Kovariate im Modell mit BMI = 24,21 kg/m<sup>2</sup>.

**Tabelle 6:** Auszug der Zwischensubjekteffekte der mehrfaktoriellen Varianzanalyse mit Kovariaten.

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Part. Eta-Quadrat	Effektstärke f
Korrigiertes Modell	48375,386a	19	2546,073	3,624	,000	,343	0,72
Konstanter Term	2302,733	1	2302,733	3,277	,073	,024	0,16
BMI	5,861	1	5,861	,008	,927	,000	0,00
Gruppe	3099,639	3	1033,213	1,470	,226	,032	0,18
Geschlecht	1806,205	1	1806,205	2,571	,111	,019	0,14
Natürliche Haarfarbe	806,960	1	806,960	1,148	,286	,009	0,10
Haarfärbung	2418,292	1	2418,292	3,442	,066	,025	0,16
Gruppe * Geschlecht	2360,601	1	2360,601	3,360	,069	,025	0,16
Gruppe * natürliche Haarfarbe	8565,117	2	4282,558	6,095	,003	,085	0,30
Gruppe * Färbung	6958,319	2	3479,159	4,952	,008	,070	0,27
Geschlecht * natürliche Haarfarbe	1335,503	1	1335,503	1,901	,170	,014	0,12
Geschlecht * Färbung	,000	0	.	.	.	,000	0,00
Natürliche Haarfarbe * Färbung	2514,842	1	2514,842	3,579	,061	,026	0,16
Gruppe * Geschlecht * natürliche Haarfarbe	444,277	1	444,277	,632	,428	,005	0,07
Gruppe * Geschlecht * Färbung	,000	0	.	.	.	,000	0,00
Gruppe * natürliche Haarfarbe * Färbung	7710,020	2	3855,010	5,486	,005	,077	0,29
Geschlecht * natürliche Haarfarbe * Färbung	,000	0	.	.	.	,000	0,00
Gruppe * Geschlecht * natürliche Haarfarbe * Färbung	,000	0	.	.	.	,000	0,00
Fehler	92748,818	132	702,643				
Gesamt	207027,000	152					
Korrigierte Gesamtvariation	141124,204	151					

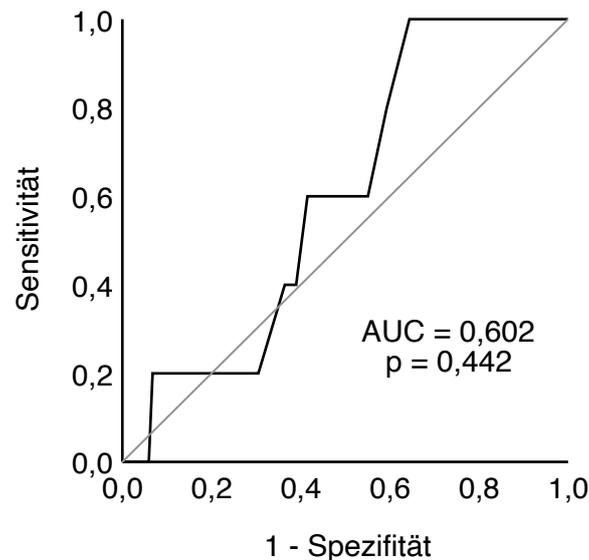
R-Quadrat = 0,343 (korrigiertes R-Quadrat = 0,248)

Abhängige Variable: Haarcortisol (pg/mg).

### 3.3 Anwendbarkeit zur Diagnostik bei Störungen des Cortisolstoffwechsels

Um eine mögliche Anwendbarkeit der Messung des Haarcortisolspiegels zur Diagnostik bei Störungen des Cortisolstoffwechsels zu überprüfen, wurden die Patienten mit einem floriden Cushing-Syndrom der Gruppe der gesunden Probanden gegenübergestellt. Ein T-Test zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Patienten mit floridem Cushing-Syndrom und den gesunden Probanden ( $t = 0,228$ ,  $p = 0,820$ ).

Bei einer *Receiver-Operating-Characteristics*-Analyse (ROC-Analyse) ergab sich, dass bei einem mittels *Youden Index* identifizierten optimalen *Cut-off* von 9,5 pg/mg eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 35 % erreicht werden konnte. Allerdings war das Ergebnis nicht signifikant ( $p = 0,442$ ) und die Gruppengrößen waren sehr unterschiedlich. Die Fläche unter der Kurve (AUC) betrug 0,602 (95 % Konfidenzintervall = 0,415–0,788) und ist in Abbildung 41 dargestellt.



**Abbildung 41:** Ergebnisse der ROC Analysen: Die Achsen geben die Wahrscheinlichkeit wieder, dass Patienten mit Cushing-Syndrom von Nicht-Erkrankten unterschieden werden können.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Gruppen zeigten, dass es einen großen Überschneidungsbereich gab. Denn die Haarkonzentrationen der gesunden Probanden lagen schon im Mittel über dem *Cut-off* mit  $17,6 \pm 17,5$  pg/mg. Viele Patienten mit aktivem Hypercortisolismus, im Mittel  $19,4 \pm 14,0$  pg/mg, lagen weit darunter.

Da keine Patienten mit Verdacht auf Nebenniereninsuffizienz in die Studie eingeschlossen worden waren, kann über die Anwendbarkeit auf die Diagnose einer Nebenniereninsuffizienz keine Aussage getroffen werden.

### 3.4 Anwendbarkeit zur Beurteilung eines Therapieansprechens

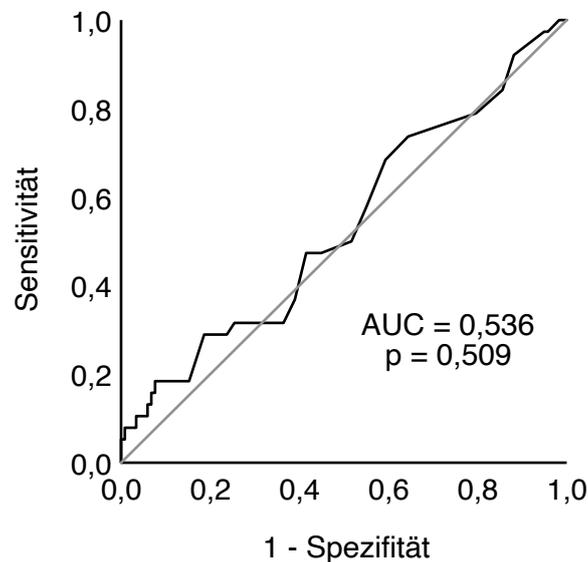
Ein weiterer untersuchter Aspekt war die Anwendung der Messung des Haarcortisolspiegels in der klinischen Routine zur Überprüfung der Therapie.

#### 3.4.1 Überprüfung der Hydrocortisonsubstitution

Zur Überprüfung der Hydrocortisonsubstitution wurde der Cortisolgehalt im Haar der Patienten mit Hydrocortisonsubstitution mit dem der gesunden Probanden verglichen.

Ein asymptotischer Mann-Whitney-U-Test zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen ( $z = 0,661$ ,  $p = 0,508$ ). Die gesunden Probanden wiesen einen Haarcortisolspiegel von  $17,6 \pm 17,5$  pg/mg auf. Die Patienten mit Hydrocortisonsubstitution lagen mit  $29,9 \pm 52,6$  pg/mg höher.

Eine ROC-Kurve zeigte wiederum ohne statistische Signifikanz ( $p = 0,509$ ), dass bei einem *Cut-off* von 36,5 pg/mg bei einer Sensitivität von 18 % eine Spezifität von 93 % vorliegt. Bei einem *Cut-off* von 23,5 pg/mg wäre es bereits eine Sensitivität von 28 %, bei einer Spezifität von 81 %. Die in Abbildung 42 dargestellte Fläche unter der Kurve (AUC) betrug 0,536 (95 % Konfidenzintervall = 0,428–0,643).

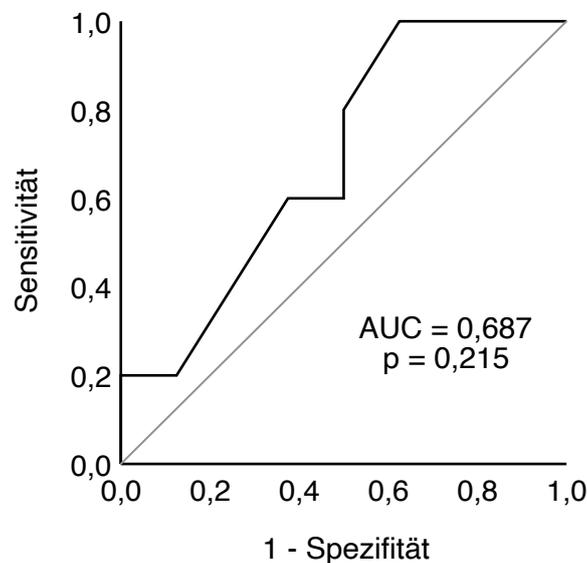


**Abbildung 42:** Ergebnisse der ROC Analysen: Die Achsen geben die Wahrscheinlichkeit wieder, dass Patienten mit Hydrocortisonsubstitution von Nicht-Substituierten unterschieden werden können.

### 3.4.2 Überprüfung des Therapieansprechens bei Hypercortisolismus

Um das Therapieansprechen bei Hypercortisolismus zu überprüfen, wurden die Patienten mit aktivem Cushing-Syndrom den Patienten mit kontrolliertem Hypercortisolismus gegenübergestellt. Ein exakter Mann-Whitney-U-Test zeigte, dass sich die Mittelwerte der beiden Gruppen nicht signifikant voneinander unterscheiden ließen ( $z = -1,244$ ,  $p = 0,240$ ). In absoluten Zahlen ausgedrückt hatten Patienten mit kontrolliertem Cushing-Syndrom mit  $12,6 \pm 7,6$  pg/mg tendenziell eine niedrigere Cortisolkonzentration im Haar als diejenigen mit hoher Krankheitsaktivität mit  $19,4 \pm 14,0$  pg/mg. Eine ROC-Analyse zeigte, dass ein geeigneter Grenzwert als Hinweis auf eine nötige Verbesserung der Therapie bei 9,5 lag. Die in Abbildung 43 dargestellte AUC

betrug 0,687 (95 % Konfidenzintervall = 0,443–0,932) und ist. Diese Analyse war statistisch nicht signifikant ( $p = 0,087$ ).



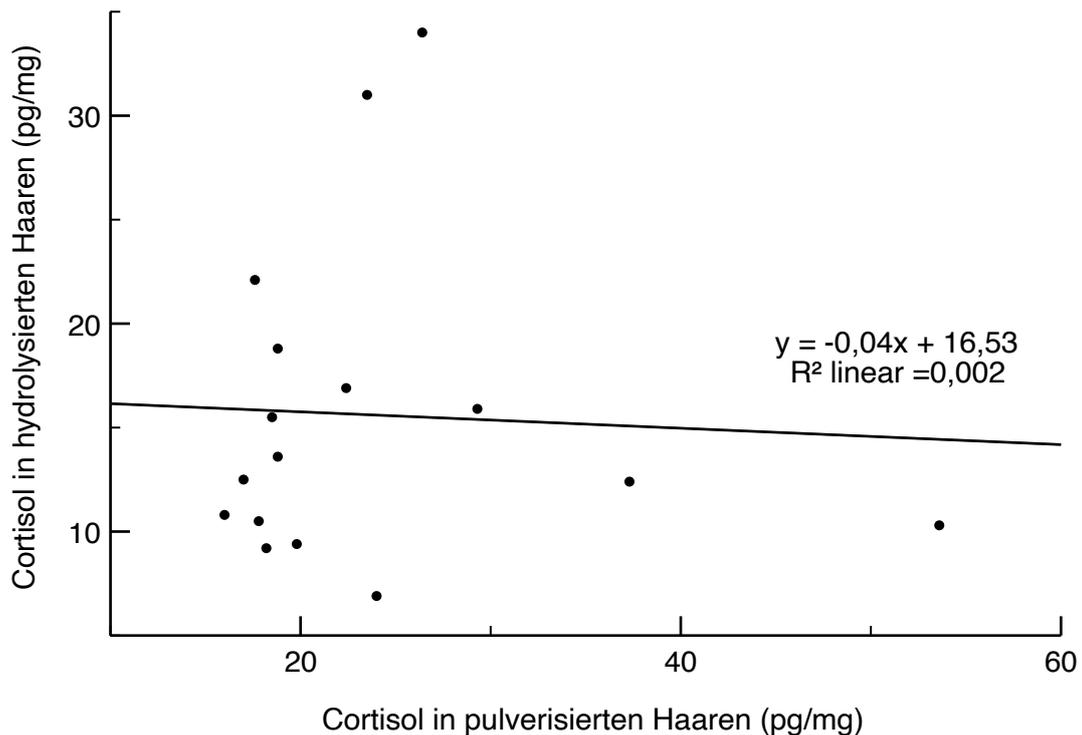
**Abbildung 43:** Ergebnisse der ROC Analysen: Die Achsen geben die Wahrscheinlichkeit wieder, dass Patienten mit aktivem Cushing-Syndrom von Patienten mit kontrollierter Krankheitsaktivität unterschieden werden können.

### 3.5 Vergleich verschiedener Methoden

Zur Validierung der verwendeten Methode einerseits und zur Einordnung in bereits etablierte diagnostische Verfahren andererseits wurde die Messung des Haarcortisolspiegels mit verschiedenen Messmethoden verglichen.

#### 3.5.1 Vergleich der Extraktion durch alkalische Hydrolyse mit Pulverisierung

Verschiedene Methoden zur Vorbereitung der Haare auf die Extraktion wurden verglichen. Zum einen wurden die Haare, wie bereits in der Literatur beschrieben, mit einer Kugelmühle gemahlen, zum anderen wurde eine neue Anwendung durch alkalische Hydrolyse der Haare versucht. Das Cortisol wurde im Anschluss mit ELISA gemessen. Hierbei zeigte sich jedoch keine adäquate Korrelation der beiden Messungen, siehe Abbildung 44. Bei genauerem Betrachten scheint zum einen durch alkalische Hydrolyse weniger Cortisol im Haar nachweisbar zu sein und zum anderen scheint diese Methode weniger empfindlich für höhere Werte zu sein.



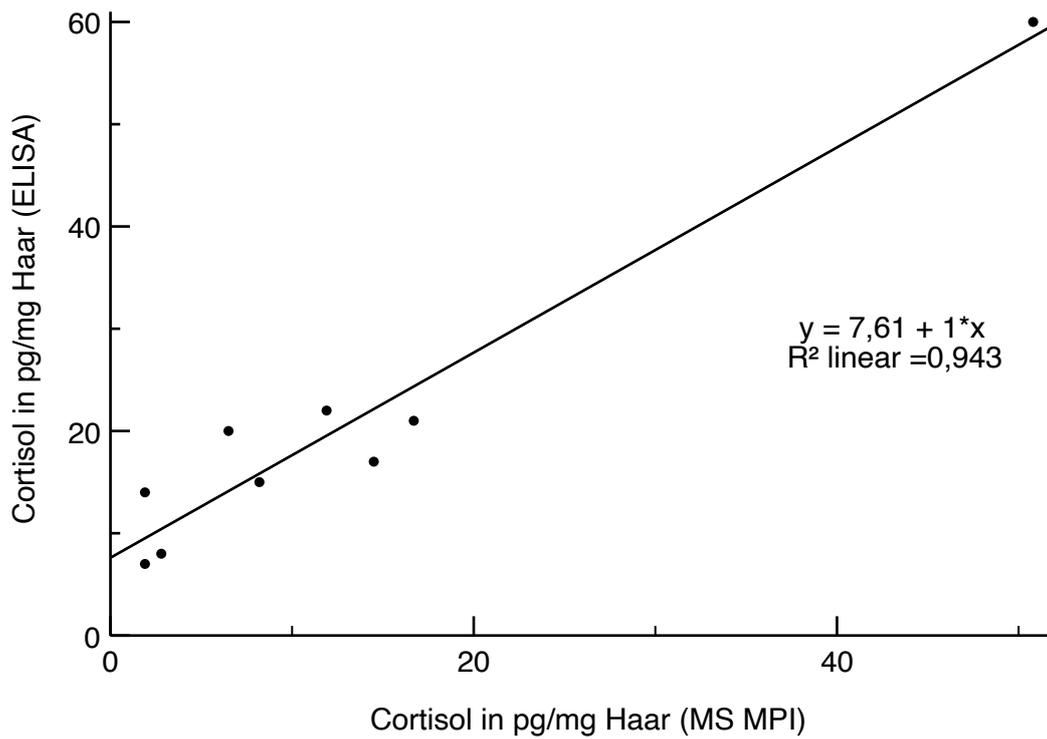
**Abbildung 44:** Korrelation der Cortisolspiegel der pulverisierten und der hydrolysierten Haare.

Ein Vergleich des Cortisolgehalts nach Hydrolyse und Pulverisierung wurde auch mittels Steroidmessung durch Massenspektrometrie versucht, allerdings konnte bei den Proben nach Hydrolyse weder Cortisol noch Cortison massenspektrometrisch bestimmt werden.

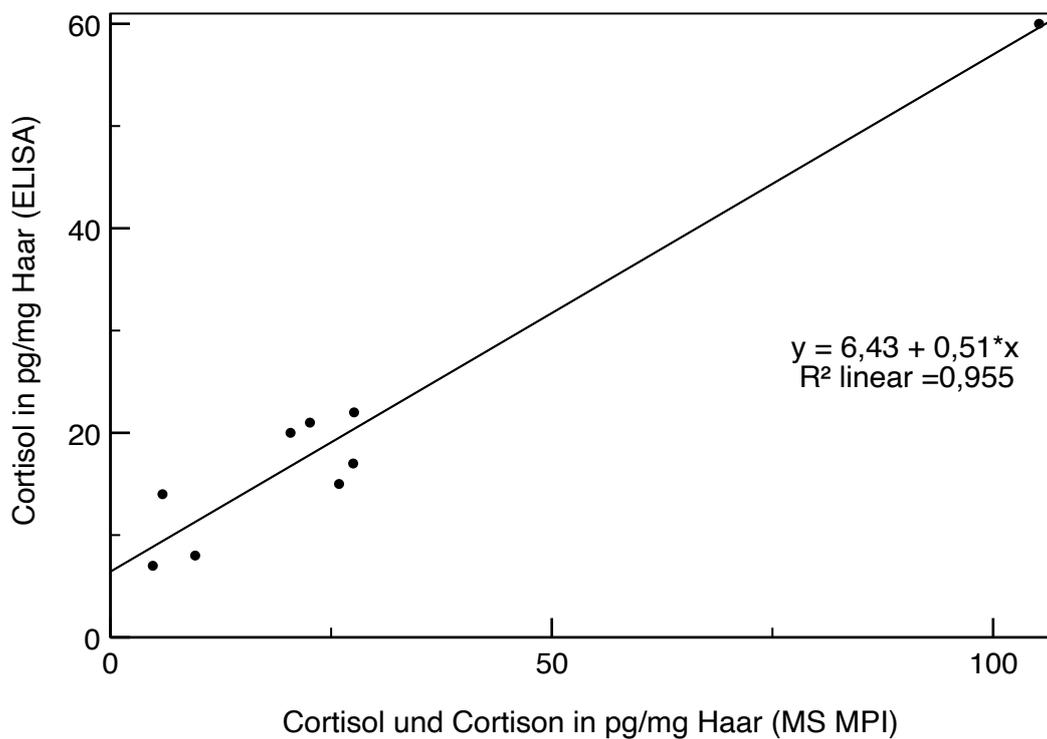
### 3.5.2 Vergleich der Messung mittels Massenspektrometrie zu ELISA

Die durch Massenspektrometrie und ELISA gemessenen Cortisolmengen im Haar wurden mehrfach verglichen. Hierbei wurden massenspektrometrisch nicht nur Cortisol, sondern auch andere Steroidhormone bestimmt. Da bei den anderen Hormonen, wie Aldosteron, Androstendion, Corticosteron, DHEA, Östrogen, Progesteron und Testosteron, allerdings aufgrund der biochemischen Eigenschaften davon ausgegangen werden kann, dass sie die Messungen des ELISA nicht verfälschen, wurde nur für Cortisol und Cortison eine Korrelation überprüft.

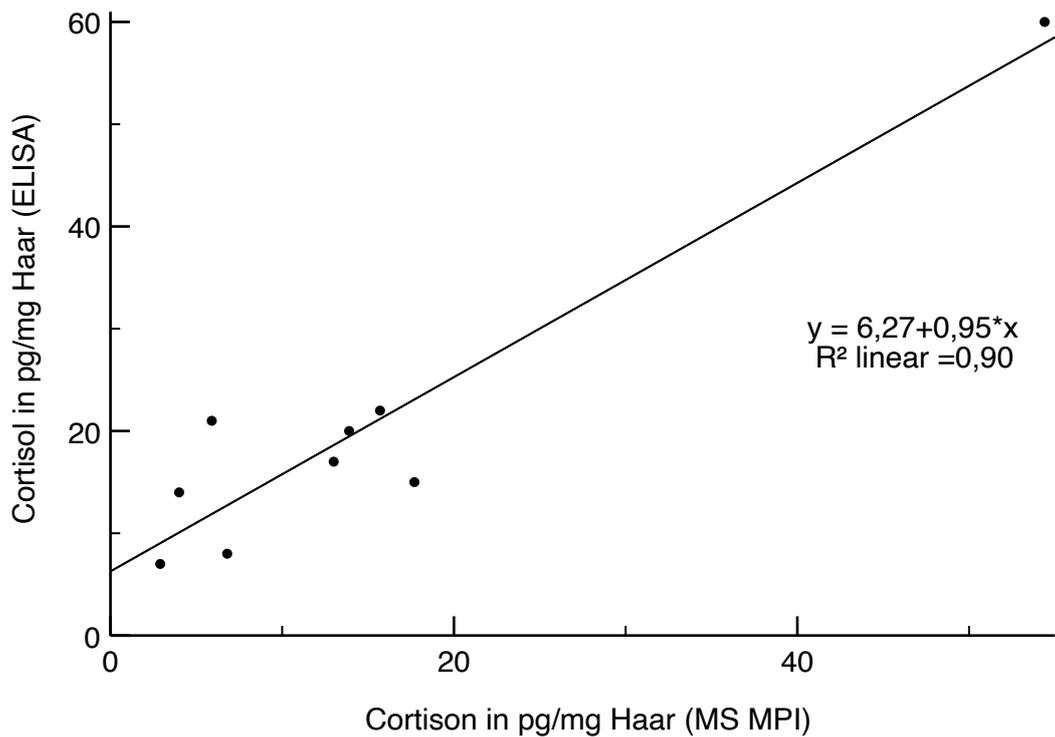
Es zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation der Cortisolwerte bei der Messung mit ELISA und mit Massenspektrometrie des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie (MPI) ( $r_p = 0,971$ ,  $p < 0,001$ ; Abbildung 45). Bei der Überprüfung der Korrelation bei der Messung von Cortisolwerten im ELISA und der Summe aus Cortisol und Cortison bei der Massenspektrometrie ergab sich sogar ein leicht höherer Wert ( $r_p = 0,977$ ,  $p < 0,001$ ; Abbildung 46). Mit den Cortisonmessungen in der Massenspektrometrie korrelierte der Cortisolwert aus dem ELISA ( $r_p = -0,949$ ,  $p < 0,001$ ; Abbildung 47).



**Abbildung 45:** Zusammenhang des gemessenen Cortisols mittels ELISA und mittels Massenspektrometrie (MPI).

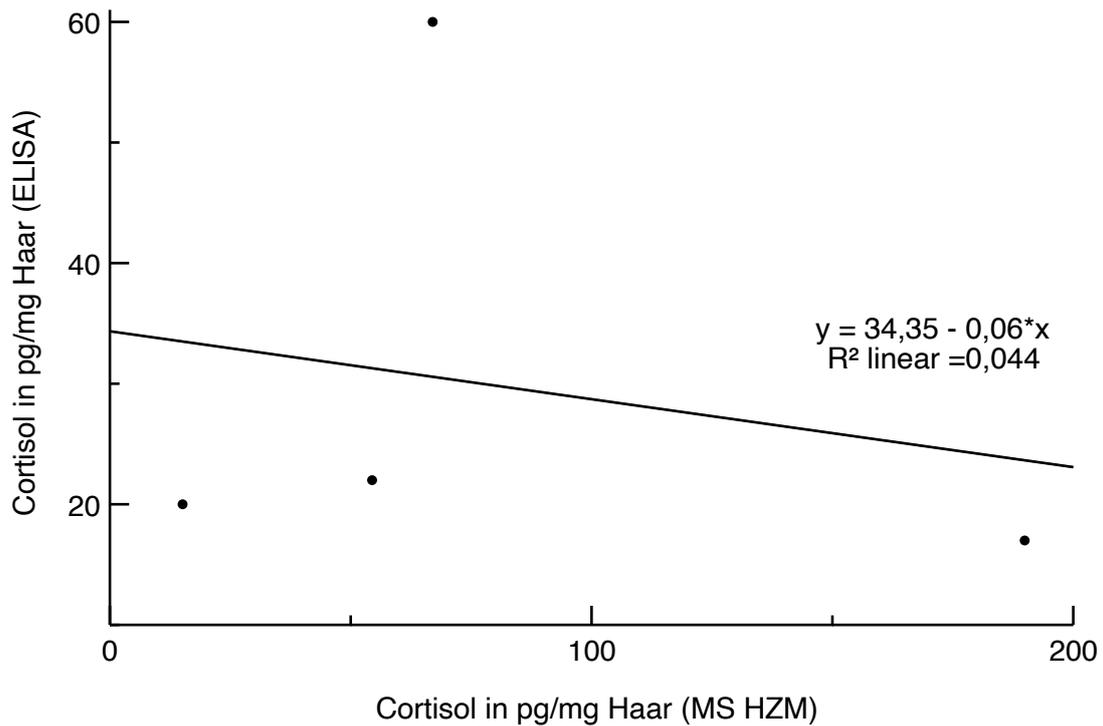


**Abbildung 46:** Zusammenhang des gemessenen Cortisols mittels ELISA und des gemessenen Cortisols und Cortisons mittels Massenspektrometrie (MPI).

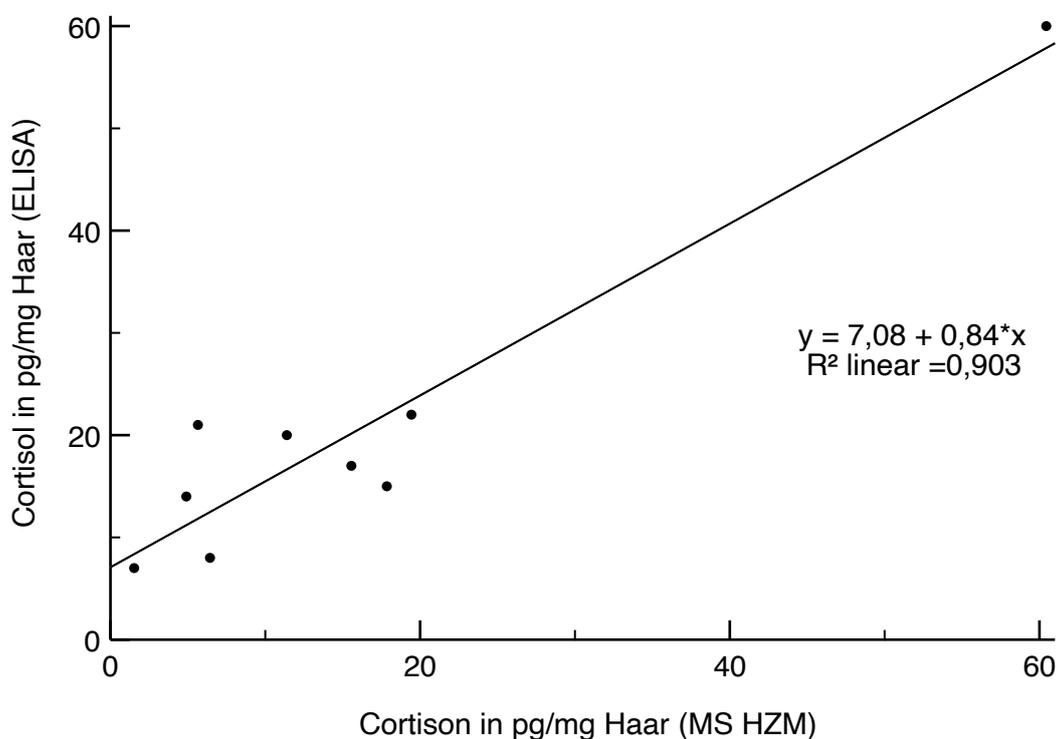


**Abbildung 47:** Zusammenhang des gemessenen Cortisols mittels ELISA und des gemessenen Cortisols mittels Massenspektrometrie (MPI).

Beim Vergleich der Messungen des Haarcortisols mit ELISA mit denen mittels Massenspektrometrie von Cortisol und Cortison am Helmholtz Zentrum München (HZM) konnten nicht bei allen Proben der Cortisol- und Cortisonspiegel bestimmt werden. Es zeigte sich hier eine negative, nicht signifikante Korrelation des gemessenen Cortisols im ELISA zum gemessenen Cortisol mittels Massenspektrometrie von  $r_p = -0,210$  ( $p = 0,790$ ; Abbildung 48), allerdings korrelierte signifikant der Cortisolwert im ELISA zum Cortison mittels Massenspektrometrie ( $r_p = 0,950$ ,  $p < 0,001$ ; Abbildung 49).

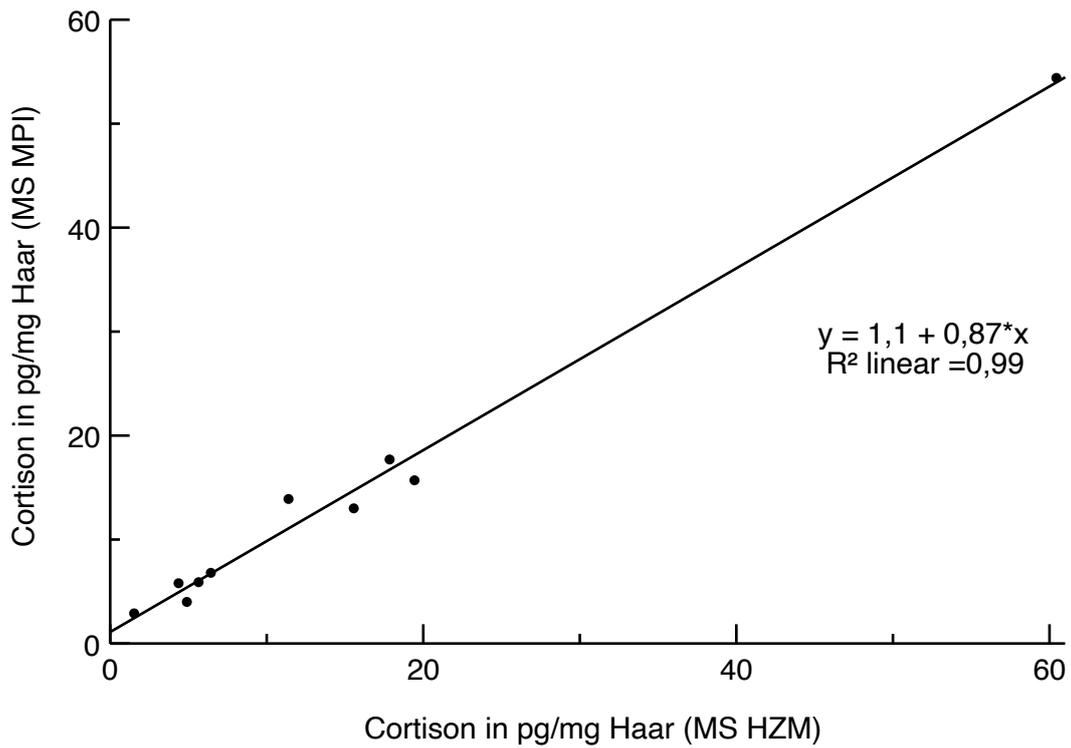


**Abbildung 48:** Zusammenhang des gemessenen Haarcortisols mittels ELISA und mittels Massenspektrometrie (HZM).

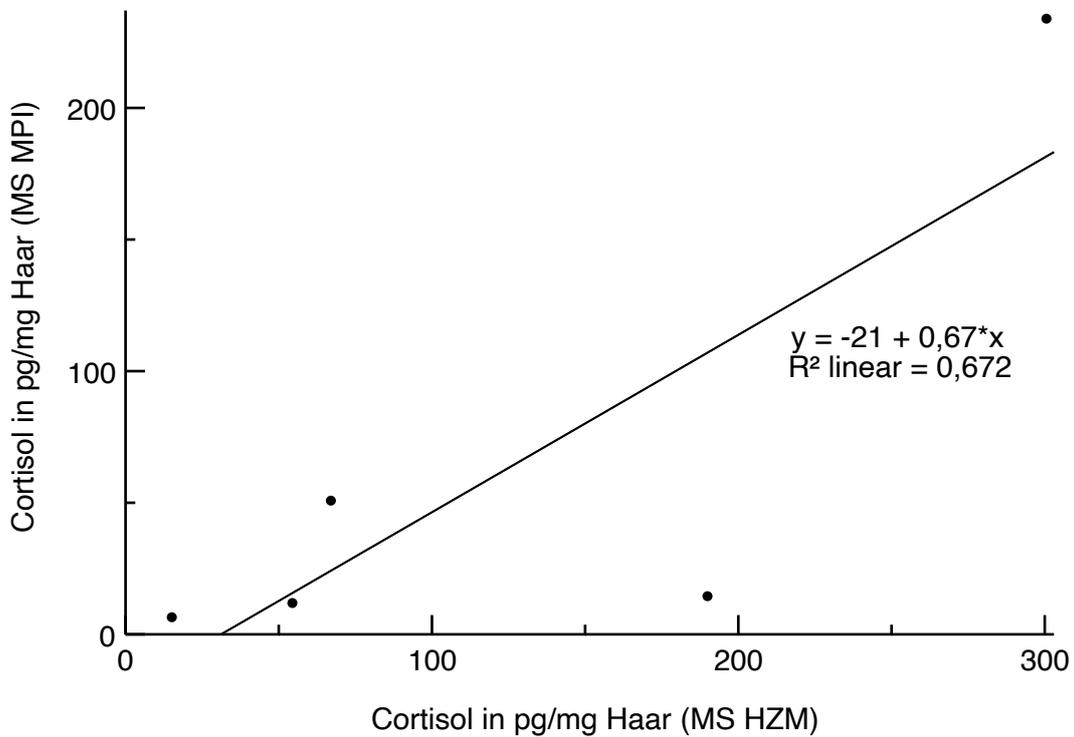


**Abbildung 49:** Zusammenhang des gemessenen Cortisols mittels ELISA und des gemessenen Cortisols mittels Massenspektrometrie (HZM).

Ein Vergleich der Ergebnisse der beiden Massenspektrometer zeigten bei Cortison eine gute Übereinstimmung ( $r_p = 0,995$ ,  $p < 0,001$ ; Abbildung 50), bei Cortisol fiel sie geringer aus ( $r_p = 0,819$ ,  $p = 0,090$ ; Abbildung 51).



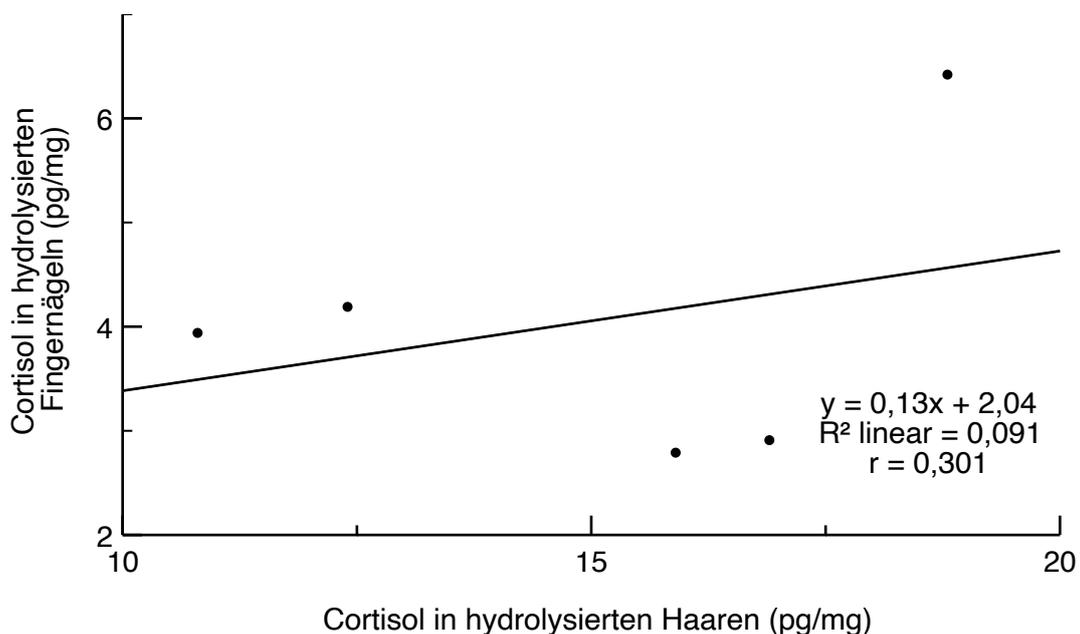
**Abbildung 50:** Zusammenhang des gemessenen Cortisons mittels Massenspektrometrie (HZM und MPI).



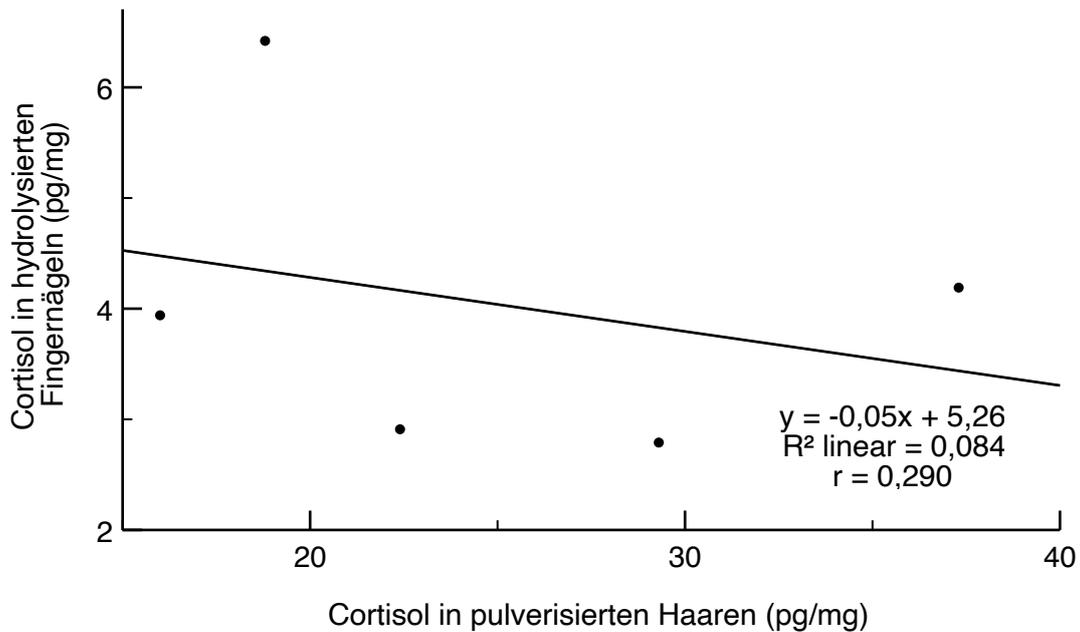
**Abbildung 51:** Zusammenhang des gemessenen Haarcortisols mittels Massenspektrometrie (HZM und MPI).

### 3.5.3 Korrelation des Haarcortisolgehalts mit den Cortisolwerten in Fingernägeln

Für die Korrelation des Cortisolgehalts zwischen Haaren und Fingernägeln wurden zum einen pulverisierte Haarproben und zum anderen hydrolysierte Haarproben verwendet. Die Fingernagelproben wurden ausschließlich hydrolysiert. Der Cortisolgehalt aller Haar- und Fingernagelproben wurden anschließend mit dem ELISA bestimmt. Bei der Messung des Cortisolgehalts in Fingernägeln von zehn Probanden konnte bei fünf von ihnen der Cortisolgehalt quantifiziert werden. Der Cortisolgehalt in den Fingernagelproben der Probanden wurde mit dem Cortisolgehalt ihrer hydrolysierten und pulverisierten Haarproben verglichen, dargestellt in der Abbildung 52 und 53. Die Cortisolkonzentrationen bei den fünf messbaren Fingernagelproben lagen dabei unter den in Haaren gemessenen Werten. Hierbei zeigte sich jedoch kein einheitlicher Zusammenhang bei schwachem bzw. mittlerem Effekt ( $R^2$  linear = 0,091,  $r = 0,301$  für hydrolysierte Haare und  $R^2$  linear = 0,084,  $r = 0,3290$  für pulverisierte Haare). Da die Messungen der Haarsträhnen nicht miteinander korrelieren und da die Fallzahl sehr gering ist, kann keine abschließende Wertung getroffen werden.



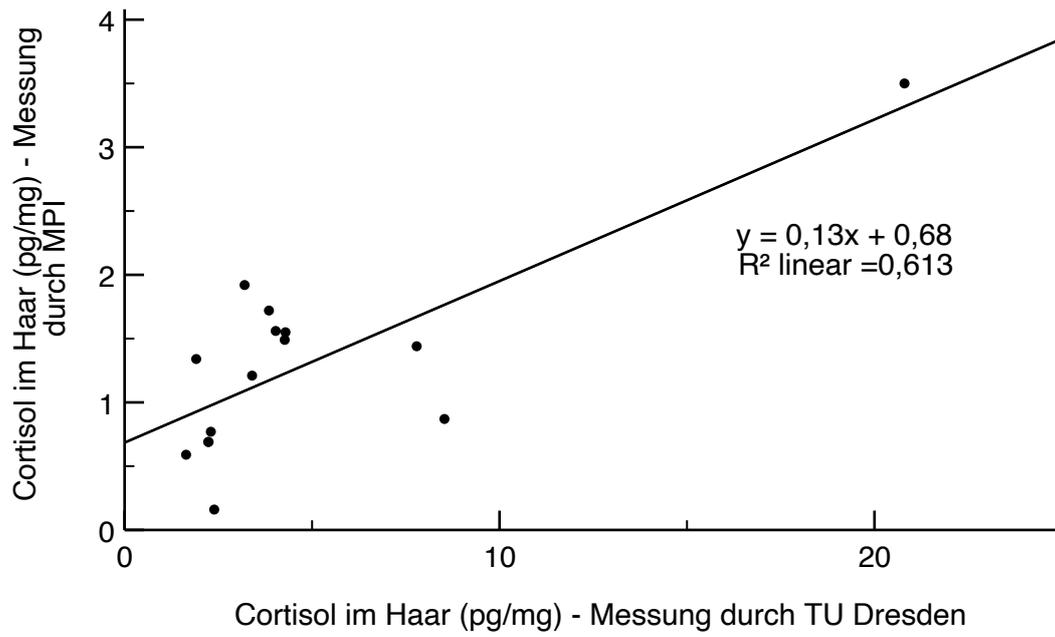
**Abbildung 52:** Korrelation der Cortisolspiegel der hydrolysierten Haare und hydrolysierten Fingernägel.



**Abbildung 53:** Korrelation der Cortisolspiegel der pulverisierten Haare und hydrolysierten Fingernägel.

### 3.5.4 Ringversuch mit der Technischen Universität Dresden

Weiterhin wurde für einen Ringversuch mit der Technischen Universität Dresden Haarcortisol bei 15 Haarsträhnen bestimmt. Dafür wurden die mit Alufolie geschützten Proben nach Dresden postalisch versendet. Dort wurden die ersten drei Zentimeter aller Strähnen gemahlen und nach dem dortigen Protokoll mittels Chemielumineszenz gemessen. Anschließend wurden die verbleibenden gemahlene Haare zurück nach München geschickt und mittels Pulverisierung, Methanolextraktion und ELISA nach vorbeschriebenem Protokoll gemessen. Dabei zeigte sich bei einem Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,6125$  eine lineare Regression mit einer Steigung von 0,1267, vgl. Abbildung 54.



**Abbildung 54:** Ringversuch zwischen Max-Planck-Institut München und TU Dresden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Methodik

Auf der Suche nach einer einfach zu handhabenden Methode, den Cortisolspiegel im Körper einschätzen zu können, erwies sich die Messung des Haarcortisols als ein innovativer Ansatz. In der endokrinologischen Ambulanz des Max-Planck-Instituts konnte ihre prinzipielle methodische Anwendung bei Patienten gezeigt werden. Dazu wurden in der Literatur beschriebene Protokolle der Pulverisierung und Methanolextraktion miteinander verglichen und an die lokalen Gegebenheiten angepasst (Stalder et al., 2012). Die verwendete Methode konnte einfach gehandhabt werden, war nicht invasiv und praktikabel. Weiterhin wurde eine neue Methode zur Cortisolbestimmung im Haar durch alkalische Hydrolyse erprobt. Eine Überprüfung der Korrelation mit anderen bereits validierten Methoden zur Cortisolbestimmung aus z. B. Blut oder Speichel fehlt jedoch (Herane Vives et al., 2015; Short et al., 2016). Bedeutsam ist, dass die Methode durch Messung mittels Massenspektrometrie und durch ein externes Labor validiert wurde.

#### 4.1.1 Cortisolbestimmung im Haar nach Pulverisierung und Methanolextraktion

Die Großzahl der Haarproben der Studie wurden zunächst pulverisiert und mit Methanol extrahiert. Dieses Vorgehen orientiert sich an der Mehrzahl der veröffentlichten Protokolle zur Extraktion des Haarcortisols (Russell et al., 2015). Die veröffentlichten Ergebnisse von Haarcortisolanalysen stammen größtenteils aus fünf Laboren, aus Dresden/Deutschland, Denver/Colorado, Nanjing/China, Rotterdam/Niederlande und Western Ontario/Kanada (Stalder et al., 2017).

Die Haare wurden in einigen Laboren als erstes in Isopropanol gewaschen, um eine Kontamination durch äußerliches Cortisol aus Schweiß zu verringern. Im Protokoll der Gruppe aus Rotterdam wurde auf diesen Schritt verzichtet. Es wurden zwar leicht erhöhte Cortisolwerte dadurch diskutiert, allerdings ist der Mittelwert aus Kanada noch höher (46.1 pg/mg verglichen zu der vorliegenden Studie mit 17,6 mg/pg), obwohl die Haare dort gewaschen werden (Abell et al., 2016; Hodes et al., 2017; Manenschijn et al., 2011; Manenschijn et al., 2012; Manenschijn et al., 2013; Russell et al., 2015).

Anschließend werden die Haare meist gemahlen, wie es auch in dieser Studie durchgeführt wurde. Es ist anzunehmen, dass das Mahlen zu einer Verringerung des Cortisolgehalts führt (Hodes et al., 2017; R. Slominski et al., 2015). Dabei ist dies im vorliegenden Protokoll ein schwer einzuschätzender Parameter, da die Haare erst nach

dem Mahlen abgewogen wurden. Daher könnten Unterschiede der nicht bestimmten ursprünglichen Menge durch proportional unterschiedliche Mahlgrade den messbaren Cortisolspiegel verändern. Andere Labore, wie in Rotterdam und an der Western University in Kanada, schneiden die Haare klein, ohne sie zu mahlen (Russell et al., 2015). Die Vorbereitung der Proben durch Mahlen ist sehr zeitaufwändig, daher wäre für weitere Versuche die alleinige Zerkleinerung in Erwägung zu ziehen.

Ein kritischer Schritt der Extraktion ist die Trennung des cortisolhaltigen Überstandes von den Haaren nach Methanolgabe, da es zu einer Eintrübung durch restliche Haarpartikel kommen könnte. Daher wird im Labor in Dresden 1,5 ml Methanol dazugegeben, um letztendlich 1 ml abzapipettieren. Alle anderen Labore verwenden 1 ml Methanol. Ein wesentlicher Unterschied des in der vorliegenden Studie verwendeten Protokolls zu den anderen ist die fehlende Evaporation, denn im Gegensatz zur Trocknung bei Raumtemperatur werden die Proben in anderen Laboren meist unter Stickstofffluss und erhöhten Temperaturen (38 °C bis 60 °C) getrocknet (Russell et al., 2015). Durch Unterschiede in Luftfeuchtigkeit, Temperatur und Helligkeit veränderte sich die Trocknungszeit und kann vermutlich einen Teil der Inter-Assay-Variabilität der vorliegenden Studie erklären. Insbesondere da die Proben nicht lichtgeschützt getrocknet wurden, kann mit längerer Trocknungsdauer eine verminderte Messbarkeit des Cortisols einhergehen (Meyer & Novak, 2012).

#### 4.1.2 Cortisolbestimmung nach alkalischer Hydrolyse

Zur Bestimmung des Cortisolspiegels im Haar ist die Verwendung einer alkalischen Hydrolyse bisher nicht beschrieben worden. Allerdings konnte der Cortisolwert massenspektrometrisch nicht bestimmt werden, auch wenn DHEA und Testosteron gemessen werden konnten. Bei Messung mit ELISA zeigte sich im Vergleich zur Pulverisierung eine geringe Übereinstimmung und eine geringe Sensitivität bei höheren Konzentrationen. Die Methode ist ungleich aufwändiger als Pulverisierung und durch die Säure- und Basentitrierung anfällig für Störungen, dennoch kann sie eine gute Ergänzung zu anderen Methoden sein. Weitere Versuche zu Validierung und Wiederfindung werden benötigt, um die bisherigen Ergebnisse zu überprüfen.

#### 4.1.3 Cortisolbestimmung mit ELISA

Trotz der Heterogenität der verwendeten antikörperbasierten Messungen ähneln sich die Ergebnisse der unterschiedlichen Labore. So verwendet die Dresdner Gruppe beispielsweise Chemolumineszenz. Nach Vorversuchen wurde der *DetectX<sup>®</sup> Arbor Assay Cortisol Enzyme Immunoassay Kit* ausgewählt, obwohl er für die Analyse von Haaren noch nicht validiert war.

Die Kreuzreaktivität laut *Arbor Assays* ist bei körpereigenen Hormonen recht gering: Cortison mit 1.2 %, bei Progesteron < 0,1 % und bei Östradiol < 0.1 %. Für synthetische Glucocorticoide gibt es relevante Kreuzreaktivitäten: Dexamethason 18.8 % und Prednisolon 7.8 %. Vergleichsweise liegen die Kreuzreaktivitäten anderer Antikörper in einem ähnlichen Bereich mit Cortison von Roche Cobas Assay bei 0,3 % , von Alpco bei 6.2 % , von IBL International, LIA bei 4.49 % , von DRG International bei 3.00 % , von Salimetrics bei 0.130 % (Iglesias et al., 2015; Russell et al., 2015).

#### 4.1.4 Cortisolbestimmung mit Massenspektrometrie

Diese Studie zeichnet sich durch mehrfache Vergleiche von Cortisolbestimmungen im Haar durch ELISA und Massenspektrometrie an verschiedenen Standorten aus. Dabei konnten die Ergebnisse anderer Studien validiert werden, dass massenspektrometrisch ein geringerer Cortisolgehalt gemessen wird als mittels ELISA bei guter Korrelation zueinander (Kirschbaum et al., 2009; Russell et al., 2015; Stalder et al., 2017). Doch zeigten sich die massenspektrometrischen Messungen beider Standorte störanfällig. Es ist anzunehmen, dass Teile der Haarmatrix die Cortisolbestimmung stören. Obwohl Messungen mittels Massenspektrometrie generell genauer sind, zeigte sich der ELISA zuverlässiger, besser reproduzierbar, günstiger, leichter verfügbar und mit einer für klinische Anwendung ausreichenden Spezifität (Gow et al., 2010; Kirschbaum, Tietze, Skoluda, & Dettenborn, 2009; Staufenbiel et al., 2013).

#### 4.1.5 Validierung der Cortisolbestimmung im Haar mittels Pulverisierung und ELISA

Die Wiederfindungsrate anhand von zugesetztem Hydrocortison zu Haaren wies eine hohe Ungenauigkeit auf (3–243 %), die sich bei alleiniger Verwendung von Methanollösung bereits besserte (56–123 %). Eine mögliche Erklärung ist, dass das zugesetzte Hydrocortison zusammen mit den Haaren in anderer Weise mit den Antikörpern des ELISA reagiert als das im Haar enthaltene. Da die Messungen mit endogenem Cortisol ohne Zusatz plausibel und auf andere Art und Weise validiert werden konnten, wurde trotz der fehlerhaften Wiederfindung zugesetzten Cortisols die Methode weitergeführt. Die positiveren Angaben des Herstellers zu Wiederfindung und Variabilität (5,6–14,7 %) unterstützten diese Einschätzung ("DetectX®Cortisol Enzyme Immunoassay Kit," 2016).

Die Versuche zur Validierung der Methode anhand von Wiederholungsmessungen zeigten, dass besonders die Schritte vor dem ELISA eine erhöhte Variabilität aufweisen. Fünf Probenpaare, die an unterschiedlichen Stellen der ELISA-Platte gemessen wurden, aber gemeinsam extrahiert wurden, zeigten einen Variationskoeffizient von 10 %.

Proben derselben Strähne aber zweimal extrahiert zeigen bereits eine Variabilität im Bereich von 7,0–36,2 pg/mg mit einem Variationskoeffizienten von 69 % auf. Bei weiteren Wiederholungsmessungen mit 13 Haarsträhnen an unterschiedlichen Tagen wurden bei denselben Strähnen Korrelationskoeffizienten von  $19,9 \pm 21,0$  % berechnet. Bei 26 Strähnen derselben Probanden, zum selben Zeitpunkt, aber von der anderen Seite des Hinterkopfes entnommen, ergaben sich bereits Korrelationskoeffizienten von  $55,3 \pm 37,4$  %. Dabei gilt, dass der physiologische Cortisolgehalt der Haare auch nahe an der Nachweisgrenze des ELISA von 1,2 pg/mg Haar liegen kann, daher kann es dort vermehrt zu Messungenauigkeiten kommen. Andere Autoren konnten eine Intra- und Inter-Assay-Variabilität von 8.8 % und 3.7 % zeigen (Gao et al., 2013; Kuehl et al., 2015).

Es zeigten sich gute Übereinstimmungen der mit ELISA bestimmten Cortisolwerte zu den Ergebnissen anderer Labore. Der in der vorliegenden Studie gemessene Mittelwert der gesunden Probanden ist  $17,6 \pm 17,5$  pg/mg Haar. Der Cortisolmittelwert gesunder Probanden betrug in der Koren Gruppe aus Kanada 46,1 pg/mg, 29,72 pg/mg in der niederländischen Van Rossum Gruppe, 27 pg/mg in der von Laudenslager in den USA geführten Gruppe und 20 pg/mg in der Kirschbaum Gruppe aus Dresden (Albar, Russell, Koren, Rieder, & van Umm, 2013).

#### 4.1.6 Cortisolbestimmung im Fingernagel

Die Bestimmung des Cortisols in Fingernägeln mittels Hydrolyse ist eine bisher nicht beschriebene Methode, durch die eine mechanische Zerkleinerung der Fingernägel umgangen werden kann. Es konnte in der Hälfte der Proben Cortisol durch ELISA quantifiziert werden. Es ist anzunehmen, dass der Cortisolgehalt bei den nicht bestimmbar Proben zu niedrig war. Daher sollte für zukünftige Analysen mehr Probenmaterial verwendet werden. Eine Möglichkeit besteht darin, die Probanden bereits vor Probenabgabe aufzufordern, einen oder mehrere ihrer Fingernägel ca. zwei Wochen lang wachsen zu lassen. Aufgrund der geringen Fallzahl konnte keine verlässliche Korrelation zu den Cortisolwerten im Haar bestimmt werden. Seit kurzem gibt es Berichte über Messungen von Cortisol oder anderen Steroidhormonen in Fingernägeln. Hierbei wurden verschiedene Protokolle und Messverfahren wie Massenspektrometrie und RIA verwendet. Dabei erwies sich Cortisol als im Nagel nachweisbar. Die genaue Quantifizierung mittels ELISA scheint der Quantifizierung mittels Massenspektrometrie unterlegen zu sein (Higashi et al., 2016; Izawa et al., 2015; Veronesi et al., 2015; Warnock et al., 2010).

#### 4.1.7 Ringversuch mit der Technischen Universität Dresden

Zur externen Validierung wurde der Cortisolgehalt in 15 Haarsträhnen an der Technischen Universität Dresden und im Labor der endokrinologischen Ambulanz des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie bestimmt. Dabei zeigte sich eine Korrelation der Ergebnisse. Die am Max-Planck-Institut für Psychiatrie bestimmten Cortisolkonzentrationen waren geringer als die zuvor bestimmten Werte bei denselben Personen. Es ist zu vermuten, dass dies auf eine mangelnde Robustheit bei der Lagerung der Proben hinweist. Die Proben wurden per Post verschickt. Es ist anzunehmen, dass sie dabei Kälte und UV-Strahlung ausgesetzt waren. Zudem wurden die Proben nach dem Dresdner Protokoll vorbereitet, also mit Isopropanol gewaschen, was den messbaren Cortisolgehalt vermutlich senkt (Hodes et al., 2017).

### 4.2 Diskussion der Ergebnisse

#### 4.2.1 Probanden- und Patientenkollektiv

Die Einteilung der in die Studie eingeschlossenen Patienten der endokrinologischen Ambulanz des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie nach Erkrankungsgruppen erfolgte durch Diagnostik gemäß der Leitlinien der Endokrinologischen Gesellschaft und je nach Ausprägung der Krankheitsaktivität, die eine Annahme über die Höhe des Haarcortisolspiegels zuließ (Nieman et al., 2008). So wurden 38 Patienten mit Nebenniereninsuffizienz und 21 Patienten mit Cushing-Syndrom eingeschlossen. Gerade bei Aufteilung der Patienten mit Cushing-Syndrom in niedrige und hohe Krankheitsaktivität stieß die Studie an statistische Grenzen, da die Aussagekraft und Vergleichbarkeit einer Gruppe mit nur fünf Patienten eingeschränkt sind. Mit einem ähnlichen Erhebungszeitraum und mit einer ähnlichen Anzahl an Patienten gibt es noch weitere Studien, die kürzlich veröffentlicht wurden. In einer endokrinologischen Ambulanz in Rotterdam wurden Daten von 43 Patienten mit Cushing-Syndrom erhoben, von 35 Patienten, bei denen ein Cushing-Syndrom ausgeschlossen werden konnte und von zusätzlich 174 gesunden Kontrollen. In dieser Studie zeigte sich die Messung des Haarcortisols bei einem *Cut-off* von 31,1 pg/mg mit einer Sensitivität von 93% und einer Spezifität von 90% geeignet, zwischen Patienten mit Cushing-Syndrom und gesunden Probanden zu unterscheiden (Wester et al., 2017). In den USA wurden 30 Kinder mit Cushing-Syndrom mit sechs Kindern verglichen, bei denen ein Cushing-Syndrom ausgeschlossen werden konnte. Hierbei zeigte sich bei den Patienten mit Cushing-Syndrom ein höherer Cortisolgehalt als bei den gesunden Kontrollen. Bei statistisch nicht signifikanten Ergebnissen schlossen die Autoren jedoch, weitere Studien zur Diagnostik bei Cushing-Syndrom seien notwendig (Hodes et al., 2017). In Nordamerika wurden 93

Patienten mit Nebenniereninsuffizienz und 62 gesunde Kontrollen untersucht. Dabei wiesen nur Männer signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit Nebenniereninsuffizienz und gesunden Kontrollen auf, bei Frauen waren die Unterschiede nicht statistisch signifikant. Zudem korrelierte der Haarcortisolgehalt bei Patienten mit Hydrocortisonsubstitution mit der Substitutionsdosis des Hydrocortisons (Gow, Koren, Rieder, & Van Uum, 2011). Wiederum in Rotterdam wurden 54 Kinder unter Hydrocortisonsubstitution mit ebenso vielen gesunden Kontrollen verglichen. Dabei wiesen die Patienten mit Hydrocortisonsubstitution höhere Haarcortisolwerte auf als die gesunden Kontrollen (13,3 zu 8,2 pg/mg,  $p=0,02$ ). Die Haarcortisolwerte konnten 13% der Unterschiede des BMI und 29% der Unterschiede des Taillenumfangs zwischen Patienten und gesunden Kontrollen erklären (Noppe, van Rossum, Vliegenthart, Koper, & van den Akker, 2014). In der Literatur wurde bis jetzt jedoch kein Vergleich zwischen unterschiedlichen Freisetzungformen des Hydrocortisons, wie schnell wirksames Hydrocortison und Plenadren® beschrieben. Ein neuer Studienansatz ist auch die Einteilung der Krankheitsaktivität bei Cushing-Syndrom in aktiv und kontrolliert.

Im vorliegenden Kollektiv konnte kein Unterschied zwischen der Verteilung des Haarcortisolspiegels zwischen Probanden und Patienten gezeigt werden. Auch wenn eine höhere Patientenzahl bessere Aussagen zuließe, zeigt doch der Vergleich mit den anderen Studien, dass die geringe Inzidenz der Erkrankungen des Cortisolstoffwechsels dies erschwert. Umso dringlicher ist jedoch die Fortführung der Entnahme der Haarproben bei Patienten, die sich mit Verdacht auf Störung des Cortisolstoffwechsels vorstellen oder endokrinologisch behandelt werden, um genauere Aussagen über die Eignung dieses Verfahrens für Diagnostik und Therapiemonitoring treffen zu können.

Zu den Schwächen der Studie gehört die Größe und Homogenität des Referenzkollektivs. Die Probanden sind durchschnittlich jünger und weisen anteilig mehr Frauen als im Bundesdurchschnitt auf. Dabei ist zu berücksichtigen, dass bei älteren Männern häufig weniger Kopfhaar zur Probe genommen werden kann, die Verteilung also die durchschnittliche Haarverteilung widerspiegelt. Mit fortgeschrittenem Lebensalter steigt das allgemeine Erkrankungsrisiko, daher sind gesunde Menschen statistisch jünger. Bei zukünftigen Studien ist darauf zu achten, vermehrt ältere Menschen einzubeziehen. So wurden beispielsweise Mitglieder des Haushalts von Erkrankten gebeten, an Studien teilzunehmen (Gow et al., 2011). Zur Identifizierung von möglichen Einflussfaktoren des Haarcortisols wurden in der Literatur bereits sehr große Kohortenstudien durchgeführt, beispielsweise mit über 3000 Probanden in der Whitehall II Studie (Abell et al., 2016). Um mit einer statistischen *Power* von 0,8 auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  einen Unterschied des Haarcortisolspiegels zwischen

Männern und Frauen unter Annahme der in der vorliegenden Studie gemessenen Unterschiede von 22,9 bzw. 20,3 pg/mg Haar zu erhalten, müssten 2228 Personen untersucht werden.

Wenn die Gruppen auch eine heterogene Verteilung einiger Parameter aufwiesen, ist dies bei genauerer Betrachtung häufig Konsequenz einer Erkrankung. So zeigen die Patienten vermehrt pathologische Eigenschaften des metabolischen Syndroms, ist doch dies gerade Kennzeichen des Cushing-Syndroms und weist auf die Schwierigkeiten einer adäquaten Hydrocortisonsubstitution hin. Die Unterschiede in den psychologischen Parametern betonen die Dringlichkeit einer adäquaten Diagnostik und Therapie. Da die Ergebnisse der verschiedenen Fragebögen zu psychologischen Parametern miteinander korrelieren, könnte bei zukünftigen Analysen für eine erleichterte *Compliance* einer der verwendeten Fragebogen ausgewählt werden.

Durch fehlende Werte und Parameter, die teils im Rahmen der klinischen Routine und nur teils explizit für diese Studie erhoben wurden, wie die Blutwerte und genauere Charakterisierung der Lebensgewohnheiten der Patienten, wurde die Aussagekraft der vorliegenden Studie gemindert.

#### 4.2.2 Einflüsse auf den Haarcortisolspiegel

Anhand der Haarproben und der dazu erhobenen Daten konnten Einflüsse verschiedener Parameter auf den Haarcortisolspiegel festgestellt werden. Allerdings war nur durch Haarfärben das Haarcortisol so stark vermindert, dass dieser Effekt bei Betrachtung aller Haarproben alleine statistisch signifikant war ( $z = -2,585$ ,  $p = 0,010$ ). Sogar bei einer Erkrankung des Cortisolstoffwechsels konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten gefunden werden, auch wenn diejenigen mit Hydrocortisonsubstitution tendenziell einen höheren Mittelwert aufweisen wie die anderen Gruppen ( $H_3 = 1,956$ ,  $p = 0,582$ ).

Eine mehrfaktorielle Varianzanalyse mit BMI als Kovariate konnte jedoch Haupteffekte durch Erkrankung, Geschlecht, natürliche Haarfarbe und Färbung nachweisen ( $F_{19,132} = 3,624$ ,  $p < 0,001$ , partielles  $\eta^2 = 0,343$ ,  $n = 152$ , korrigiertes  $R^2 = 0,248$ ). Dieses Modell kann 25 % der Streuung der Mittelwerte erklären. Bei genauer Betrachtung zeigten sich nur die Haarcortisolwerte der gesunden Probanden und der Patienten mit **Hydrocortisonsubstitution** als statistisch signifikant unterschiedlich.

Diese Unterschiede der Haarcortisolwerte verweisen zum einen auf unterschiedliche systemische Cortisolwerte (Aanderud & Myking, 1981; Nickelsen, Schulz, & Demisch, 1983; Scott, Donald, & Espiner, 1978). Zum anderen ist anzunehmen, dass es durch die

Erkrankungen zu einer veränderten lokalen Ausschüttung kommt. So konnte gezeigt werden, dass die Neusynthese von Cortisol in der Haut stattfinden kann (Ito et al., 2005; A. T. Slominski, Manna, & Tuckey, 2014; Tiganescu, Walker, Hardy, Mayes, & Stewart, 2011). Eine Umwandlung von Cortisol zu Cortison und umgekehrt findet in der Haut und an Haarwurzeln statt und ist abhängig von *Feedback*-Mechanismen (Hodes et al., 2017; Smith et al., 1996; Tiganescu et al., 2011). Ob die erhöhten Werte des Haarcortisols eher einen systemischen oder eher einen lokalen Ursprung haben, konnte durch die vorliegende Studie nicht geklärt werden. Dennoch scheinen verschiedene Organe unterschiedlich sensitiv auf Cortisol zu reagieren, denn auch wenn die Patienten nach klinischen Kriterien adäquat substituiert waren, unterschieden sich doch die gemessenen Haarcortisolwerte von denen Gesunder. Außerdem korrelierten die Substitutionsdosen mit dem Haarcortisol nach Rängen ( $r_s = 0,342$ ,  $p = 0,036$ ). Möglicherweise wird überproportional viel Cortisol bei erhöhten Serumkonzentrationen im Haar abgelagert. Diesen Verdacht bestärkt, dass die Patientin mit einer Haarcortisolkonzentration von annähernd 300 pg/mg zuvor eine Addisonkrise hatte, die mit Gabe von mehr als 100 mg Hydrocortison in einem kurzen Zeitraum behandelt wurde. Dies weist auf eine Limitation der vorliegenden Daten hin, da die Substitutionsdosen nur die tägliche Dosierung wiedergeben, aber nicht die zusätzliche Cortisoneinnahme in Belastungssituationen berücksichtigt. Andere Autoren fanden grundsätzlich eine Assoziation des Haarcortisolspiegels mit der Gesamtdosis substituierten Cortisols, nicht jedoch mit der einzelnen Maximaldosis, allerdings schlossen sie Patienten mit Addisonkrise von ihrer Studie aus, da eine veränderte Einlagerung durch erhöhte Dosen vermutet wurde (Staufenbiel, Andela, et al., 2015). Bei der Überprüfung der Normalverteilung der Haarcortisolwerte zeigte sich, dass allein die Gruppe der Patienten mit Hydrocortisonsubstitution nicht normalverteilte Haarcortisolwerte aufwies. Dies kann ein Hinweis auf eine unphysiologische Substitution sein. Einen Unterschied zwischen einer Substitution mit Plenadren® oder Hydrocortison zeigte sich jedoch nicht.

Weitestgehend konsistent mit den Ergebnissen anderer Studien zeigte sich der Einfluss des **Geschlechts**, der mit einer verminderten Cortisolkonzentration bei Frauen einhergeht (Abell et al., 2016; Dettenborn et al., 2012; Feller et al., 2014; Manenschijn et al., 2013; Stalder et al., 2017; Staufenbiel, Penninx, et al., 2015). In diesem Zusammenhang konnte allerdings kein Einfluss einer hormonellen Verhütung auf den Haarcortisolspiegel nachgewiesen werden. Dies ist umso erstaunlicher, da der Cortisolspiegel im Serum bei hormoneller Verhütung erhöht ist. Dies konnte jedoch nur in wenigen Studien auch für den Haarcortisolspiegel gezeigt werden (Dettenborn et al., 2010; Kuehl et al., 2015; Staufenbiel, Penninx, et al., 2015; Wester et al., 2017).

In den vorliegenden Daten konnte kein Zusammenhang zwischen dem Haarcortisolspiegel und dem **Alter** hergestellt werden. Es ist zu vermuten, dass die fehlende Anzahl älterer gesunder Probanden ursächlich ist. Besonders bei Studien mit einer großen Altersspannweite zeigte sich eine Erhöhung des Haarcortisolspiegels mit zunehmendem Alter (Dettenborn et al., 2012; Feller et al., 2014; Staufenbiel, Penninx, et al., 2015).

Auch für **Rauchen** und **Alkoholkonsum** konnte entgegen der Erwartungen und den Ergebnissen anderer Studien kein Effekt auf den Haarcortisolspiegel nachgewiesen werden (Braig et al., 2015; Manenschijn et al., 2013; Stalder et al., 2010). Allerdings war die Anzahl der Raucher und derjenigen mit erhöhtem Alkoholkonsum sehr gering.

Das Vorkommen von pathologischen Parametern des **metabolischen Syndroms** bei Patienten mit Erkrankungen des Cortisolspiegels war erhöht im Vergleich zu gesunden Probanden. Allerdings unterschieden sich weder die mittleren Haarcortisolspiegel der erkrankten Patienten statistisch signifikant von denen der gesunden Probanden oder untereinander, noch konnte anhand des Haarcortisolspiegels eine Aussage über den Einfluss des metabolischen Syndroms auf die Ausprägung einer Erkrankung des Haarcortisolspiegels getroffen werden. Der diastolische Blutdruck korrelierte negativ mit dem Haarcortisolspiegel. Der erklärte Einfluss betrug 2,2 % ( $F_{1,175} = 5,006$ ,  $p = 0,027$ ) bei allen Proben, allerdings bereits 21 % bei alleiniger Betrachtung der Patienten mit Hydrocortisonsubstitution ( $F_{1,37} = 10,701$ ,  $p = 0,002$ ). Dies entspricht nicht den theoretischen Überlegungen, da ein hoher Cortisolspiegel klinisch eher eine Erhöhung des Blutdrucks vermuten lässt. Andere Autoren beschreiben zwar eine negative Korrelation des diastolischen Blutdrucks mit den Ergebnissen des morgendlichen Serumcortisolspiegels, aber gleichsinnige Veränderungen der Parameter des metabolischen Syndroms mit dem Haarcortisolspiegel (Feller et al., 2014; Kuehl et al., 2015; Staufenbiel et al., 2013). Durch das erhöhte kardiovaskuläre Risiko bei höheren Cortisolspiegeln wird dieser Zusammenhang noch bedeutsamer (Manenschijn et al., 2013; Stalder et al., 2013; Veldhorst et al., 2014; Wester et al., 2014).

Ein Vergleich der Mittelwerte des diastolischen Blutdrucks nach Erkrankung zeigte, dass sie wie erwartet bei den Patienten höher sind als bei den Gesunden. So lag der mittlere Blutdruck der gesunden Probanden unter dem der Patienten mit Hydrocortisonsubstitution, dieser wiederum unter dem der Patienten mit kontrolliertem Cushing-Syndrom und dieser wiederum unter dem der Patienten mit aktivem Cushing-Syndrom. Dennoch scheint der Effekt des Blutdrucks auf den Cortisolspiegel im Haar nicht so direkt zu sein. Eine Erklärung mag in diesem Fall eine Verzerrung innerhalb der

Gruppe der Patienten mit Hydrocortisonsubstitution sein. Anscheinend haben besonders in dieser Gruppe diejenigen mit einer vermehrten Ablagerung des Cortisols im Haar einen niedrigen Blutdruck. Gerade bei hypotonen Patienten wird mehr Hydrocortison substituiert. Dies verstärkt also den Verdacht, dass das Cortisol im Haar nicht proportional zu der Serumcortisolkonzentration eingelagert wird, sondern verstärkt bei intermittierend hohen Spitzenspiegeln (Staufenbiel, Andela, et al., 2015).

In Bezug auf die Parameter des metabolischen Syndroms zeigte sich bei den Patienten mit kontrolliertem Cushing-Syndrom, dass der Triglyceridspiegel negativ rangkorreliert mit dem Haarcortisolspiegel. Hier erscheint diese Korrelation entgegen den Erwartungen, denn in anderen Studien korrelieren die Parameter des metabolischen Syndroms mit dem Haarcortisolspiegel (Kuehl et al., 2015; Stalder et al., 2013). Eine anzunehmende Erklärung ist, dass diese Patienten trotz kontrolliertem Cushing-Syndrom eine persistierende Fettstoffwechselstörung haben, obwohl sich der Cortisolspiegel unter Therapie normalisiert hat.

Die Ergebnisse der psychologischen Fragebögen mit einem vermehrten **Angst- und Depressionsempfinden** bei Patienten mit Hydrocortisonsubstitution und aktivem Cushing korrelieren positiv mit dem Haarcortisolspiegel. In der Literatur zeigt sich ein Effekt von Stress und Belastung auf den Haarcortisolspiegel sehr häufig (Grassi-Oliveira et al., 2012; Karlen et al., 2011; Steudte et al., 2011). Auf die vorliegenden Daten bezogen zeigt sich hier jedoch entweder, dass die psychologischen Parameter, wie Angstempfinden, adäquater als andere Parameter erhoben wurden, wie beispielsweise die Einschätzung der eigenen Haarfarbe, oder dass der Cortisolspiegel im Haar auf Stress sehr viel sensibler reagiert als auf andere Parameter, wie erhöhten Blutdruck. Die verwendeten Fragebögen zu Angst und Depression zeigten in sich eine gute Übereinstimmung. Daher kann für weitere Studien eine Auswahl getroffen werden. Belastende Lebenserfahrungen wurden dabei nur bei Gesunden abgefragt, wobei eine Erkrankung des Cortisolstoffwechsels selbst als belastenden Lebenserfahrung zu werten ist. Um diese Stresssituationen adäquat darstellen zu können, wäre wegen der Dynamik des Cortisolspiegels, mit initialem Anstieg und anschließendem Abfall bei chronischem Stress, nicht nur das Vorhandensein einer belastenden Lebenserfahrung in den letzten drei Monaten sondern zusätzlich ihr Beginn wesentlich gewesen (Luo et al., 2012; Miller, Chen, & Zhou, 2007; Stalder et al., 2017). Der Beginn der belastenden Lebenserfahrung wurde in der vorliegenden Arbeit nicht erfragt, könnte aber einen noch eindeutigeren Zusammenhang aufdecken. Denn obwohl akuter Stress zu einem Anstieg des Cortisolspiegels im Körper führt, stellt sich auf Dauer eine Erniedrigung ein (Pang et al., 2014). Auch andere Autoren verwendeten diese Fragebögen, um psychologische

Parameter zu bestimmen (Iglesias et al., 2015). Selbst aufwändigere Methoden, Stress zu evaluieren, wie spontane Einschätzung auf situativen Stress in SMS-Nachrichten zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Tages, konnten keine bessere Korrelation zum Haarcortisolspiegel erreichen (Gidlow, Randall, Gillman, Silk, & Jones, 2016).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch **Haarfärbung** weniger Cortisol nachweisbar ist. Einen Effekt der Haarfärbung zeigten bereits einige andere Studien (Hamel et al., 2011; Hodes et al., 2017; Hoffman et al., 2014). Kleinere Studien konnten diesen Effekt nicht nachweisen (Kristensen, Larsen, Olsen, Fahrenkrug, & Heitmann, 2017). Dabei scheint die genaue Art der Haarbehandlung von Bedeutung zu sein (Kirschbaum et al., 2009). Die vorliegende Studie konnte keinen Einfluss von Haartönung auf den Haarcortisolspiegel zeigen. Aussagen zu Haarbehandlungen wie Dauerwelle sind allerdings aufgrund der geringen Fallzahl ( $n = 4$ ) nicht sicher zu treffen.

In vielen Studien, nicht nur zur Nachweisbarkeit von Cortisol, sondern generell bei Haaranalysen, scheinen **dunklere Haare** eine höhere Nachweisbarkeit der Substanzen zu haben als hellere (Dettenborn et al., 2012; Staufenbiel, Penninx, et al., 2015). So soll Kokain an Melanin binden und daher bei Konsum leichter in dunkleren Haaren nachweisbar sein (Cone, 1996). Auch in der vorliegenden Studie zeigte sich diese Tendenz, allerdings nicht bei den Patienten mit Hydrocortisonsubstitution, die einen gegenteiligen Effekt aufweisen. Dabei könnte allerdings ein anderer Effekt, wie beispielsweise der einer Substitution, wesentlich stärker gewesen sein und so den Einfluss der Haarfarbe überdeckt haben. Eine mögliche Schwäche der Studie besteht in der Ungenauigkeit der Angaben zur Haarfarbe, die von den Probanden selbst eingeschätzt wurde. Zur verbesserten Standardisierung kann eine Vergleichssträhne eingeführt werden.

Grundsätzlich ist eine Schwäche der Cortisolmessung mittels Haaranalyse an sich anzumerken, denn die Mechanismen der Inkorporation des Cortisols in das Haar sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Falls das Cortisol an Proteine der Haarmatrix bindet, ist anzunehmen, dass ein Vergleichssubstrat einen besseren Hinweis auf den Cortisolspiegel im Körper gibt (Cassani & Spiebler, 1993), denn die Haardichte kann sehr unterschiedlich sein (Loussouarn et al., 2005). Ähnlich wie bei Urinalysen häufig als Referenz die Kreatininmenge angegeben wird, könnte es bei den Haaren das Melanin sein. Damit könnte eine Kontamination durch Haarprodukte leichter aufgedeckt werden. Allerdings ist zu vermuten, dass die Bildung dieser Proteine abhängig von Erkrankungen ist. So zeigten in einer Studie beispielsweise die Zinkkonzentrationen im

Haar, ebenso wie die Cortisolkonzentrationen, erhöhte Stresslevel an (Vaghri et al., 2013).

In experimentellem Studiendesign konnte gezeigt werden, dass häufige **Haarwäschen** insbesondere mit Seife zu niedrigeren Cortisolkonzentrationen im Haar führen (Hoffman et al., 2014). Weitere Studien konnten keinen Einfluss feststellen (Manenschijn et al., 2011; Stalder & Kirschbaum, 2012) oder einen erniedrigten Haarcortisolspiegel bei häufigerem Haarwaschen entdecken (Hamel et al., 2011; Stalder et al., 2017; Staufenbiel, Andela, et al., 2015). In der vorliegenden Studie trat ein gegenteiliger Effekt auf. Anteilig wuschen sich gesunde Menschen öfter die Haare. Ein anzunehmender Grund für häufigeres Haarwaschen kann häufiger intensiver Sport sein. Aufgrund der Intensität der körperlichen Aktivität kann ein erhöhter Cortisolspiegel im Haar angenommen werden. In experimentellen Studien wurde gezeigt, dass Schwitzen keinen eindeutigen Einfluss auf den Haarcortisolspiegel hat (Grass et al., 2015). Bei diesen Untersuchungen wurde das Haar mit Isopropanol gewaschen. Die Ergebnisse können also nur bedingt auf die vorliegende Studie übertragen werden. Als eine andere Erklärungsmöglichkeit für häufiges Haarewaschen kann ein Hypercortisolismus mit Hyperhidrose angesehen werden. Die Betroffenen könnten dadurch einen zwar zur Ausgangskonzentration vor dem Waschen verminderten, aber dennoch insgesamt erhöhten Haarcortisolspiegel aufweisen. Es kann außerdem davon ausgegangen werden, dass unterschiedliche Pflegeprodukte den Effekt des Waschens verändern.

Nach dem Haarewaschen oder unabhängig davon aufgetragene Haarprodukte wie Gel oder Haarschaum lassen durch alkoholische Lösungsmittel eine veränderte Nachweisbarkeit des Cortisols im Haar vermuten. Einflussfaktoren wie Einwirkzeit und Menge der Haarprodukte sind retrospektiv meist ungenau erhebbbar. Ein Waschschrift zur Vorbereitung der Proben kann diesen Effekten nicht vollständig entgegenwirken. Denkbar ist zudem, dass eine Verunreinigung der Proben durch die Haarprodukte stattfand. Dieselbe Menge einer zuvor gegelten Strähne enthielte dann zum Beispiel etwas mehr Haargel und weniger Haar als die einer unbehandelten Vergleichssträhne. Die bei der Verarbeitung der Haarproben festgestellten Unterschiede wie teilweises Verkleben könnten ein Hinweis darauf sein. Die Verwendung von **Haarpflege- und Stylingprodukten** wurde nicht konsequent und detailliert von den Probanden und Patienten angegeben, sodass dies nicht nachverfolgt werden kann. In der Literatur wurden enzymatische Einflussfaktoren auf den Cortisolspiegel im Blut durch Konsum von Süßholz oder grünem Tee diskutiert. Dies kann bei der Haarcortisolmessung zusätzlich durch externe Kontamination z. B. durch Shampoo mit Extrakten aus den betreffenden Stoffen den messbaren Cortisolspiegel verändern (Hintzpeter, Stapelfeld,

Loerz, Martin, & Maser, 2014; Kratschmar et al., 2011). Da die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer solchen Interaktion nicht sehr groß ist, müsste dies am ehesten experimentell nachgeprüft werden. Falls sich ein deutlicher Einfluss ergibt, sollten zumindest Patienten, deren Hydrocortisonsubstitutionstherapie mit der Messung des Haarcortisolspiegels überwacht werden soll, Haarprodukte mit diesen Enzymen meiden.

Die vorliegende Studie konnte wichtige Einflussfaktoren auf den Haarcortisolspiegel identifizieren, wie BMI, Geschlecht, natürliche Haarfarbe und Färbung. In Zusammenschau mit den Ergebnissen anderer Studien konnte der Fragebogen für Folgestudien weiterentwickelt werden. Der Wichtigkeit der Etablierung lokaler Referenzbereiche und der Notwendigkeit der statistischen Einordnung der vielen Einflussfaktoren wurde mit der vorliegenden Arbeit entsprochen. Mit den in der Studie gesammelten Daten und Haarproben können weitere Haaranalysen vorgenommen werden.

#### 4.2.3 Stärken und Schwächen der Anwendbarkeit zur Diagnostik bei Verdacht auf Cushing-Syndrom

Die aktuelle Diagnostik bei Verdacht auf Störungen des Cortisolstoffwechsels besteht aus verschiedenen sich ergänzenden und in der Handhabung häufig komplexen Tests. In diesem Kontext stellt die Verwendung des Haarcortisolspiegels bei einem geeigneten Grenzwert eine einfache Alternative dar. Die Präanalytik mit der Entnahme mittels Abschneidens und die lichtgeschützte Aufbewahrung der Haare bei Raumtemperatur bedeutet eine Vereinfachung im Vergleich zu den ACTH-Messungen, bei der die Blutprobe durchgehend gekühlt und unmittelbar analysiert werden muss. Daher eignen sich Haarcortisolanalysen nicht nur zur Beobachtung von Patientenkollektiven in der Psychiatrie und in der Endokrinologie, um ein besseres Verständnis des Verlaufs und der Dynamik des Cortisolspiegels zu erreichen, sondern im Zusammenhang einiger endokrinologischer Erkrankungen auch zur Diagnosestellung (Stieg, Renner, Stalla, & Kopczak, 2017; Wester et al., 2017). In einer anderen Studie konnte nachgewiesen werden, dass Erkrankungen einen stärkeren Einfluss haben können als beispielsweise Haarfärben (Wester et al., 2017). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein alleine statistisch signifikanter Unterschied der Mittelwerte des Haarcortisols zwischen Gesunden und Patienten mit Cushing-Syndrom gefunden werden. Daher ist der *Cut-off* bei 9,5 pg/mg zwar mit einer ausgezeichneten Sensitivität von 100 % bei mangelhafter Spezifität von 35 % nicht klinisch anwendbar. Die Schwäche der Studie liegt somit in der Gruppengröße der Patienten mit aktivem Cushing-Syndrom und in dem großen Überschneidungsbereich des Haarcortisols zwischen Gesunden und Patienten mit Cushing-Syndrom. Diese Einschränkungen betreffen auch andere Funktionstests, wie

bei dem Mitternachtscortisol beim schlafenden Patienten, der bei einem *Cut-off* von 1,8 µg/dl und einer Sensitivität von 100 % in einer Studie nur eine Spezifität von 20 % aufwies (Nieman et al., 2008; Pecori Giraldi et al., 2007). Andere Tests zeigen aber durchaus Sensitivitäten und Spezifitäten von über 90 % (Nieman et al., 2008). Da diese Testcharakteristika maßgeblich von der Pretest-Wahrscheinlichkeit abhängen und je nach klinischem Bild, Komorbiditäten und Medikation individualisiert werden sollten, kann die Messung des Haarcortisols zur ergänzenden Diagnostik herangezogen werden (Baid et al., 2009). Ein großer Vorteil der hier vorgestellten Analysemethode besteht in der Möglichkeit, einen längeren Zeitraum mit nur einer Probenentnahme darstellen zu können. Bei Verdacht auf Cushing-Syndrom kann eine Haarcortisolbestimmung daher mit weniger Zeit- und Untersuchungsaufwand zur Sicherung der Diagnose beitragen als andere Methoden, die nur einen kurzen Zeitpunkt widerspiegeln können und dementsprechend häufiger und über einen längeren Zeitpunkt durchgeführt werden müssen. Dies gilt in besonderem Maße zur Diagnostik des zyklischen Cushing-Syndroms. (Manenschijn et al., 2012)

Zur Eignung als diagnostisches Mittel in der klinischen Routine müssen noch weitere Studien mit Haarproben von unbehandelten Patienten mit Verdacht auf Cushing-Syndrom durchgeführt werden, um die Übereinstimmung mit anderen diagnostischen Tests und gesicherten Diagnosen zu überprüfen. Nach Schätzung der Mittelwerte des Haarcortisols für Gesunde auf ca.  $15 \pm 15$  pg/mg und bei Patienten mit Cushing-Syndrom auf ca.  $25 \pm 15$  pg/mg wäre dazu eine Größe von 36 Patienten nötig um auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  eine statistische *Power* von 0,8 zu erreichen. Dies entspricht ungefähr dem Studiendesign, das zu Beginn einer Studie aus Bethesda, USA angenommen wurde (Hodes et al., 2017). Aufgrund der hier vorgestellten Daten müssen allerdings 1481 Personen eingeschlossen werden. Denn die Haarkonzentrationen der gesunden Probanden lagen im Mittel bei  $17,6 \pm 17,5$  pg/mg, die der Patienten mit aktivem Hypercortisolismus bei  $19,4 \pm 14,0$  pg/mg. Dabei ist jedoch eine Schwäche der Studie anzumerken, denn die Haarproben der Patienten mit aktivem Cushing-Syndrom konnten nicht ausschließlich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung entnommen werden, sondern teilweise zu einem späteren Zeitpunkt als sie bereits in der endokrinologischen Ambulanz in Behandlung waren und zumindest von einer teilweisen Reduktion des Hypercortisolismus auszugehen ist. So zeigte sich in der Studie aus Bethesda, die die Eignung der Analyse des Haarcortisols zur Diagnostik bei Verdacht auf Cushing-Syndrom untersuchte, dass der Unterschied des Haarcortisols zwischen den Patienten mit Cushing-Syndrom mit  $266,6 \pm 738,4$  pmol/g und den Patienten, bei denen ein Cushing-Syndrom ausgeschlossen werden konnte, mit  $38,9 \pm 25,3$  pmol/g wesentlich größer war ( $p = 0.003$ ) (Hodes et al., 2017). Auch in einer Studie aus Rotterdam mit 78

Patienten und 174 gesunden Kontrollen hatten die Patienten wesentlich höhere Haarcortisolspiegel (Patienten mit Cushing-Syndrom: 106,9 pg/mg; Patienten, bei denen ein Cushing-Syndrom ausgeschlossen werden konnte: 12,7 pg/mg, gesunden Kontrollen: 8,4 pg/mg;  $p < 0,001$ ). Durch einen *Cut-off* von 31,1 pg/mg konnte mit einer Sensitivität von 93 % und einer Spezifität von 90 % ein Cushing-Syndrom diagnostiziert werden (Wester et al., 2017).

#### 4.2.4 Stärken und Schwächen der Anwendbarkeit bei der Therapie durch Hydrocortisonsubstitution

Nicht zuletzt aufgrund der hohen Anzahl der Haarproben der Patienten unter Hydrocortisonsubstitution konnte in der vorliegenden Arbeit im Rahmen einer mehrfaktoriellen Varianzanalyse mit Kovariaten ein statistisch signifikanter Unterschied zu den Gesunden aufgedeckt werden ( $F_{19,132} = 3,624$ ,  $p < 0,001$ , partielles  $\eta^2 = 0,343$ ,  $n = 152$ , korrigiertes  $R^2 = 0,248$ ). Außerdem zeigte sich eine Rangkorrelation des Haarcortisolspiegels mit der Substitutionsdosis Cortisol pro Tag ( $r_s = 0,342$ ,  $p = 0,036$ ).

Diese Ergebnisse sind im Einklang mit anderen Studien, die den Einfluss der Hydrocortisonsubstitution bei Hypocortisolismus überprüft haben (Gow et al., 2011; Ibrahim & Van Uum, 2014; Meyer & Novak, 2012; Noppe et al., 2014; Staufenbiel, Andela, et al., 2015). Dabei ist die Hydrocortisonsubstitution bei Nebenniereninsuffizienz wesentlich von der externen Gabe von Hydrocortison in Form von Cremes oder ähnlichem zu unterscheiden. Hier wies die Whitehall Studie nach, dass dies mit einer Verringerung des Cortisolgehalts in den Haaren einhergeht (Abell et al., 2016). Falls die zugeführten Glucocorticoide sich vom endogenen Cortisol unterscheiden, kann die Bestimmung des Haarcortisols eine Suppression der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse aufdecken, sowie bei Bestimmung des exogenen Cortisols die Dosierung beurteilen (Kamps et al., 2014; Wester & van Rossum, 2015).

Bisher wurde noch kein Vergleich zwischen verschiedenen Präparaten der Hydrocortisonsubstitution anhand des Haarcortisolspiegels veröffentlicht. In der vorliegenden Arbeit wurde ein solcher Vergleich zwischen Hydrocortison und Plenadren® gezogen, wobei kein signifikanter Unterschied der Verteilung des Haarcortisols gezeigt werden konnte ( $U = 169,5$ ;  $p = 0,334$ ). Dabei kann vermutet werden, dass die relative Heterogenität der Ätiologie des Hypocortisolismus wie auch die Gruppengröße von nur zehn Patienten mit Plenadren® Substitution die Vergleichbarkeit einschränken. In anderen Substraten legt ein Vergleich des Effekts der verschiedenen Freisetzungformen auf den Cortisolspiegel einen Unterschied nahe. In weiteren Studien unter Einbeziehung klinischer Parameter und benötigter

Notfallmedikamente an einem größeren Patientenkollektiv kann ein Unterschied weiter untersucht werden (Johannsson et al., 2012).

#### 4.2.5 Stärken und Schwächen der Anwendbarkeit auf die Therapie des Cushing-Syndroms

Den Erfolg einer Therapie des Cushing-Syndroms durch Messung der Haarcortisolkonzentration einschätzen zu können ist ein innovativer und neuer Ansatz. Insbesondere da die Mortalität und Morbidität eines Cushing-Syndroms mit der klinischen Aktivität einhergeht, ist die Überprüfung des Therapieerfolges wesentlich für die Lebensqualität und das Überleben der Patienten. Bisher wurde vor allem über Funktionstests und Basalwerte der Hypercortisolismus bestimmt und über bekannte Risikofaktoren des metabolischen Syndroms der Handlungsbedarf eingeschätzt. Die vorliegende Studie konnte nun zeigen, dass sich anhand des Haarcortisolspiegels ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen der Patienten mit Cushing-Syndrom mit florider und kontrollierter Krankheitsaktivität nachweisen lässt. Im Weiteren sollten die Ergebnisse der vorliegenden Studie an einem größeren Kollektiv überprüft werden. Unter Verwendung der bestimmten Mittelwerte und Standardabweichungen müssen 67 Patienten untersucht werden um auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  eine *Power* von 0,8 zu erreichen.

Von besonderem Interesse wäre dabei, ob sich anhand des Haarcortisolspiegels eine Vorhersage des kardiovaskulären Risikos oder des generellen Therapieerfolges treffen lässt. Bei älteren Menschen konnte in Studien ein Zusammenhang gezeigt werden (Manenschijn et al., 2013; Wester & van Rossum, 2015). In der vorliegenden Studie unterschieden sich die Gruppen statistisch signifikant nur in der Höhe der Triglyceridwerte. Dabei ist zu beachten, dass im vorliegenden Studiendesign kein Zeitverlauf der kardiovaskulären Morbidität dargestellt wurde.

Es ist zu vermuten, dass der Haarcortisolspiegel bei Adipositas als Marker für kardiales Risiko eingeführt werden kann, auch wenn beim metabolischen Syndrom andere Marker zur Bestimmung eines Risikos weit verbreitet sind, da die Bestimmung des Haarcortisols eine umfassendere Einschätzung ermöglichen könnte (Deutschbein & Fassnacht, 2015). Cortisolbestimmung aus anderen Untersuchungsmaterialien scheint Rückschlüsse auf eine Assoziation zu kardiovaskulären Erkrankungen zuzulassen (Wosu et al., 2013).

#### 4.2.6 Ausblick

Die vorliegende Studie konnte das Potential einer Etablierung der Haarcortisolbestimmung am Max-Planck-Institut für Psychiatrie aufzeigen.

Die Identifizierung verschiedener Einflussfaktoren ermöglicht die gezieltere Auswahl der zu berücksichtigenden Faktoren, wie Haarfarbe und Färbung. Weitere Einflüsse, wie die Verwendung von Haarstylingprodukten oder die kurzfristige Einnahme von hochdosierten Glucocorticoiden, bleiben noch zu klären.

Die im Rahmen der Studie gesammelten Daten gehen über das hier analysierte hinaus, so können in weiteren Untersuchungen zusätzliche Parameter wie körperliche Betätigung, Essgewohnheiten oder Stressempfinden untersucht werden. Auch bietet sich an, anhand der vorhandenen Haarproben den Einfluss längerer Lagerung auf die Haare hinsichtlich der Analyse von Cortisol zu überprüfen. Bei einer fortschreitenden Bedeutung der Individualisierung der Medizin kann anhand der Speichelproben für DNA-Analysen der gesunden Probanden das individuelle Genprofil bezüglich der 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen, des Glucocorticoidrezeptors oder anderer am Cortisolstoffwechsel beteiligter Enzyme untersucht werden (Quax et al., 2013).

Insbesondere die Verwendung der Methode zur Diagnostik bei Verdacht auf (zyklisches) Cushing-Syndrom und Nebenniereninsuffizienz kann durch ein geeignetes Studiendesign zunächst als Ergänzung zu herkömmlichen diagnostischen Verfahren dienen, später möglicherweise als Grundpfeiler der individuellen Diagnostik. Auch als Therapiemonitoring zur Substitution und zur Bestimmung des kardialen Risikoprofils zeigte sich die Haarcortisolbestimmung in der vorliegenden Studie als prinzipiell geeignet. Diese Einschätzung sollte durch Langzeitstudien bestätigt werden.



## 5 Zusammenfassung

Das Hormon Cortisol wirkt auf vielfältige Weise im Körper, entsprechend beeinflussen viele Faktoren seine Konzentrationen im menschlichen Körper. Diese physiologischen Schwankungen erschweren bei Erkrankungen des Cortisolstoffwechsels eine verlässliche Diagnostik und ein adäquates Therapiemonitoring. Die Cortisolbestimmung im Haar wurde als aussichtsreiche Alternative zu den bisherigen aufwändigen Untersuchungen beschrieben. Die vorliegende Arbeit verfolgte zum einen das Ziel, die Methode der Cortisolmessung im Haar in der klinischen Forschung der endokrinologischen Ambulanz am Max-Planck-Institut für Psychiatrie zu etablieren, zum anderen Einflussfaktoren auf die Cortisolbestimmung im Haar zu identifizieren und weiterhin die grundsätzliche Eignung der Methode zur Diagnostik und Therapie in der klinischen Routine zu überprüfen. Dazu wurden Haarproben von 118 gesunden Probanden, 38 Patienten mit Hydrocortisonsubstitution, 16 Patienten mit kontrollierter Krankheitsaktivität bei Cushing-Syndrom und 5 Patienten mit floridem Cushing-Syndrom analysiert. Durch Pulverisierung oder alkalische Hydrolyse und Lösung in Methanol wurde das Cortisol aus den Haaren extrahiert und mittels ELISA oder Massenspektrometrie gemessen. Es erfolgte die Überprüfung der Messgenauigkeit der Methoden und ihre externe Validierung. Von den untersuchten Einflussfaktoren zeigte sich die Haarfärbung statistisch signifikant ( $z = -2,585$ ,  $p = 0,010$ ). Unter Berücksichtigung von Erkrankung, Geschlecht, natürliche Haarfarbe, Färbung und einzig BMI als Kovariate konnte ein signifikantes Modell formuliert werden ( $F_{19,132} = 3,624$ ,  $p < 0,001$ , partielles  $\eta^2 = 0,343$ ,  $n = 152$ , korrigiertes  $R^2 = 0,248$ ). Hierbei wiesen Patienten mit Cortisolsubstitution, Männer und Personen mit ungefärbten Haaren einen höheren Haarcortisolspiegel auf. Zur Überprüfung der Diagnostik und Therapie bei Cushing-Syndrom und zur Einschätzung des Therapieerfolges bei Hydrocortisonsubstitution, insbesondere durch Anwendung verschiedener Freisetzungformen des Hydrocortisons, werden durch die vorliegende Studie Tendenzen aufgezeigt. Erstmals wurde der Cortisolgehalt in hydrolysiertem Fingernagel bestimmt. Dies stellt eine innovative Messmethode dar, deren Potential in weiteren Studien untersucht werden kann.



# Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. G.K. Stalla für die Überlassung dieses zukunftsweisenden Themas und die Möglichkeit diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. med. Mareike Stieg für die langjährige Betreuung und hervorragende Beratung, für die Bereitstellung von Material und Ideen sowie für die Durchsicht und Korrektur der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Johanna Stalla für die Einführung in die Arbeiten im Labor, für Unterstützung und Rat bei der technischen Durchführung und dem wissenschaftlichen Arbeiten.

Mein Dank gilt auch Herrn Christian Namendorf von der Core Unit Analytics und Massenspektrometrie der Klinischen Chemie des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie und Frau Dr. Cornelia Prehn vom Genome Analysis Center des Helmholtz Institut für die Durchführung und Beschreibung der massenspektrometrischen Messungen sowie Frau Dr. Juliane Graß der Technischen Universität Dresden für die Kooperation im Rahmen des Ringversuchs.

Bedanken möchte ich mich auch für die unermüdliche Beratung im Rahmen des statistischen Colloquiums des Instituts für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München und bei Herrn Dr. Alexander Crispin des Instituts für Medizinische Informationsverarbeitung Biometrie und Epidemiologie (IBE) der Ludwig-Maximilian-Universität München für den Beitrag zur statistischen Aufarbeitung der Daten.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und allen Mitarbeitern der neuroendokrinen Ambulanz und des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie, die an der Organisation des Projektes, der Erhebung der Daten und der Bereitstellung der Proben beteiligt waren.

Bedanken möchte ich mich vor allem bei meinen Eltern, die mir mein Studium und diese Arbeit ermöglicht haben, sowie bei meiner ganzen Familie und meinen Freunden, die mich fachlich und menschlich unterstützt und beraten haben.

Mein größter Dank gilt meinem Mann Andreas für seine Ermutigung und alle Fürsorge.



# Literaturverzeichnis

- (AWMF), A. d. W. M. F. (2015, 19.10.2016). S3-Leitlinie/Nationale Versorgungsleitlinie Unipolare Depression Langfassung. 2. Aufl. 4. Retrieved from <http://www.leitlinien.de/mdb/downloads/nvl/depression/depression-2aufl-vers4-lang.pdf>
- Aanderud, S., & Myking, O. L. (1981). Plasma cortisol concentrations after oral substitution of cortisone in the fasting and non-fasting state. *Acta Med Scand*, *210*(3), 157-161.
- Abell, J. G., Stalder, T., Ferrie, J. E., Shipley, M. J., Kirschbaum, C., Kivimaki, M., & Kumari, M. (2016). Assessing cortisol from hair samples in a large observational cohort: The Whitehall II study. *Psychoneuroendocrinology*, *73*, 148-156. doi:10.1016/j.psyneuen.2016.07.214
- Albar, W. F., Russell, E. W., Koren, G., Rieder, M. J., & van Umm, S. H. (2013). Human hair cortisol analysis: comparison of the internationally-reported ELISA methods. *Clin Invest Med*, *36*(6), E312-316.
- Alberti, K. G., Zimmet, P., & Shaw, J. (2006). Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med*, *23*(5), 469-480. doi:10.1111/j.1464-5491.2006.01858.x
- Alwani, R. A., Schmit Jongbloed, L. W., de Jong, F. H., van der Lely, A. J., de Herder, W. W., & Feelders, R. A. (2014). Differentiating between Cushing's disease and pseudo-Cushing's syndrome: comparison of four tests. *Eur J Endocrinol*, *170*(4), 477-486. doi:10.1530/eje-13-0702
- Arnaldi, G., Angeli, A., Atkinson, A. B., Bertagna, X., Cavagnini, F., Chrousos, G. P., . . . Boscaro, M. (2003). Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab*, *88*(12), 5593-5602. doi:10.1210/jc.2003-030871
- Baid, S. K., Rubino, D., Sinaii, N., Ramsey, S., Frank, A., & Nieman, L. K. (2009). Specificity of screening tests for Cushing's syndrome in an overweight and obese population. *J Clin Endocrinol Metab*, *94*(10), 3857-3864. doi:10.1210/jc.2008-2766
- Bates, R., Salsberry, P., & Ford, J. (2017). Measuring Stress in Young Children Using Hair Cortisol: The State of the Science. *Biol Res Nurs*, 1099800417711583. doi:10.1177/1099800417711583
- Beauregard, C., Dickstein, G., & Lacroix, A. (2002). Classic and recent etiologies of Cushing's syndrome: diagnosis and therapy. *Treat Endocrinol*, *1*(2), 79-94.
- Ben Khelil, M., Tegethoff, M., Meinlschmidt, G., Jamey, C., Ludes, B., & Raul, J. S. (2011). Simultaneous measurement of endogenous cortisol, cortisone, dehydroepiandrosterone, and dehydroepiandrosterone sulfate in nails by use of UPLC-MS-MS. *Anal Bioanal Chem*, *401*(4), 1153-1162. doi:10.1007/s00216-011-5172-3
- Binz, T. M., Gaehler, F., Voegel, C. D., Hofmann, M., Baumgartner, M. R., & Kraemer, T. (2018). Systematic investigations of endogenous cortisol and cortisone in nails by LC-MS/MS and correlation to hair. *Anal Bioanal Chem*. doi:10.1007/s00216-018-1131-6
- Bornstein, S. R., Allolio, B., Arlt, W., Barthel, A., Don-Wauchope, A., Hammer, G. D., . . . Torpy, D. J. (2016). Diagnosis and Treatment of Primary Adrenal Insufficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, *101*(2), 364-389. doi:10.1210/jc.2015-1710
- Bosma, H., Golsteyn, B., Groffen, D., Schils, T., Stalder, T., Syurina, E., . . . Feron, F. (2015). The socioeconomic patterning of perceived stress and hair cortisol in Dutch 10-12 year olds. *International Journal of Public Health and Epidemiology*, *4*(8), 195-197.
- Bost, R. O. (1992). Hair analysis - perspectives and limits of a proposed forensic method of proof: a review. *Forensic Sci Int*, *63*, 31-42.
- Braig, S., Grabher, F., Ntomchukwu, C., Reister, F., Stalder, T., Kirschbaum, C., . . . Rothenbacher, D. (2015). Determinants of maternal hair cortisol concentrations at delivery reflecting

- the last trimester of pregnancy. *Psychoneuroendocrinology*, 52, 289-296. doi:10.1016/j.psyneuen.2014.12.006
- Caldato, M. C., Fernandes, V. T., & Kater, C. E. (2004). One-year clinical evaluation of single morning dose prednisolone therapy for 21-hydroxylase deficiency. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 48(5), 705-712. doi:/S0004-27302004000500017
- Cassani, M., & Spiehler, V. (1993). Analytical requirements, perspectives and limits of immunological methods for drugs in hair. *Forensic Sci Int*, 63(1-3), 175-184.
- Charmandari, E., Nicolaides, N. C., & Chrousos, G. P. (2014). Adrenal insufficiency. *The Lancet*, 383(9935), 2152-2167. doi:10.1016/s0140-6736(13)61684-0
- Classen-Houben, D., Schuster, D., Da Cunha, T., Odermatt, A., Wolber, G., Jordis, U., & Kuenburg, B. (2009). Selective inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 by 18alpha-glycyrrhetic acid but not 18beta-glycyrrhetic acid. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 113(3-5), 248-252. doi:10.1016/j.jsbmb.2009.01.009
- Colburn, W. A., DiSanto, A. R., Stubbs, S. S., Monovich, R. E., & DeSante, K. A. (1980). Pharmacokinetic interpretation of plasma cortisol and cortisone concentrations following a single oral administration of cortisone acetate to human subjects. *J Clin Pharmacol*, 20(7), 428-436.
- Cone, E. J. (1996). Mechanisms of drug incorporation into hair. *Ther Drug Monit*, 18(4), 438-443.
- Constantinopoulos, P., Michalaki, M., Kottorou, A., Habeos, I., Psyrogiannis, A., Kalfarentzos, F., & Kyriazopoulou, V. (2015). Cortisol in tissue and systemic level as a contributing factor to the development of metabolic syndrome in severely obese patients. *Eur J Endocrinol*, 172(1), 69-78. doi:10.1530/EJE-14-0626
- D'Anna-Hernandez, K. L., Ross, R. G., Natvig, C. L., & Laudenslager, M. L. (2011). Hair cortisol levels as a retrospective marker of hypothalamic-pituitary axis activity throughout pregnancy: comparison to salivary cortisol. *Physiol Behav*, 104(2), 348-353. doi:10.1016/j.physbeh.2011.02.041
- de Waal, R. M. W. (1994). The anti-inflammatory activity of glucocorticoids. *Molecular Biology Reports*, 19(2), 81-88. doi:10.1007/bf00997151
- Dekkers, O. M., Horváth-Puhó, E., Jørgensen, J. O. L., Cannegieter, S. C., Ehrenstein, V., Vandembroucke, J. P., . . . Sørensen, H. T. (2013). Multisystem Morbidity and Mortality in Cushing's Syndrome: A Cohort Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(6), 2277-2284. doi:10.1210/jc.2012-3582
- DetectX®Cortisol Enzyme Immunoassay Kit. (2016). Retrieved from <http://www.arborassays.com/documentation/inserts/K003-H.pdf>
- Dettenborn, L., Tietze, A., Bruckner, F., & Kirschbaum, C. (2010). Higher cortisol content in hair among long-term unemployed individuals compared to controls. *Psychoneuroendocrinology*, 35(9), 1404-1409. doi:10.1016/j.psyneuen.2010.04.006
- Dettenborn, L., Tietze, A., Kirschbaum, C., & Stalder, T. (2012). The assessment of cortisol in human hair: associations with sociodemographic variables and potential confounders. *Stress*, 15(6), 578-588. doi:10.3109/10253890.2012.654479
- Deutschbein, T., Broecker-Preuss, M., Flitsch, J., Jaeger, A., Althoff, R., Walz, M. K., . . . Petersenn, S. (2012). Salivary cortisol as a diagnostic tool for Cushing's syndrome and adrenal insufficiency: improved screening by an automatic immunoassay. *Eur J Endocrinol*, 166(4), 613-618. doi:10.1530/EJE-11-0945
- Deutschbein, T., Broecker-Preuss, M., Hartmann, M. F., Althoff, R., Wudy, S. A., Mann, K., & Petersenn, S. (2011). Measurement of urinary free cortisol by current immunoassays: need for sex-dependent reference ranges to define hypercortisolism. *Horm Metab Res*, 43(10), 714-719. doi:10.1055/s-0031-1286297
- Deutschbein, T., & Fassnacht, M. (2015). [Endogenous Cushing's syndrome: new insights]. *Dtsch Med Wochenschr*, 140(12), 874-877. doi:10.1055/s-0041-102588
- Deutschbein, T., & Petersenn, S. (2013). Screening for Cushing's syndrome: new immunoassays require adequate normative data. *Horm Metab Res*, 45(2), 118-123. doi:10.1055/s-0032-1331745

- Deutschbein, T., Unger, N., Hinrichs, J., Walz, M. K., Mann, K., & Petersenn, S. (2009). Late-night and low-dose dexamethasone-suppressed cortisol in saliva and serum for the diagnosis of cortisol-secreting adrenal adenomas. *Eur J Endocrinol*, *161*(5), 747-753. doi:10.1530/EJE-09-0517
- Doan, S. N., DeYoung, G., Fuller-Rowell, T. E., Liu, C., & Meyer, J. (2018). Investigating relations among stress, sleep and nail cortisol and DHEA. *Stress*, *21*(2), 188-193. doi:10.1080/10253890.2018.1429398
- El-Farhan, N., Pickett, A., Ducroq, D., Bailey, C., Mitchem, K., Morgan, N., . . . Rees, D. A. (2013). Method-specific serum cortisol responses to the adrenocorticotrophin test: comparison of gas chromatography-mass spectrometry and five automated immunoassays. *Clin Endocrinol (Oxf)*, *78*(5), 673-680. doi:10.1111/cen.12039
- Elamin, M. B., Murad, M. H., Mullan, R., Erickson, D., Harris, K., Nadeem, S., . . . Montori, V. M. (2008). Accuracy of diagnostic tests for Cushing's syndrome: a systematic review and metaanalyses. *J Clin Endocrinol Metab*, *93*(5), 1553-1562. doi:10.1210/jc.2008-0139
- Endert, E., Ouwehand, A., Fliers, E., Prummel, M. F., & Wiersinga, W. M. (2005). Establishment of reference values for endocrine tests. Part IV: Adrenal insufficiency. *Neth J Med*, *63*(11), 435-443.
- Erturk, E., Jaffe, C. A., & Barkan, A. L. (1998). Evaluation of the integrity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by insulin hypoglycemia test. *J Clin Endocrinol Metab*, *83*(7), 2350-2354. doi:10.1210/jcem.83.7.4980
- European Medicines Agency. (2011). Committee for Medicinal Products for Human Use(CHMP). Guideline on bioanalytical method validation. In: EMEA London.
- Feller, S., Vigl, M., Bergmann, M. M., Boeing, H., Kirschbaum, C., & Stalder, T. (2014). Predictors of hair cortisol concentrations in older adults. *Psychoneuroendocrinology*, *39*, 132-140. doi:10.1016/j.psyneuen.2013.10.007
- Findling, J. W., Fleseriu, M., Newell-Price, J., Petersenn, S., Pivonello, R., Kandra, A., . . . Biller, B. M. (2016). Late-night salivary cortisol may be valuable for assessing treatment response in patients with Cushing's disease: 12-month, Phase III pasireotide study. *Endocrine*, *54*(2), 516-523. doi:10.1007/s12020-016-0978-6
- Fleseriu, M., & Petersenn, S. (2015). Medical therapy for Cushing's disease: adrenal steroidogenesis inhibitors and glucocorticoid receptor blockers. *Pituitary*, *18*(2), 245-252. doi:10.1007/s11102-014-0627-0
- Gaillard, Y., Vayssette, F., & Pepin, G. (2000). Compared interest between hair analysis and urinalysis in doping controls. Results for amphetamines, corticosteroids and anabolic steroids in racing cyclists. *Forensic Sci Int*, *107*(1-3), 361-379.
- Galon, J., Franchimont, D., Hiroi, N., Frey, G., Boettner, A., Ehrhart-Bornstein, M., . . . Bornstein, S. R. (2002). Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *Faseb j*, *16*(1), 61-71. doi:10.1096/fj.01-0245com
- Gao, W., Stalder, T., Foley, P., Rauh, M., Deng, H., & Kirschbaum, C. (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. doi:10.1016/j.jchromb.2013.03.008
- Geiger, A. M., Pitts, K. P., Feldkamp, J., Kirschbaum, C., & Wolf, J. M. (2015). Cortisol-dependent stress effects on cell distribution in healthy individuals and individuals suffering from chronic adrenal insufficiency. *Brain Behav Immun*, *50*, 241-248. doi:10.1016/j.bbi.2015.07.010
- Gidlow, C. J., Randall, J., Gillman, J., Silk, S., & Jones, M. V. (2016). Hair cortisol and self-reported stress in healthy, working adults. *Psychoneuroendocrinology*, *63*, 163-169. doi:10.1016/j.psyneuen.2015.09.022
- Gilbert, R., & Lim, E. M. (2008). The diagnosis of Cushing's syndrome: an endocrine society clinical practice guideline. *Clin Biochem Rev*, *29*(3), 103-106.

- Gomez-Sanchez, E., & Gomez-Sanchez, C. E. (2014). The multifaceted mineralocorticoid receptor. *Compr Physiol*, 4(3), 965-994. doi:10.1002/cphy.c130044
- Gow, R., Koren, G., Rieder, M., & Van Uum, S. (2011). Hair cortisol content in patients with adrenal insufficiency on hydrocortisone replacement therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 74(6), 687-693. doi:10.1111/j.1365-2265.2011.04001.x
- Gow, R., Thomson, S., Rieder, M., Van Uum, S., & Koren, G. (2010). An assessment of cortisol analysis in hair and its clinical applications. *Forensic Sci Int*, 196(1-3), 32-37. doi:10.1016/j.forsciint.2009.12.040
- Grass, J., Kirschbaum, C., Miller, R., Gao, W., Steudte-Schmiedgen, S., & Stalder, T. (2015). Sweat-inducing physiological challenges do not result in acute changes in hair cortisol concentrations. *Psychoneuroendocrinology*, 53, 108-116. doi:10.1016/j.psyneuen.2014.12.023
- Grassi-Oliveira, R., Pezzi, J. C., Daruy-Filho, L., Viola, T. W., Francke, I. D., Leite, C. E., & Brietzke, E. (2012). Hair cortisol and stressful life events retrospective assessment in crack cocaine users. *Am J Drug Alcohol Abuse*, 38(6), 535-538. doi:10.3109/00952990.2012.694538
- Guignat, L., & Bertherat, J. (2010). The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline: commentary from a European perspective. *Eur J Endocrinol*, 163(1), 9-13. doi:10.1530/eje-09-0627
- Guyre, P. M., Bodwell, J. E., & Munck, A. (1984). Glucocorticoid actions on lymphoid tissue and the immune system: physiologic and therapeutic implications. *Prog Clin Biol Res*, 142, 181-194.
- Hamel, A. F., Meyer, J. S., Henchey, E., Dettmer, A. M., Suomi, S. J., & Novak, M. A. (2011). Effects of shampoo and water washing on hair cortisol concentrations. *Clin Chim Acta*, 412(3-4), 382-385. doi:10.1016/j.cca.2010.10.019
- Hautzinger, M., Bailer, M., Worall, H., & Keller, F. (1994). *Beck-Depressions-Inventar – Testhandbuch*. Bern: Verlag Hans Huber.
- Heazelwood, V. J., Galligan, J. P., Cannell, G. R., Bochner, F., & Mortimer, R. H. (1984). Plasma cortisol delivery from oral cortisol and cortisone acetate: relative bioavailability. *Br J Clin Pharmacol*, 17(1), 55-59.
- Hellman, L., Nakada, F., Curti, J., Weitzman, E. D., Kream, J., Roffwarg, H., . . . Gallagher, T. F. (1970). Cortisol is secreted episodically by normal man. *J Clin Endocrinol Metab*, 30(4), 411-422. doi:10.1210/jcem-30-4-411
- Herane Vives, A., De Angel, V., Papadopoulos, A., Strawbridge, R., Wise, T., Young, A. H., . . . Cleare, A. J. (2015). The relationship between cortisol, stress and psychiatric illness: New insights using hair analysis. *J Psychiatr Res*, 70, 38-49. doi:10.1016/j.jpsychires.2015.08.007
- Herane-Vives, A., Fischer, S., de Angel, V., Wise, T., Cheung, E., Chua, K. C., . . . Cleare, A. J. (2018). Elevated fingernail cortisol levels in major depressive episodes. *Psychoneuroendocrinology*, 88, 17-23. doi:10.1016/j.psyneuen.2017.10.026
- Higashi, T., Yamagata, K., Kato, Y., Ogawa, Y., Takano, K., Nakaaze, Y., . . . Ogawa, S. (2016). Methods for determination of fingernail steroids by LC/MS/MS and differences in their contents between right and left hands. *Steroids*, 109, 60-65. doi:10.1016/j.steroids.2016.02.013
- Hintzpeter, J., Stapelfeld, C., Loerz, C., Martin, H. J., & Maser, E. (2014). Green tea and one of its constituents, Epigallocatechine-3-gallate, are potent inhibitors of human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *PLoS One*, 9(1), e84468. doi:10.1371/journal.pone.0084468
- Hodes, A., Lodish, M. B., Tirosh, A., Meyer, J., Belyavskaya, E., Lyssikatos, C., . . . Zilbermint, M. (2017). Hair cortisol in the evaluation of Cushing syndrome. *Endocrine*, 56(1), 164-174. doi:10.1007/s12020-017-1231-7
- Hoffman, M. C., Karban, L. V., Benitez, P., Goodteacher, A., & Laudenslager, M. L. (2014). Chemical processing and shampooing impact cortisol measured in human hair. *Clin Invest Med*, 37(4), E252-257.

- Honegger, J., Schlaffer, S., Menzel, C., Droste, M., Werner, S., Elbelt, U., . . . Pituitary Working Group of the German Society of, E. (2015). Diagnosis of Primary Hypophysitis in Germany. *J Clin Endocrinol Metab*, *100*(10), 3841-3849. doi:10.1210/jc.2015-2152
- Husebye, E. S., Allolio, B., Arlt, W., Badenhop, K., Bensing, S., Betterle, C., . . . Pearce, S. H. (2014). Consensus statement on the diagnosis, treatment and follow-up of patients with primary adrenal insufficiency. *J Intern Med*, *275*(2), 104-115. doi:10.1111/joim.12162
- Ibrahim, C., & Van Uum, S. (2014). Hair analysis of cortisol levels in adrenal insufficiency. *Cmaj*, *186*(16), 1244. doi:10.1503/cmaj.140407
- Iglesias, S., Jacobsen, D., Gonzalez, D., Azzara, S., Repetto, E. M., Jamardo, J., . . . Fabre, B. (2015). Hair cortisol: A new tool for evaluating stress in programs of stress management. *Life Sci*, *141*, 188-192. doi:10.1016/j.lfs.2015.10.006
- Ito, N., Ito, T., Kromminga, A., Bettermann, A., Takigawa, M., Kees, F., . . . Paus, R. (2005). Human hair follicles display a functional equivalent of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and synthesize cortisol. *Faseb j*, *19*(10), 1332-1334. doi:10.1096/fj.04-1968fje
- Izawa, S., Miki, K., Tsuchiya, M., Mitani, T., Midorikawa, T., Fuchu, T., . . . Togo, F. (2015). Cortisol level measurements in fingernails as a retrospective index of hormone production. *Psychoneuroendocrinology*, *54*, 24-30. doi:10.1016/j.psyneuen.2015.01.015
- Johannsson, G., Nilsson, A. G., Bergthorsdottir, R., Burman, P., Dahlqvist, P., Ekman, B., . . . Skrtic, S. (2012). Improved cortisol exposure-time profile and outcome in patients with adrenal insufficiency: a prospective randomized trial of a novel hydrocortisone dual-release formulation. *J Clin Endocrinol Metab*, *97*(2), 473-481. doi:10.1210/jc.2011-1926
- Ju, S. Y., Lee, J. Y., & Kim, D. H. (2017). Association of metabolic syndrome and its components with all-cause and cardiovascular mortality in the elderly: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Medicine (Baltimore)*, *96*(45), e8491. doi:10.1097/MD.00000000000008491
- Juszczak, G. R., & Stankiewicz, A. M. (2018). Glucocorticoids, genes and brain function. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *82*, 136-168. doi:10.1016/j.pnpbp.2017.11.020
- Kamps, A. W., Molenmaker, M., Kemperman, R., van der Veen, B. S., Bocca, G., & Veeger, N. J. (2014). Children with asthma have significantly lower long-term cortisol levels in their scalp hair than healthy children. *Acta Paediatr*, *103*(9), 957-961. doi:10.1111/apa.12685
- Karlen, J., Ludvigsson, J., Frostell, A., Theodorsson, E., & Faresjo, T. (2011). Cortisol in hair measured in young adults - a biomarker of major life stressors? *BMC Clin Pathol*, *11*, 12. doi:10.1186/1472-6890-11-12
- Kintz, P., Cirimele, V., & Ludes, B. (2000). Pharmacological criteria that can affect the detection of doping agents in hair. *Forensic Sci Int*, *107*(1-3), 325-334.
- Kirschbaum, C., Tietze, A., Skoluda, N., & Dettenborn, L. (2009). Hair as a retrospective calendar of cortisol production-Increased cortisol incorporation into hair in the third trimester of pregnancy. *Psychoneuroendocrinology*, *34*(1), 32-37. doi:10.1016/j.psyneuen.2008.08.024
- Knudsen, P. J., Dinarello, C. A., & Strom, T. B. (1987). Glucocorticoids inhibit transcriptional and post-transcriptional expression of interleukin 1 in U937 cells. *J Immunol*, *139*(12), 4129-4134.
- Kratschmar, D. V., Vuorinen, A., Da Cunha, T., Wolber, G., Classen-Houben, D., Doblhoff, O., . . . Odermatt, A. (2011). Characterization of activity and binding mode of glycyrrhetic acid derivatives inhibiting 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *125*(1-2), 129-142. doi:10.1016/j.jsbmb.2010.12.019
- Kristensen, S. K., Larsen, S. C., Olsen, N. J., Fahrenkrug, J., & Heitmann, B. L. (2017). Hair dyeing, hair washing and hair cortisol concentrations among women from the healthy start study. *Psychoneuroendocrinology*, *77*, 182-185. doi:10.1016/j.psyneuen.2016.12.016
- Kuehl, L. K., Hinkelmann, K., Muhtz, C., Dettenborn, L., Wingenfeld, K., Spitzer, C., . . . Otte, C. (2015). Hair cortisol and cortisol awakening response are associated with criteria of the

- metabolic syndrome in opposite directions. *Psychoneuroendocrinology*, 51, 365-370. doi:10.1016/j.psyneuen.2014.09.012
- Labeur, M., Theodoropoulou, M., Sievers, C., Paez-Pereda, M., Castillo, V., Arzt, E., & Stalla, G. K. (2006). New aspects in the diagnosis and treatment of Cushing disease. *Front Horm Res*, 35, 169-178. doi:10.1159/000094325
- Lightman, S. L., Wiles, C. C., Atkinson, H. C., Henley, D. E., Russell, G. M., Leendertz, J. A., . . . Conway-Campbell, B. L. (2008). The significance of glucocorticoid pulsatility. *Eur J Pharmacol*, 583(2-3), 255-262. doi:10.1016/j.ejphar.2007.11.073
- Lin, C. L., Wu, T. J., Machacek, D. A., Jiang, N. S., & Kao, P. C. (1997). Urinary free cortisol and cortisone determined by high performance liquid chromatography in the diagnosis of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 82(1), 151-155. doi:10.1210/jcem.82.1.3687
- Loussouarn, G., El Rawadi, C., & Genain, G. (2005). Diversity of hair growth profiles. *Int J Dermatol*, 44 Suppl 1, 6-9. doi:10.1111/j.1365-4632.2005.02800.x
- Luo, H., Hu, X., Liu, X., Ma, X., Guo, W., Qiu, C., . . . Li, T. (2012). Hair cortisol level as a biomarker for altered hypothalamic-pituitary-adrenal activity in female adolescents with posttraumatic stress disorder after the 2008 Wenchuan earthquake. *Biol Psychiatry*, 72(1), 65-69. doi:10.1016/j.biopsych.2011.12.020
- Maidana, P., Bruno, O. D., & Mesch, V. (2013). [A critical analysis of cortisol measurements: an update]. *Medicina (B Aires)*, 73(6), 579-584.
- Manenshijn, L., Koper, J. W., Lamberts, S. W., & van Rossum, E. F. (2011). Evaluation of a method to measure long term cortisol levels. *Steroids*, 76(10-11), 1032-1036. doi:10.1016/j.steroids.2011.04.005
- Manenshijn, L., Koper, J. W., van den Akker, E. L., de Heide, L. J., Geerdink, E. A., de Jong, F. H., . . . van Rossum, E. F. (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(10), E1836-1843. doi:10.1210/jc.2012-1852
- Manenshijn, L., Schaap, L., van Schoor, N. M., van der Pas, S., Peeters, G. M., Lips, P., . . . van Rossum, E. F. (2013). High long-term cortisol levels, measured in scalp hair, are associated with a history of cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 98(5), 2078-2083. doi:10.1210/jc.2012-3663
- Martens, E. A., Lemmens, S. G., Adam, T. C., & Westerterp-Plantenga, M. S. (2012). Sex differences in HPA axis activity in response to a meal. *Physiol Behav*, 106(2), 272-277. doi:10.1016/j.physbeh.2012.02.016
- Meyer, J. S., & Novak, M. A. (2012). Minireview: Hair cortisol: a novel biomarker of hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity. *Endocrinology*, 153(9), 4120-4127. doi:10.1210/en.2012-1226
- Michels, A., & Michels, N. (2014). Addison disease: early detection and treatment principles. *Am Fam Physician*, 89(7), 563-568.
- Miller, G. E., Chen, E., & Zhou, E. S. (2007). If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans. *Psychol Bull*, 133(1), 25-45. doi:10.1037/0033-2909.133.1.25
- Murray, R. D., Ekman, B., Uddin, S., Marelli, C., Quinkler, M., Zelissen, P. M., & the, E. U. A. I. R. I. (2017). Management of glucocorticoid replacement in adrenal insufficiency shows notable heterogeneity - data from the EU-AIR. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 86(3), 340-346. doi:10.1111/cen.13267
- Newell-Price, J., Bertagna, X., Grossman, A. B., & Nieman, L. K. (2006). Cushing's syndrome. *Lancet*, 367(9522), 1605-1617. doi:10.1016/S0140-6736(06)68699-6
- Nickelsen, T., Schulz, F., & Demisch, K. (1983). Studies on cortisol substitution therapy in patients with adrenal insufficiency. *Exp Clin Endocrinol*, 82(1), 35-41. doi:10.1055/s-0029-1210253
- Nieman, L. K., Biller, B. M. K., Findling, J. W., Murad, M. H., Newell-Price, J., Savage, M. O., & Tabarin, A. (2015). Treatment of Cushing's Syndrome: An Endocrine Society Clinical

- Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100(8), 2807-2831. doi:10.1210/jc.2015-1818
- Nieman, L. K., Biller, B. M. K., Findling, J. W., Newell-Price, J., Savage, M. O., Stewart, P. M., & Montori, V. M. (2008). The Diagnosis of Cushing's Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(5), 1526-1540. doi:10.1210/jc.2008-0125
- Noppe, G., de Rijke, Y. B., Dorst, K., van den Akker, E. L., & van Rossum, E. F. (2015). LC-MS/MS-based method for long-term steroid profiling in human scalp hair. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 83(2), 162-166. doi:10.1111/cen.12781
- Noppe, G., van Rossum, E. F., Vliegenthart, J., Koper, J. W., & van den Akker, E. L. (2014). Elevated hair cortisol concentrations in children with adrenal insufficiency on hydrocortisone replacement therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 81(6), 820-825. doi:10.1111/cen.12551
- Oakley, R. H., & Cidlowski, J. A. (2013). The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*, 132(5), 1033-1044. doi:10.1016/j.jaci.2013.09.007
- Olivera-Figueroa, L. A., Juster, R. P., Morin-Major, J. K., Marin, M. F., & Lupien, S. J. (2015). A time to be stressed? Time perspectives and cortisol dynamics among healthy adults. *Biol Psychol*, 111, 90-99. doi:10.1016/j.biopsycho.2015.09.002
- Pang, S., Wu, H., Wang, Q., Cai, M., Shi, W., & Shang, J. (2014). Chronic stress suppresses the expression of cutaneous hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis elements and melanogenesis. *PLoS One*, 9(5), e98283. doi:10.1371/journal.pone.0098283
- Papadopoulos, A. S., & Cleare, A. J. (2011). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction in chronic fatigue syndrome. *Nat Rev Endocrinol*, 8(1), 22-32. doi:10.1038/nrendo.2011.153
- Pecori Giraldi, F., Pivonello, R., Ambrogio, A. G., De Martino, M. C., De Martin, M., Scacchi, M., . . . Cavagnini, F. (2007). The dexamethasone-suppressed corticotropin-releasing hormone stimulation test and the desmopressin test to distinguish Cushing's syndrome from pseudo-Cushing's states. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 66(2), 251-257. doi:10.1111/j.1365-2265.2006.02717.x
- Popp, K. (2018). *Maschinelles Sehen als Hilfsmittel in der Differentialdiagnostik des Cushing-Syndroms*.
- Pruessner, J. C., Kirschbaum, C., Meinlschmid, G., & Hellhammer, D. H. (2003). Two formulas for computation of the area under the curve represent measures of total hormone concentration versus time-dependent change. *Psychoneuroendocrinology*, 28(7), 916-931.
- Quax, R. A., Manenschijs, L., Koper, J. W., Hazes, J. M., Lamberts, S. W., van Rossum, E. F., & Feelders, R. A. (2013). Glucocorticoid sensitivity in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*, 9(11), 670-686. doi:10.1038/nrendo.2013.183
- Quinkler, M., Beuschlein, F., Hahner, S., Meyer, G., Schofl, C., & Stalla, G. K. (2013). Adrenal cortical insufficiency--a life threatening illness with multiple etiologies. *Dtsch Arztebl Int*, 110(51-52), 882-888. doi:10.3238/arztebl.2013.0882
- Raff, H., & Carroll, T. (2015). Cushing's syndrome: from physiological principles to diagnosis and clinical care. *J Physiol*, 593(3), 493-506. doi:10.1113/jphysiol.2014.282871
- Raul, J. S., Cirimele, V., Ludes, B., & Kintz, P. (2004). Detection of physiological concentrations of cortisol and cortisone in human hair. *Clin Biochem*, 37(12), 1105-1111. doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.02.010
- Russell, E., Kirschbaum, C., Laudenslager, M. L., Stalder, T., de Rijke, Y., van Rossum, E. F., . . . Koren, G. (2015). Toward standardization of hair cortisol measurement: results of the first international interlaboratory round robin. *Ther Drug Monit*, 37(1), 71-75. doi:10.1097/FTD.000000000000148

- Russell, E., Koren, G., Rieder, M., & Van Uum, S. (2012). Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology*, *37*(5), 589-601. doi:10.1016/j.psyneuen.2011.09.009
- Sauve, B., Koren, G., Walsh, G., Tokmakejian, S., & Van Uum, S. H. (2007). Measurement of cortisol in human hair as a biomarker of systemic exposure. *Clin Invest Med*, *30*(5), E183-191.
- Schäffler, A. (2015). Funktionsdiagnostik in Endokrinologie, Diabetologie und Stoffwechsel : Indikation, Testvorbereitung und -durchführung, Interpretation. In A. Schäffler (Ed.), (Vol. 3). Berlin Heidelberg: Springer.
- Schipf, S., Alte, D., Völzke, H., Friedrich, N., Haring, R., Lohmann, T., . . . Wallaschofski, H. (2010). Prävalenz des Metabolischen Syndroms in Deutschland: Ergebnisse der Study of Health in Pomerania (SHIP). *Diabetologie und Stoffwechsel*, *5*(03), 161-168. doi:10.1055/s-0030-1247406
- Schmidt, I. L., Lahner, H., Mann, K., & Petersenn, S. (2003). Diagnosis of adrenal insufficiency: Evaluation of the corticotropin-releasing hormone test and Basal serum cortisol in comparison to the insulin tolerance test in patients with hypothalamic-pituitary-adrenal disease. *J Clin Endocrinol Metab*, *88*(9), 4193-4198. doi:10.1210/jc.2002-021897
- Scott, R. S., Donald, R. A., & Espiner, E. A. (1978). Plasma ACTH and cortisol profiles in Addisonian patients receiving conventional substitution therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)*, *9*(6), 571-576.
- Short, S. J., Stalder, T., Marceau, K., Entringer, S., Moog, N. K., Shirtcliff, E. A., . . . Buss, C. (2016). Correspondence between hair cortisol concentrations and 30-day integrated daily salivary and weekly urinary cortisol measures. *Psychoneuroendocrinology*, *71*, 12-18. doi:10.1016/j.psyneuen.2016.05.007
- Slominski, A. T., Manna, P. R., & Tuckey, R. C. (2014). Cutaneous glucocorticosteroidogenesis: securing local homeostasis and the skin integrity. *Exp Dermatol*, *23*(6), 369-374. doi:10.1111/exd.12376
- Slominski, R., Rovnaghi, C. R., & Anand, K. J. (2015). Methodological Considerations for Hair Cortisol Measurements in Children. *Ther Drug Monit*, *37*(6), 812-820. doi:10.1097/FTD.0000000000000209
- Smith, R. E., Maguire, J. A., Stein-Oakley, A. N., Sasano, H., Takahashi, K., Fukushima, K., & Krozowski, Z. S. (1996). Localization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II in human epithelial tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, *81*(9), 3244-3248. doi:10.1210/jcem.81.9.8784076
- Stalder, T., & Kirschbaum, C. (2012). Analysis of cortisol in hair--state of the art and future directions. *Brain Behav Immun*, *26*(7), 1019-1029. doi:10.1016/j.bbi.2012.02.002
- Stalder, T., Kirschbaum, C., Alexander, N., Bornstein, S. R., Gao, W., Miller, R., . . . Fischer, J. E. (2013). Cortisol in Hair and the Metabolic Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *98*(6), 2573-2580. doi:10.1210/jc.2013-1056
- Stalder, T., Kirschbaum, C., Heinze, K., Steudte, S., Foley, P., Tietze, A., & Dettenborn, L. (2010). Use of hair cortisol analysis to detect hypercortisolism during active drinking phases in alcohol-dependent individuals. *Biol Psychol*, *85*(3), 357-360. doi:10.1016/j.biopsycho.2010.08.005
- Stalder, T., Steudte, S., Miller, R., Skoluda, N., Dettenborn, L., & Kirschbaum, C. (2012). Intraindividual stability of hair cortisol concentrations. *Psychoneuroendocrinology*, *37*(5), 602-610. doi:10.1016/j.psyneuen.2011.08.007
- Stalder, T., Steudte-Schmiedgen, S., Alexander, N., Klucken, T., Vater, A., Wichmann, S., . . . Miller, R. (2017). Stress-related and basic determinants of hair cortisol in humans: A meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, *77*, 261-274. doi:10.1016/j.psyneuen.2016.12.017
- Stalla, G. K., Losa, M., Oeckler, R., Muller, O. A., & von Werder, K. (1988). Insulin hypoglycemia test and releasing hormone (corticotropin-releasing hormone and growth hormone-

- releasing hormone) stimulation in patients with pituitary failure of different origin. *Horm Res*, 29(5-6), 191-196. doi:10.1159/000181001
- Staufenbiel, S. M., Andela, C. D., Manenschijn, L., Pereira, A. M., van Rossum, E. F., & Biermasz, N. R. (2015). Increased Hair Cortisol Concentrations and BMI in Patients With Pituitary-Adrenal Disease on Hydrocortisone Replacement. *J Clin Endocrinol Metab*, 100(6), 2456-2462. doi:10.1210/jc.2014-4328
- Staufenbiel, S. M., Penninx, B. W., de Rijke, Y. B., van den Akker, E. L., & van Rossum, E. F. (2015). Determinants of hair cortisol and hair cortisone concentrations in adults. *Psychoneuroendocrinology*, 60, 182-194. doi:10.1016/j.psyneuen.2015.06.011
- Staufenbiel, S. M., Penninx, B. W., Spijker, A. T., Elzinga, B. M., & van Rossum, E. F. (2013). Hair cortisol, stress exposure, and mental health in humans: a systematic review. *Psychoneuroendocrinology*, 38(8), 1220-1235. doi:10.1016/j.psyneuen.2012.11.015
- Stuedte, S., Stalder, T., Dettenborn, L., Klumbies, E., Foley, P., Beesdo-Baum, K., & Kirschbaum, C. (2011). Decreased hair cortisol concentrations in generalised anxiety disorder. *Psychiatry Res*, 186(2-3), 310-314. doi:10.1016/j.psychres.2010.09.002
- Stieg, M. R., Renner, U., Stalla, G. K., & Kopczak, A. (2017). Advances in understanding hypopituitarism. *F1000Res*, 6, 178. doi:10.12688/f1000research.9436.1
- Taves, M. D., Gomez-Sanchez, C. E., & Soma, K. K. (2011). Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 301(1), E11-E24. doi:10.1152/ajpendo.00100.2011
- Thomson, S., Koren, G., Fraser, L. A., Rieder, M., Friedman, T. C., & Van Uum, S. H. (2010). Hair analysis provides a historical record of cortisol levels in Cushing's syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 118(2), 133-138. doi:10.1055/s-0029-1220771
- Tiemensma, J., Andela, C. D., Pereira, A. M., Romijn, J. A., Biermasz, N. R., & Kaptein, A. A. (2014). Patients with adrenal insufficiency hate their medication: concerns and stronger beliefs about the necessity of hydrocortisone intake are associated with more negative illness perceptions. *J Clin Endocrinol Metab*, 99(10), 3668-3676. doi:10.1210/jc.2014-1527
- Tiganescu, A., Walker, E. A., Hardy, R. S., Mayes, A. E., & Stewart, P. M. (2011). Localization, age- and site-dependent expression, and regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in skin. *J Invest Dermatol*, 131(1), 30-36. doi:10.1038/jid.2010.257
- Trifonova, S. T., Gantenbein, M., Turner, J. D., & Muller, C. P. (2013). The use of saliva for assessment of cortisol pulsatile secretion by deconvolution analysis. *Psychoneuroendocrinology*, 38(7), 1090-1101. doi:10.1016/j.psyneuen.2012.10.016
- Vaghri, Z., Guhn, M., Weinberg, J., Grunau, R. E., Yu, W., & Hertzman, C. (2013). Hair cortisol reflects socio-economic factors and hair zinc in preschoolers. *Psychoneuroendocrinology*, 38(3), 331-340. doi:10.1016/j.psyneuen.2012.06.009
- van Holland, B. J., Frings-Dresen, M. H., & Sluiter, J. K. (2012). Measuring short-term and long-term physiological stress effects by cortisol reactivity in saliva and hair. *Int Arch Occup Environ Health*, 85(8), 849-852. doi:10.1007/s00420-011-0727-3
- Veldhorst, M. A., Noppe, G., Jongejan, M. H., Kok, C. B., Mekic, S., Koper, J. W., . . . van den Akker, E. L. (2014). Increased scalp hair cortisol concentrations in obese children. *J Clin Endocrinol Metab*, 99(1), 285-290. doi:10.1210/jc.2013-2924
- Veronesi, M. C., Comin, A., Meloni, T., Faustini, M., Rota, A., & Prandi, A. (2015). Coat and claws as new matrices for noninvasive long-term cortisol assessment in dogs from birth up to 30 days of age. *Theriogenology*, 84(5), 791-796. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.05.013
- Vliegthart, J., Noppe, G., van Rossum, E. F., Koper, J. W., Raat, H., & van den Akker, E. L. (2016). Socioeconomic status in children is associated with hair cortisol levels as a biological measure of chronic stress. *Psychoneuroendocrinology*, 65, 9-14. doi:10.1016/j.psyneuen.2015.11.022

- Voegel, C. D., La Marca-Ghaemmaghami, P., Ehlert, U., Baumgartner, M. R., Kraemer, T., & Binz, T. M. (2018). Steroid profiling in nails using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Steroids*, *140*, 144-150. doi:10.1016/j.steroids.2018.09.015
- Warnock, F., McElwee, K., Seo, R. J., Mclsaac, S., Seim, D., Ramirez-Aponte, T., . . . Young, A. H. (2010). Measuring cortisol and DHEA in fingernails: a pilot study. *Neuropsychiatr Dis Treat*, *6*, 1-7.
- Wei, J., Sun, G., Zhao, L., Yang, X., Liu, X., Lin, D., . . . Ma, X. (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. doi:10.1016/j.jad.2015.01.023
- Wennig, R. (2000). Potential problems with the interpretation of hair analysis results. *Forensic Sci Int*, *107*(1-3), 5-12. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0379-0738\(99\)00146-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0379-0738(99)00146-2)
- Wester, V. L., Reincke, M., Koper, J. W., van den Akker, E. L., Manenschijn, L., Berr, C. M., . . . van Rossum, E. F. (2017). Scalp hair cortisol for diagnosis of Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol*, *176*(6), 695-703. doi:10.1530/EJE-16-0873
- Wester, V. L., Staufenbiel, S. M., Veldhorst, M. A., Visser, J. A., Manenschijn, L., Koper, J. W., . . . van Rossum, E. F. (2014). Long-term cortisol levels measured in scalp hair of obese patients. *Obesity (Silver Spring)*, *22*(9), 1956-1958. doi:10.1002/oby.20795
- Wester, V. L., & van Rossum, E. F. (2015). Clinical applications of cortisol measurements in hair. *Eur J Endocrinol*, *173*(4), M1-10. doi:10.1530/EJE-15-0313
- Wosu, A. C., Valdimarsdottir, U., Shields, A. E., Williams, D. R., & Williams, M. A. (2013). Correlates of cortisol in human hair: implications for epidemiologic studies on health effects of chronic stress. *Ann Epidemiol*, *23*(12), 797-811 e792. doi:10.1016/j.annepidem.2013.09.006
- Xiang, L., Sunesara, I., Rehm, K. E., & Marshall, G. D., Jr. (2016). Hair Cortisol Concentrations Are Associated with Hair Growth Rate. *Neuroimmunomodulation*, *23*(5-6), 287-294. doi:10.1159/000455867
- Xie, Q., Gao, W., Li, J., Qiao, T., Jin, J., Deng, H., & Lu, Z. (2011). Correlation of cortisol in 1-cm hair segment with salivary cortisol in human: hair cortisol as an endogenous biomarker. *Clin Chem Lab Med*, *49*(12), 2013-2019. doi:10.1515/CCLM.2011.706
- Young, E. A., Abelson, J., & Lightman, S. L. (2004). Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health. *Front Neuroendocrinol*, *25*(2), 69-76. doi:10.1016/j.yfrne.2004.07.001

# Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
CBG	<i>Cortisol-binding-Globulin</i>
CI	Konfidenzintervall
CLIA	<i>Chemilumineszenz-immuno-Assay</i>
CRH	<i>Corticotropin-releasing</i> Hormon
CV	<i>Coefficient-of-Variation</i> , Variationskoeffizient
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked-immunoabsorbent-Assay</i>
GR	Glucocorticoidrezeptor
HPLC	<i>High-Performance-liquid-Chromatography</i>
HZM	Helmholtz Zentrum München
IQR	Interquartilsbereiche
LC-ESI-MS/MS	Flüssigchromatographie mit Elektrospray-Massenspektrometrie-Kopplung
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie/ Massenspektrometrie-Kopplung
LOD	<i>Limit-of-Detection</i>
LLOQ und ULOQ	<i>Lower-and-upper-Limit-of-Quantification</i>
M	Mittelwert
MPI	Max-Planck-Institut für Psychiatrie
NFκB	<i>Nuclear-Factor-kappa-light-Chain-Enhancer</i>
PS	Polysterol
RIA	<i>Radio-immuno-Assay</i>
ROC-Analyse	Receiver-Operating-Characteristic-Analyse
SD	Standardabweichung
SPE	<i>Solid-Phase-Extraction</i>



## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Anordnung der Wiederholungsmessungen auf der Platte.....	31
Tabelle 2: Allgemeine Merkmale der Probanden und Patienten. ....	46
Tabelle 3: Psychologische Merkmale der Probanden und Patienten.....	49
Tabelle 4: Merkmale des metabolischen Syndroms der Probanden und Patienten. ....	53
Tabelle 5: Merkmale der Haare und Haarbehandlung der Probanden und Patienten. .	54
Tabelle 6: Auszug der Zwischensubjekteffekte der mehrfaktoriellen Varianzanalyse mit Kovariaten. ....	69



# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur von Cortisol.....	1
Abbildung 2: Schema der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (in Anlehnung an Maidana, Bruno, & Mesch, 2013). .....	2
Abbildung 3: Einflüsse auf die Einlagerung von Cortisol im Haar (in Anlehnung an Gow, Thomson, Rieder, Van Uum, & Koren, 2010). .....	5
Abbildung 4: Algorithmus bei Verdacht auf Nebenniereninsuffizienz (in Anlehnung an Michels & Michels, 2014). .....	11
Abbildung 5: Diagnostischer Algorithmus bei Verdacht auf Cushing-Syndrom (in Anlehnung an Nieman et al., 2008).....	14
Abbildung 6: Übersicht der verwendeten Methoden zur Cortisolbestimmung. ....	26
Abbildung 7: Schema der Reaktion des ELISA.....	29
Abbildung 8: Vergleich des zugesetzten und gemessenen Cortisols in Haaren. ....	30
Abbildung 9: Vergleich des zugesetzten und gemessenen Cortisols in Methanollösung. ....	31
Abbildung 10: Messvergleich bei Verwendung derselben Haarsträhne (n=13). ....	32
Abbildung 11: Messvergleich bei verschiedenen Haarsträhnen derselben Probanden (n=26).....	32
Abbildung 12: Inter-Assay-Variabilität. Zwei Strähnen derselben Probanden nach sechs Monaten (n=15). .....	34
Abbildung 13: Verteilung der Probanden und Patienten. ....	42
Abbildung 14: Verteilung der Medikation zur Hydrocortisonsubstitution. ....	43
Abbildung 15: Gesamtdosis der Hydrocortisonsubstitution pro Tag. ....	43
Abbildung 16: Verteilung der Männer und Frauen bei Probanden und Patienten.....	44
Abbildung 17: Verteilung des Alters bei Probanden und Patienten. ....	44
Abbildung 18: Hormonelle Verhütung bei gesunden Frauen. ....	45
Abbildung 19: Verteilung des STAI X1 bei Probanden und Patienten. ....	47
Abbildung 20: Verteilung des STAI X2 bei Probanden und Patienten. ....	47
Abbildung 21: Verteilung des BDI II bei Probanden und Patienten.....	48
Abbildung 22: Verteilung des BMI der Probanden und Patienten.....	50
Abbildung 23: Verteilung des Taillenumfangs der Probanden und Patienten.....	50
Abbildung 24: Verteilung des diastolischen Blutdrucks bei Probanden und Patienten. ....	52
Abbildung 25: Verteilung des systolischen Blutdrucks bei Probanden und Patienten. ....	52
Abbildung 26: Verteilung des Haarcortisols bei allen Haarproben.....	55
Abbildung 27: Verteilung des logarithmierten Haarcortisols bei allen Haarproben. ....	56
Abbildung 28: Haarcortisol bei gefärbten und ungefärbten Haaren der gesunden Probanden (ohne Ausreißer).....	57

Abbildung 29: Vergleich des Haarcortisols der Probanden und Patienten (ohne Ausreißer).....	58
Abbildung 30: Vergleich des logarithmierten Haarcortisols der Probanden und Patienten. ....	58
Abbildung 31: Zusammenhang des Haarcortisols mit dem diastolischen Blutdruck der Probanden und Patienten. ....	59
Abbildung 32: Haarcortisol der gefärbten und ungefärbten Haare bei Probanden und Patienten (ohne Ausreißer). ....	60
Abbildung 33: Zusammenhang des Haarcortisols und des STAI X1 bei Patienten mit Hydrocortisonsubstitution. ....	61
Abbildung 34: Zusammenhang des Haarcortisols und des STAI X2 bei Patienten mit Hydrocortisonsubstitution. ....	61
Abbildung 35: Zusammenhang des Haarcortisols und des BDI II bei Patienten mit Hydrocortisonsubstitution. ....	62
Abbildung 36: Zusammenhang des Haarcortisols und der Substitutionsdosis. ....	63
Abbildung 37: Zusammenhang des Haarcortisols und der Triglyceridwerte bei Patienten mit kontrolliertem Cushing-Syndrom. ....	64
Abbildung 38: Einfluss des diastolischen Blutdrucks und der Hydrocortisonsubstitution auf den Haarcortisolspiegel.....	66
Abbildung 39: Profildiagramm für Haarcortisol und natürlicher Haarfarbe mit getrennten Linien für Probanden und Patienten, Berechnung der Kovariate im Modell mit BMI = 24,21 kg/m <sup>2</sup> . ....	67
Abbildung 40: Profildiagramm für Haarcortisol und Haarfärbung mit getrennten Linien für Probanden und Patienten. Berechnung der Kovariate im Modell mit BMI = 24,21 kg/m <sup>2</sup> . ....	68
Abbildung 41: Ergebnisse der ROC Analysen: Die Achsen geben die Wahrscheinlichkeit wieder, dass Patienten mit Cushing-Syndrom von Nicht-Erkrankten unterschieden werden können. ....	70
Abbildung 42: Ergebnisse der ROC Analysen: Die Achsen geben die Wahrscheinlichkeit wieder, dass Patienten mit Hydrocortisonsubstitution von Nicht-Substituierten unterschieden werden können. ....	71
Abbildung 43: Ergebnisse der ROC Analysen: Die Achsen geben die Wahrscheinlichkeit wieder, dass Patienten mit aktivem Cushing-Syndrom von Patienten mit kontrollierter Krankheitsaktivität unterschieden werden können. ....	72
Abbildung 44: Korrelation der Cortisolspiegel der pulverisierten und der hydrolysierten Haare.....	73
Abbildung 45: Zusammenhang des gemessenen Cortisols mittels ELISA und mittels Massenspektrometrie (MPI). ....	74
Abbildung 46: Zusammenhang des gemessenen Cortisols mittels ELISA und des gemessenen Cortisols und Cortisons mittels Massenspektrometrie (MPI). ....	74
Abbildung 47: Zusammenhang des gemessenen Cortisols mittels ELISA und des gemessenen Cortisons mittels Massenspektrometrie (MPI). ....	75

Abbildung 48: Zusammenhang des gemessenen Haarcortisols mittels ELISA und mittels Massenspektrometrie (HZM). .....	76
Abbildung 49: Zusammenhang des gemessenen Cortisols mittels ELISA und des gemessenen Cortisons mittels Massenspektrometrie (HZM).....	76
Abbildung 50: Zusammenhang des gemessenen Cortisons mittels Massenspektrometrie (HZM und MPI). .....	77
Abbildung 51: Zusammenhang des gemessenen Haarcortisols mittels Massenspektrometrie (HZM und MPI). .....	77
Abbildung 52: Korrelation der Cortisolspiegel der hydrolysierten Haare und hydrolysierten Fingernägel. ....	78
Abbildung 53: Korrelation der Cortisolspiegel der pulverisierten Haare und hydrolysierten Fingernägel. ....	79
Abbildung 54: Ringversuch zwischen Max-Planck-Institut München und TU Dresden.	80



# Anlagen

1. Fragebogen über allgemeine Angaben
2. Fragebogen zu Kopfhaar und Fingernägel
3. Fragebogen STAI X1 und X2
4. Fragebogen BDI II
5. Charakteristika der Probanden und Patienten
6. Ergebnisse der Versuche zur Wiederfindung
7. Ergebnisse der Versuche zu Inter- und Intra-Assay-Variabilität
8. Ergebnisse der Versuche des Vergleichs zwischen Mahlen und Hydrolyse
9. Ergebnisse der Versuche des Vergleichs zwischen ELISA und Massenspektrometrie
10. Korrelation nach Pearson der intervallskalierten Variablen bei allen Haarproben
11. Korrelation nach Pearson der intervallskalierten Variablen bei Patienten mit Hydrocortisonsubstitution
12. Korrelation nach Pearson der intervallskalierten Variablen bei Patienten mit aktivem Cushing-Syndrom
13. Korrelation nach Pearson der intervallskalierten Variablen bei Patienten mit kontrolliertem Cushing-Syndrom
14. Korrelation nach Pearson der intervallskalierten Variablen bei gesunden Probanden
15. Korrelation nach Spearman der mindestens rangskalierten Variablen
16. Mann-Whitney-U-Test bei Variablen mit 2 Ausprägungen
17. Regressionsanalyse
18. Streumatrix aller Variablen

Allgemeine Angaben

Geschlecht weiblich \_\_\_\_\_ männlich \_\_\_\_\_ Probanden ID: \_\_\_\_\_

Geburtsdatum (Jahr) \_\_\_\_\_

**Rauchen** (Zutreffendes bitte ankreuzen)

Rauchen Sie zurzeit? ja, täglich \_\_\_\_\_ wieviel \_\_\_\_\_ /Tag  
ja, gelegentlich \_\_\_\_\_ wieviel \_\_\_\_\_ /Tag  
noch nie geraucht \_\_\_\_\_  
nein, nicht mehr \_\_\_\_\_  
Ich habe geraucht von \_\_\_\_\_ bis \_\_\_\_\_  
wieviel \_\_\_\_\_ /Tag

**Medikamente** (Zutreffendes bitte ankreuzen)

Nehmen sie regelmäßig Medikamente/Nahrungsergänzungsmittel?

nein \_\_\_\_\_ ja \_\_\_\_\_

falls ja, welche?

---



---

Wie oft haben Sie **Alkohol** getrunken in den letzten drei Monaten?

Weniger als 1x/Monat \_\_\_\_\_ 1-2x/Monat \_\_\_\_\_ 1-2x/Woche\_\_ 1x/Tag \_\_\_\_\_ Öfter \_\_\_\_\_

Wenn Sie Alkohol getrunken haben, wie viel trinken Sie meistens davon? \_\_\_\_\_

Wenn Sie Alkohol getrunken haben, was trinken Sie meistens davon? \_\_\_\_\_

Wie oft haben Sie **Kaffee** getrunken in den letzten drei Monaten?

Weniger als 1x/Monat \_\_\_\_\_ 1-2x/Monat \_\_\_\_\_ 1-2x/Woche\_\_ 1x/Tag \_\_\_\_\_ Öfter \_\_\_\_\_

Wenn Sie Kaffee getrunken haben, wie viele Tassen trinken Sie meistens? \_\_\_\_\_

Haben Sie in den letzten drei Monaten eine für Sie **belastende Lebenserfahrung** gemacht? (Tod eines nahen

Verwandten, schwere Erkrankung, Trennung o.ä.) nein \_\_\_\_\_ ja (welche?) \_\_\_\_\_

*Nur von weiblichen Probanden zu beantworten:*

Nehmen Sie die "Pille" oder ein anderes hormonelles Verhütungsmittel?

nein \_\_\_\_\_ ja, welche (Name?) \_\_\_\_\_

Ist der Zyklus regelmäßig (alle 23-35 Tage)? nein \_\_\_\_\_ ja \_\_\_\_\_

Sind Sie postmenopausal? nein \_\_\_\_\_ ja \_\_\_\_\_

Sind Sie schwanger? nein \_\_\_\_\_ ja \_\_\_\_\_

Angaben zur Analyse von Kopfhaar und Fingernägel

**Haarprobe** (Zutreffendes bitte ankreuzen)

Natürliche Haarfarbe \_\_\_\_\_

Natürliche Locken/Wellung      nein \_\_\_\_\_ ja \_\_\_\_\_

Anzahl Haarwäsche pro Woche \_\_\_\_\_

Haarbehandlungen in den vergangenen 3 Monaten:

Tönung                      nein \_\_\_\_\_ ja \_\_\_\_\_

Färbung/Blondierung              nein \_\_\_\_\_ ja \_\_\_\_\_

Dauerwelle                      nein \_\_\_\_\_ ja \_\_\_\_\_

Glätteisen                      nein \_\_\_\_\_ ja \_\_\_\_\_

andere                      nein \_\_\_\_\_ ja (welche?) \_\_\_\_\_

**Fingernagelprobe** (Zutreffendes bitte ankreuzen)

Hand rechts:      Daumen \_\_\_\_\_ Zeigefinger \_\_\_\_\_ Mittelfinger \_\_\_\_\_ Ringfinger \_\_\_\_\_ kleiner Finger \_\_\_\_\_

Hand links:      Daumen \_\_\_\_\_ Zeigefinger \_\_\_\_\_ Mittelfinger \_\_\_\_\_ Ringfinger \_\_\_\_\_ kleiner Finger \_\_\_\_\_

Nagelbehandlungen in den vergangenen 3 Monaten:

Nagellack + Nagellackentferner              nein \_\_\_\_\_ ja \_\_\_\_\_

Auffüllen/Naturnagelverstärkung              nein \_\_\_\_\_ ja \_\_\_\_\_

andere                      nein \_\_\_\_\_ ja (welche?) \_\_\_\_\_

## Fragebogen zu Selbstbeschreibung

## STAI Form X1

<p><b>Anleitung:</b> Im folgenden Fragebogen finden Sie eine Reihe von Feststellungen, mit denen man sich selbst beschreiben kann. Bitte lesen Sie jede Feststellung durch und wählen Sie aus den vier Antworten diejenige aus, die angibt, wie Sie sich <b>jetzt, d.h. in diesem Moment</b>, fühlen. Kreuzen Sie bitte bei jeder Feststellung die Zahl unter der von Ihnen gewählten Antwort an.</p> <p>Es gibt keine richtigen oder falschen Antworten. Überlegen Sie bitte nicht lange und denken Sie daran, diejenige Antwort auszuwählen, die Ihren <b>augenblicklichen</b> Gefühlszustand am besten beschreibt.</p>	OBERHAUPT NICHT	EIN WENIG	ZIEMLICH	SEHR
1. Ich bin ruhig	1	2	3	4
2. Ich fühle mich geborgen	1	2	3	4
3. Ich fühle mich angespannt	1	2	3	4
4. Ich bin bekümmert	1	2	3	4
5. Ich bin gelöst	1	2	3	4
6. Ich bin aufgeregt	1	2	3	4
7. Ich bin besorgt, daß etwas schiefgehen könnte	1	2	3	4
8. Ich fühle mich ausgeruht	1	2	3	4
9. Ich bin beunruhigt	1	2	3	4
10. Ich fühle mich wohl	1	2	3	4
11. Ich fühle mich selbstsicher	1	2	3	4
12. Ich bin nervös	1	2	3	4
13. Ich bin zappelig	1	2	3	4
14. Ich bin verkrampft	1	2	3	4
15. Ich bin entspannt	1	2	3	4
16. Ich bin zufrieden	1	2	3	4
17. Ich bin besorgt	1	2	3	4
18. Ich bin überreizt	1	2	3	4
19. Ich bin froh	1	2	3	4
20. Ich bin vergnügt	1	2	3	4
Bitte prüfen Sie, ob Sie alle Feststellungen zutreffend beantwortet haben!				

## Fragebogen zu Selbstbeschreibung

## STAI Form X2

<p><b>Anleitung:</b> Im folgenden Fragebogen finden Sie eine Reihe von Feststellungen, mit denen man sich selbst beschreiben kann. Bitte lesen Sie jede Feststellung durch und wählen Sie aus den vier Antworten diejenige aus, die angibt, wie Sie sich <b>im allgemeinen</b> fühlen. Kreuzen Sie bitte bei jeder Feststellung die Zahl unter der von Ihnen gewählten Antwort an. Es gibt keine richtigen oder falschen Antworten. Überlegen Sie bitte nicht lange und denken Sie daran, diejenige Antwort auszuwählen, die am besten beschreibt, wie Sie sich <b>im allgemeinen</b> fühlen.</p>	FAST NIE	MANCHMAL	OFT	FAST IMMER
21. Ich bin vergnügt	1	2	3	4
22. Ich werde schnell müde	1	2	3	4
23. Mir ist zum Weinen zumute	1	2	3	4
24. Ich glaube, mir geht es schlechter als anderen Leuten	1	2	3	4
25. Ich verpasse günstige Gelegenheiten, weil ich mich nicht schnell genug entscheiden kann	1	2	3	4
26. Ich fühle mich ausgeruht	1	2	3	4
27. Ich bin ruhig und gelassen	1	2	3	4
28. Ich glaube, daß mir meine Schwierigkeiten über den Kopf wachsen	1	2	3	4
29. Ich mache mir zuviel Gedanken über unwichtige Dinge	1	2	3	4
30. Ich bin glücklich	1	2	3	4
31. Ich neige dazu, alles schwer zu nehmen	1	2	3	4
32. Mir fehlt es an Selbstvertrauen	1	2	3	4
33. Ich fühle mich geborgen	1	2	3	4
34. Ich mache mir Sorgen über mögliches Mißgeschick	1	2	3	4
35. Ich fühle mich niedergeschlagen	1	2	3	4
36. Ich bin zufrieden	1	2	3	4
37. Unwichtige Gedanken gehen mir durch den Kopf und bedrücken mich	1	2	3	4
38. Enttäuschungen nehme ich so schwer, daß ich sie nicht vergessen kann	1	2	3	4
39. Ich bin ausgeglichen	1	2	3	4
40. Ich werde nervös und unruhig, wenn ich an meine derzeitigen Angelegenheiten denke	1	2	3	4
Bitte prüfen Sie, ob Sie alle Feststellungen zutreffend beantwortet haben!				

## BDI II

ID NR

Alter

Geschlecht

m / w

Datum

**Anleitung:** Dieser Fragebogen enthält 21 Gruppen von Aussagen. Bitte lesen Sie jede dieser Gruppen von Aussagen sorgfältig durch und suchen Sie sich dann in jeder Gruppe **eine Aussage** heraus, die am be-sten beschreibt, wie Sie sich in **den letzten zwei Wochen, einschließlich heute, gefühlt haben**. Kreuzen Sie die Zahl neben der Aussage an, die Sie sich herausgesucht haben (0, 1, 2 oder 3). Falls in einer Gruppe mehrere Aussagen gleichermaßen auf Sie zutreffen, kreuzen Sie die Aussage mit der höheren Zahl an. Achten Sie bitte darauf, dass Sie in jeder Gruppe nicht mehr als eine Aussage ankreuzen, das gilt auch für Gruppe 16 (Veränderung der Schlafgewohnheiten) oder Gruppe 18 (Veränderungen des Appetits).

**1. Traurigkeit**

- 0 Ich bin nicht traurig
- 1 Ich bin oft traurig
- 2 Ich bin ständig traurig
- 3 Ich bin so traurig oder unglücklich, dass ich es nicht aushalte

**2. Pessimismus**

- 0 Ich sehe nicht mutlos in die Zukunft
- 1 Ich sehe mutloser in die Zukunft als sonst
- 2 Ich bin mutlos und erwarte nicht, dass meine Situation besser wird
- 3 Ich glaube, dass meine Zukunft hoffnungslos ist und nur noch schlechter wird

**3. Versagensgefühle**

- 0 Ich fühle mich nicht als Versager
- 1 Ich habe häufiger Versagensgefühle
- 2 Wenn ich zurückblicke, sehe ich eine Menge Fehlschläge
- 3 Ich habe das Gefühl, als Mensch ein völliger Versager zu sein

**4. Verlust von Freude**

- 0 Ich kann die Dinge genauso gut genießen wie früher
- 1 Ich kann die Dinge nicht mehr so genießen wie früher
- 2 Dinge, die mir früher Freude gemacht haben, kann ich kaum mehr genießen
- 3 Dinge, die mir früher Freude gemacht haben, kann ich überhaupt nicht mehr genießen

**5. Schuldgefühle**

- 0 Ich habe keine besonderen Schuldgefühle
- 1 Ich habe oft Schuldgefühle wegen Dingen, die ich getan habe oder hätte tun sollen
- 2 Ich habe die meiste Zeit Schuldgefühle
- 3 Ich habe ständig Schuldgefühle

**6. Bestrafungsgefühle**

- 0 Ich habe nicht das Gefühl, für etwas bestraft zu sein
- 1 Ich habe das Gefühl vielleicht bestraft zu werden
- 2 Ich erwarte, bestraft zu werden
- 3 Ich habe das Gefühl, bestraft zu sein

**7. Selbstablehnung**

- 0 Ich halte von mir genauso viel wie immer
- 1 Ich habe Vertrauen in mich verloren
- 2 Ich bin von mir enttäuscht
- 3 Ich lehne mich völlig ab

**8. Selbstvorwürfe**

- 0 Ich kritisiere oder tadle mich nicht mehr als sonst
- 1 Ich bin mir gegenüber kritischer als sonst
- 2 Ich kritisiere mich für all meine Mängel
- 3 Ich gebe mir die Schuld für alles Schlimme, was passiert

**9. Selbstmordgedanken**

- 0 Ich denke nicht daran, mir etwas anzutun
- 1 Ich denke manchmal an Selbstmord, aber ich würde es nicht tun
- 2 Ich möchte mich am liebsten umbringen
- 3 Ich würde mich umbringen, wenn ich die Gelegenheit dazu hätte

**10. Weinen**

- 0 Ich weine nicht öfter als früher
- 1 Ich weine jetzt mehr als früher
- 2 Ich weine beim geringsten Anlass
- 3 Ich möchte gern weinen, aber ich kann nicht


 Bitte wenden

**11. Unruhe**

- 0 Ich bin nicht unruhiger als sonst
- 1 Ich bin unruhiger als sonst
- 2 Ich bin so unruhig, dass es mir schwer fällt, stillzusitzen
- 3 Ich bin so unruhig, dass ich mich ständig bewegen oder etwas tun muss

**12. Interessenverlust**

- 0 Ich habe das Interesse an anderen Menschen oder an Tätigkeiten nicht verloren
- 1 Ich habe weniger Interesse an anderen Menschen oder an Dingen als sonst
- 2 Ich habe das Interesse an anderen Menschen oder an Dingen zum größten Teil verloren
- 3 Es fällt mir schwer, mich überhaupt für irgend etwas zu interessieren

**13. Entschlussunfähigkeit**

- 0 Ich bin so entschlossen wie immer
- 1 Es fällt mir schwerer als sonst, Entscheidungen zu treffen
- 2 Ich habe viel größere Schwierigkeiten als sonst Entscheidungen zu treffen
- 3 Ich habe Mühe, überhaupt Entscheidungen zu treffen

**14. Wertlosigkeit**

- 0 Ich fühle mich nicht wertlos
- 1 Ich halte mich für weniger wertvoll und nützlich als sonst
- 2 Verglichen mit andern Menschen fühle ich mich viel weniger wert
- 3 Ich fühle mich völlig wertlos

**15. Energieverlust**

- 0 Ich habe so viel Energie wie immer
- 1 Ich habe weniger Energie als sonst
- 2 Ich habe so wenig Energie, dass ich kaum noch etwas schaffe
- 3 Ich habe keine Energie mehr, um überhaupt noch etwas zu tun

**16. Veränderungen der Schlafgewohnheiten**

- 0 Meine Schlafgewohnheiten haben sich nicht verändert
- 1a Ich schlafe etwas mehr als sonst
- 1b Ich schlafe etwas weniger als sonst
- 2a Ich schlafe viel mehr als sonst
- 2b Ich schlafe viel weniger als sonst
- 3a Ich schlafe fast den ganzen Tag
- 3b Ich wache 1-2 Stunden früher auf als gewöhnlich und kann dann nicht mehr einschlafen

**17. Reizbarkeit**

- 0 Ich bin nicht reizbarer als sonst
- 1 Ich bin reizbarer als sonst
- 2 Ich bin viel reizbarer als sonst
- 3 Ich fühle mich dauernd gereizt

**18. Veränderungen des Appetits**

- 0 Mein Appetit hat sich nicht verändert
- 1a Mein Appetit ist etwas schlechter als sonst
- 1b Mein Appetit ist etwas größer als sonst
- 2a Mein Appetit ist viel schlechter als sonst
- 2b Mein Appetit ist viel größer als sonst
- 3a Ich habe überhaupt keinen Appetit
- 3b Ich habe ständig Heißhunger

**19. Konzentrationsschwierigkeiten**

- 0 Ich kann mich so gut konzentrieren wie immer
- 1 Ich kann mich nicht mehr so gut konzentrieren wie sonst
- 2 Es fällt mir schwer, mich längere Zeit auf irgend etwas zu konzentrieren
- 3 Ich kann mich überhaupt nicht mehr konzentrieren

**20. Ermüdung oder Erschöpfung**

- 0 Ich fühle mich nicht müder oder erschöpfter als sonst
- 1 Ich werde schneller müde oder erschöpft als sonst
- 2 Für viele Dinge, die ich üblicherweise tue, bin ich zu müde oder erschöpft
- 3 Ich bin so müde oder erschöpft, dass ich fast nichts mehr tun kann

**21. Verlust an sexuellem Interesse**

- 0 Mein Interesse an Sexualität hat sich in letzter Zeit nicht verändert
- 1 Ich interessiere mich weniger für Sexualität als früher
- 2 Ich interessiere mich jetzt viel weniger für Sexualität
- 3 Ich habe das Interesse an Sexualität völlig verloren

Summe Seite 1:

Summe Seite 2:

Gesamt Seite 1 + 2:

## Charakteristika der Probanden und Patienten

ID	Haarcortisol [pg/mg]	Alter bei Haarprobe	BMI [kg/m2]	Blutdruck systolisch [mmHg]	Blutdruck diastolisch [mmHg]	Tailenumfang [cm]	Geschlecht m=1, f=2	Rauchen aktuell ( $\geq 15$ Zig/Monat=1, $<15=0$ )	Alkohol ( $\leq 7$ d/Monat=0, $>7$ d/Monat=1)	Belastende Lebenserfahrung nein=0, ja=1	hormonelle Verhütung nein=0, ja=1	natürliche Haarfarbe: hell=0, dunkler=1	Locken ja=1, nein=0	Haarwäschen pro Woche ( $>4=1, \leq 4=0$ )	Tönung	Färbung	Haarbehandlung (Dauerwelle, Aufhellung)	STAI X1	STAI X2	BDI II	Skala Stresswahrnehmung	gesund=0 Cortisonsubstitution=1 CS kontrolliert=2 CS aktiv=3	Ätiologie 1=hypophysär, 2=adrenal, 3=ektop	Hydrocortison=1 Plenadren=2	Dosis/Tag [mg]	Triglyceride [mg/dl]	gGT [U/l]	HbA1c [%]
1	13	22	25	120	70	79	2	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	27	64	23	26	0	0					
2	15	25	25	120	80	80	2	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	33	33	7	9	0	0					
3	30	21	21	115	60	67	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	32	31	1	12	0	0					
4	17	25	18	120	75	62	2	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	33	29	5	10	0	0					
5	18	20	20	125	75	69	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	38	41	7	18	0	0					
6	15	20	21	90	65	69	2	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	28	40	9	16	0	0					
7	31	47	36	130	75	101	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	25	35	9	14	0	0					
8	38	23	20	95	65	71	2	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	31	51	7	19	0	0					
9	13	29	19	115	65	65	2	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	39	31	2	8	0	0					
10	36	24	24	95	65	71	2	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	35	36	10	25	0	0					
11	33	22	20	110	75	65	2	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	30	30	2	6	0	0					
12	25	24	20	130	90	69	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	50	43	13	14	0	0					
13	9	32	21	105	70	71	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34	28	3	9	0	0					
14	12	26	23	110	70	81	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	30	32	4	12	0	0					
15	13	24	28	120	70	94	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	30	24	3	13	0	0					
16	17	60	28	140	90	105	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	37	44	10	15	0	0					
17	13	56	29	150	105	106	2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	25	27	0	11	0	0					
18	13	30	21	130	80	74	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	20	22	0	11	0	0					
19	14	27	21	120	70	73	2	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	24	23	0	3	0	0					
20	59	32	20	140	90	70	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	26	21	0	0	0	0					
21	6	20	26	115	75	81	2	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	35	49	13	23	0	0					
22	8	21	23	110	80	76	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	43	43	9	17	0	0					
23	11	29	22	110	75	67	2	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	35	40	6	30	0	0					
24	9	25	22	120	65	72	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	39	42	7	13	0	0					
25	21	22	21	100	65	72	2	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	29	29	2	9	0	0					
26	9	26	26	105	55	90	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	22	24	0	3	0	0					
27	10	24	22	115	60	70	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	38	32	9	15	0	0					
28	9	24	27	110	60	78	2	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	42	38	14	13	0	0					
29	31	30	20	115	70	66	2	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	36	33	0	17	0	0					
30	9	21	19	110	80	65	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	35	39	1	7	0	0					
31	7	48	20	125	80	69	2	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	34	35	9	19	0	0					
32	8	27	32	100	75	106	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	35	41	12	17	0	0					
33	7	27	20	120	75	64	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	34	33	3	12	0	0					
34	15	37	30	115	75	90	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	43	44	19	23	0	0					
35	9	30	35	125	70	112	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26	40	15	6	0	0					
36	18	21	23	125	70	85	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	31	33	3	12	0	0					
37	18	55	20	115	80	65	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	37	28	1	8	0	0					
38	17	29	26	110	80	77	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	32	46	4	14	0	0					
39	23	21	25	100	70	75	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	54	53	20	21	0	0					
40	5	28	26	120	80	85	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	40	39	5	12	0	0					
41	7	26	20	125	80	73	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	41	44	8	19	0	0					
42	9	48	27	120	75	98	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	32	28	0	8	0	0					
43	3	39	29	115	80	98	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	45	39	3	14	0	0					
44	5	37	22	120	90	81	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	35	30	3	12	0	0					
45	53	49	32	130	80	113	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	50	43	5	20	0	0					

# Anlagen

---

46	67	40	28	120	90	95	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	20	21	0	2	0	0	
47	8	60	27	85	70	96	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	32	25	0	7	0	0	
48	7	63	21	135	80	82	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	37	28	1	5	0	0	
49	44	23	18	110	80	68	2	0	0	0	1	0	0	1	0	0	29	32	4	10	0	0	
50	69	28	26	125	70	89	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	28	26	6	4	0	0	
51	16	31	23	125	80	83	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	36	39	2	9	0	0	
52	10	30	25	115	75	89	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	21	30	3	7	0	0	
53	19	31	20	115	75	65	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	36	29	0	13	0	0	
54	11	27	18	115	75	72	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	40	47	9	13	0	0	
55	21	22	20	115	75	68	2	0	0	0	0	0	1	1	0	0	41	57	17	19	0	0	
56	71	22	20	115	85	71	2	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	38	33	5	11	0	0
57	14	23	19	110	75	69	2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	30	31	1	7	0	0
58	9	22	19	110	70	62	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	26	24	1	8	0	0	
59	20	51	23	110	80	80	2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	22	28	1	6	0	0	
60	35	50	40	150	90	121	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	23	21	0	1	0	0	
61	17	50	24	130	90	91	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	45	37	10	16	0	0	
62	18	22	20	115	80	69	2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	36	35	4	7	0	0	
63	13	45	23	125	80	86	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	27	38	2	12	0	0	
64	30	28	29	160	90	106	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	41	42	6	11	0	0	
65	59	41	23	95	70	77	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	34	42	3	20	0	0	
66	2	21	20	105	75	65	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	31	31	7	11	0	0	
67	4	25	20	115	65	69	2	1	0	0	0	1	1	0	0	1	26	25	3	15	0	0	
68	3	26	21	105	65	68	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	33	29	3	15	0	0	
69	13	25	23	125	80	82	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	31	45	2	12	0	0	
70	16	27	23	125	87	81	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	57	53	13	18	0	0	
71	14	25	24	125	85	69	2	0	0	0	1	1	0	1	0	0	23	25	1	7	0	0	
72	36	26	20	115	75	67	2	0	0	1	1	0	0	1	0	0	43	38	1	15	0	0	
73	5	23	20	105	70	66	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	29	41	4	20	0	0	
74	3	21	22	105	65	73	2	0	0	0	1	0	0	1	1	0	32	34	6	12	0	0	
75	11	25	21	125	80	69	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	22	30	4	8	0	0	
76	8	28	24	135	75	90	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	23	27	0	1	0	0	
77	25	23	24	130	80	84	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	38	40	5	18	0	0	
78	19	27	21	105	65	64	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	46	44	12	21	0	0	
79	18	22	19	110	75	69	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	32	26	0	7	0	0	
80	12	20	24	125	70	79	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	37	5	10	0	0	
81	11	44	27	125	75	77	2	0	0	0	0	1	1	1	0	0	31	32	5	17	0	0	
82	10	24	20	105	75	65	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	41	38	3	12	0	0	
83	17	30	22	105	70	70	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	33	35	5	16	0	0	
84	5	24	23	95	65	71	2	0	0	0	0	0	1	1	0	1	43	34	9	13	0	0	
85	5	24	23	105	75	67	2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	23	32	4	19	0	0	
86	8	24	24	95	65	71	2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	35	46	13	24	0	0	
87	8	23	19	120	70	65	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28	33	14	10	0	0	
88	18	21	20	95	60	64	2	1	1	0	0	1	0	0	0	0	42	24	0	6	0	0	
89	8	25	18	110	55	67	2	0	0	0	1	0	0	0	0	1	33	35	3	9	0	0	
90	9	27	19	105	65	63	2	0	0	1	0	1	1	0	1	1	33	42	5	16	0	0	
91	14	29	21	110	70	69	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	33	31	4	16	0	0	
92	7	23	19	125	80	65	2	0	0	1	1	1	1	0	1	1	32	32	2	9	0	0	
93	13	29	26	110	65	87	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	34	30	3	6	0	0	
94	6	27	17	95	60	57	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28	30	4	9	0	0	
95	8	26	21	125	80	65	2	0	0	1	0	1	0	0	0	1	55	47	12	28	0	0	
96	12	63	34	130	85	104	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	31	34	6	11	0	0	
97	17	25	24	115	75	66	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	46	44	5	15	0	0	
98	23	32	22	115	75	71	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	31	37	5	11	0	0	
99	23	20	22	95	55	70	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	49	49	11	15	0	0	
100	7	19	19	115	75	70	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	34	1	17	0	0	
101	5	28	19	130	80	68	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	30	28	2	7	0	0	
102	5	27	27	140	100	70	2	0	0	0	0	1	1	0	0	1	31	35	4	13	0	0	
103	11	25	22	125	70	80	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	22	30	3	8	0	0	
104	29	23	20	115	65	60	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	32	37	6	15	0	0	
105	10	20	18	115	80	56	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	41	26	0	5	0	0	





## Ergebnisse der Versuche zu Inter- und Intra-Assay-Variabilität

ID	Cortisol		Cortisol		Vergleich
	Messdatum	pg/mg Haar	Messdatum	pg/mg Haar	
49	29.02.16	44,9	03.08.16	29,3	selber Proband
50	29.02.16	69,1	03.08.16	53,6	selber Proband
60	29.02.16	35,2	03.08.16	37,3	selber Proband
65	29.02.16	59,7	03.08.16	18,5	selber Proband
69	29.02.16	13,2	03.08.16	19,8	selber Proband
71	29.02.16	14,9	03.08.16	18,8	selber Proband
73	29.02.16	5,4	03.08.16	22,4	selber Proband
74	29.02.16	3,9	03.08.16	23,5	selber Proband
76	29.02.16	8,3	03.08.16	17,6	selber Proband
77	29.02.16	25,4	03.08.16	24,0	selber Proband
91	07.03.16	14,2	03.08.16	17,8	selber Proband
96	07.03.16	12,9	03.08.16	26,4	selber Proband
101	22.03.16	5,5	03.08.16	16,0	selber Proband
13	06.04.16	10,0	03.08.16	18,8	selber Proband
16	06.04.16	17,3	03.08.16	18,2	selber Proband
22	06.04.16	8,0	03.08.16	17,0	selber Proband
55	29.02.16	21,8	14.10.16	3,0	selber Proband
66	29.02.16	2,7	14.10.16	3,0	selber Proband
80	22.03.16	12,9	14.10.16	2,9	selber Proband
87	07.03.16	8,5	14.10.16	2,5	selber Proband
88	07.03.16	18,5	14.10.16	3,2	selber Proband
92	07.03.16	7,4	14.10.16	5,6	selber Proband
107	22.03.16	17,6	14.10.16	2,8	selber Proband
108	22.03.16	24,2	14.10.16	2,9	selber Proband
109	22.03.16	16,5	14.10.16	3,6	selber Proband
9	06.04.16	13,9	14.10.16	3,5	selber Proband
85	07.03.16	5,8	22.03.16	5,2	selbe Strähne
86	22.03.16	19,3	06.04.16	8,9	selbe Strähne
98	07.03.16	23,2	22.03.16	7,1	selbe Strähne
110	06.04.16	27,3	21.04.16	40,1	selbe Strähne
179	06.04.16	16,4	21.04.16	17,8	selbe Strähne
1	06.04.16	13,5	21.04.16	17,2	selbe Strähne
2	06.04.16	15,6	21.04.16	18,4	selbe Strähne
3	06.04.16	30,7	21.04.16	36,2	selbe Strähne
4	06.04.16	17,3	21.04.16	18,5	selbe Strähne
5	06.04.16	18,5	21.04.16	20,1	selbe Strähne
6	06.04.16	15,5	21.04.16	18,3	selbe Strähne
7	06.04.16	32,2	21.04.16	36,2	selbe Strähne
8	06.04.16	39,7	21.04.16	53,1	selbe Strähne
54	29.02.16	11,4	17.10.16	1,9	anderes Protokoll
57	29.02.16	14,3	17.10.16	1,6	anderes Protokoll
63	29.02.16	13,7	17.10.16	1,6	anderes Protokoll
67	29.02.16	4,3	17.10.16	1,2	anderes Protokoll
68	07.04.16	3,9	17.10.16	0,7	anderes Protokoll
82	07.03.16	10,5	17.10.16	1,4	anderes Protokoll
84	07.03.16	6,0	17.10.16	0,6	anderes Protokoll
85	07.03.16	5,8	17.10.16	0,8	anderes Protokoll
86	22.03.16	19,3	17.10.16	0,7	anderes Protokoll
89	07.03.16	8,6	17.10.16	3,5	anderes Protokoll
93	07.03.16	13,3	17.10.16	0,9	anderes Protokoll
95	07.03.16	8,2	17.10.16	1,3	anderes Protokoll
105	22.03.16	10,2	17.10.16	0,2	anderes Protokoll
5	06.04.16	18,4	17.10.16	1,5	anderes Protokoll

## Anlagen

7	06.04.16	31,9	17.10.16	1,7	anderes Protokoll
54	01.09.16	3,20	17.10.16	1,9	anderes Labor
57	01.09.16	4,29	17.10.16	1,6	anderes Labor
63	01.09.16	4,03	17.10.16	1,6	anderes Labor
67	01.09.16	3,40	17.10.16	1,2	anderes Labor
68	01.09.16	2,24	17.10.16	0,7	anderes Labor
82	01.09.16	7,79	17.10.16	1,4	anderes Labor
84	01.09.16	1,64	17.10.16	0,6	anderes Labor
85	01.09.16	2,30	17.10.16	0,8	anderes Labor
86	01.09.16	2,23	17.10.16	0,7	anderes Labor
89	01.09.16	20,80	17.10.16	3,5	anderes Labor
93	01.09.16	8,53	17.10.16	0,9	anderes Labor
95	01.09.16	1,91	17.10.16	1,3	anderes Labor
105	01.09.16	2,39	17.10.16	0,2	anderes Labor
5	01.09.16	4,27	17.10.16	1,5	anderes Labor
7	01.09.16	3,85	17.10.16	1,7	anderes Labor

## Ergebnisse der Versuche des Vergleichs zwischen Mahlen und Hydrolyse

ID	Cortisol pg/mg	Cortisol pg/mg	Cortisol pg/mg
	pulverisiertes Haar	hydrolysiertes Haar	
49	29,3	15,9	2,8
50	53,6	10,3	
60	37,3	12,4	4,2
65	18,5	15,5	
69	19,8	9,4	
71	18,8	13,6	
73	22,4	16,9	2,9
74	23,5	31,0	
76	17,6	22,1	
77	24,0	6,9	
91	17,8	10,5	
96	26,4	34,0	
101	16,0	10,8	3,9
13	18,8	18,8	6,4
16	18,2	9,2	
22	17,0	12,5	

## Ergebnisse der Versuche des Vergleichs zwischen ELISA und Massenspektrometrie

Probe	Cortisol	Cortisol	Cortison	Cortisol	Cortison
	pg/mg Haar (ELISA)	pg/mg Haar (MS MPI)	pg/mg Haar (MS MPI)	pg/mg Haar (MS HZM)	pg/mg Haar (MS HZM)
1	20	7	14	15	11
2	14	2	4		5
3	21	17	6		6
4	7	2	3		2
5		234	6	301	4
6	22	12	16	54	19
7	8	3	7		6
8	15	8	18		18
9	60	51	54	67	60
10	17	15	13	190	16

## Korrelationen nach Pearson der intervallskalierten Variablen bei allen Haarproben

		Haarcortisol [pg/mg]	Log. Haarcortisol	Alter bei Haarprobe	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	Blutdruck systolisch [mmHg]	Blutdruck diastolisch [mmHg]	Taillenumfang [cm]	Dosis/Tag [mg]	Triglyceride [mg/dl]	gGT [U/l]	HbA1c [%]
Haarcortisol [pg/mg]	r	1	0,769	-0,02	-0,04	-0,113	-0,167	0,01	0,097	0,164	0,008	-0,211
	p		0	0,781	0,639	0,133	0,027	0,898	0,562	0,227	0,948	0,122
	N	177	177	177	176	177	177	170	38	56	65	55
Log. Haarcortisol	r	0,769	1	-0,01	-0,04	-0,057	-0,108	0,047	0,284	0,145	0,091	-0,122
	p	0		0,896	0,576	0,451	0,152	0,541	0,084	0,286	0,47	0,374
	N	177	177	177	176	177	177	170	38	56	65	55
Alter bei Haarprobe	r	-0,021	-0,01	1	0,359	0,526	0,53	0,451	-0,108	0,202	0,029	0,424
	p	0,781	0,896		0	0	0	0	0,517	0,135	0,817	0,001
	N	177	177	177	176	177	177	170	38	56	65	55
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	r	-0,036	-0,042	0,359	1	0,504	0,426	0,785	-0,045	0,206	0,212	0,233
	p	0,639	0,576	0		0	0	0	0,791	0,131	0,092	0,09
	N	176	176	176	176	176	176	170	37	55	64	54
Blutdruck systolisch [mmHg]	r	-0,113	-0,057	0,526	0,504	1	0,781	0,532	-0,124	0,05	0,098	0,28
	p	0,133	0,451	0	0		0	0	0,46	0,716	0,44	0,038
	N	177	177	177	176	177	177	170	38	56	65	55
Blutdruck diastolisch [mmHg]	r	-0,167	-0,108	0,53	0,426	0,781	1	0,493	-0,18	0,089	0,142	0,209
	p	0,027	0,152	0	0	0		0	0,281	0,512	0,259	0,125
	N	177	177	177	176	177	177	170	38	56	65	55
Taillen- umfang [cm]	r	0,01	0,047	0,451	0,785	0,532	0,493	1	0,082	0,164	0,171	0,138
	p	0,898	0,541	0	0	0	0		0,643	0,26	0,198	0,349
	N	170	170	170	170	170	170	170	34	49	58	48
Dosis/Tag [mg]	r	0,097	0,284	-0,11	-0,05	-0,124	-0,18	0,082	1	0,045	0,688	0,038
	p	0,562	0,084	0,517	0,791	0,46	0,281	0,643		0,809	0	0,843
	N	38	38	38	37	38	38	34	38	32	37	29
Triglyceride [mg/dl]	r	0,164	0,145	0,202	0,206	0,05	0,089	0,164	0,045	1	0,323	0,207
	p	0,227	0,286	0,135	0,131	0,716	0,512	0,26	0,809		0,015	0,153
	N	56	56	56	55	56	56	49	32	56	56	49
gGT [U/l]	r	0,008	0,091	0,029	0,212	0,098	0,142	0,171	0,688	0,323	1	0,207
	p	0,948	0,47	0,817	0,092	0,44	0,259	0,198	0	0,015		0,129
	N	65	65	65	64	65	65	58	37	56	65	55
HbA1c [%]	r	-0,211	-0,122	0,424	0,233	0,28	0,209	0,138	0,038	0,207	0,207	1
	p	0,122	0,374	0,001	0,09	0,038	0,125	0,349	0,843	0,153	0,129	
	N	55	55	55	54	55	55	48	29	49	55	55

r = Korrelationskoeffizient nach Pearson

p = Signifikanz (2-seitig)

N = Anzahl

### Korrelation nach Pearson der intervallskalierten Variablen bei Patienten mit Hydrocortisonsubstitution

		Haarcortisol [pg/mg]	Log. Haarcortisol	Alter bei Haarprobe	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	Blutdruck systolisch [mmHg]	Blutdruck diastolisch [mmHg]	Tailenumfa ng [cm]	Dosis/Tag [mg]	Triglyceride [mg/dl]	gGT [U/l]	HbA1c [%]
Haarcortisol [pg/mg]	r	1	0,833	-0,274	-0,156	-0,336	-0,479	-0,161	0,097	0,177	0,045	-0,225
	p		0	0,096	0,357	0,039	0,002	0,364	0,562	0,332	0,791	0,242
	N	38	38	38	37	38	38	34	38	32	37	29
Log. Haarcortisol	r	0,833	1	-0,2	-0,178	-0,277	-0,391	-0,114	0,284	0,205	0,176	-0,145
	p	0		0,229	0,291	0,092	0,015	0,523	0,084	0,259	0,297	0,454
	N	38	38	38	37	38	38	34	38	32	37	29
Alter bei Haarprobe	r	-0,274	-0,2	1	0,217	0,502	0,482	0,408	-0,108	0,141	-0,068	0,556
	p	0,096	0,229		0,198	0,001	0,002	0,017	0,517	0,44	0,691	0,002
	N	38	38	38	37	38	38	34	38	32	37	29
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	r	-0,156	-0,178	0,217	1	0,48	0,388	0,893	-0,045	0,292	0,225	0,193
	p	0,357	0,291	0,198		0,003	0,018	0	0,791	0,11	0,187	0,326
	N	37	37	37	37	37	37	34	37	31	36	28
Blutdruck systolisch [mmHg]	r	-0,336	-0,277	0,502	0,48	1	0,731	0,602	-0,124	0,087	-0,002	0,215
	p	0,039	0,092	0,001	0,003		0	0	0,46	0,635	0,991	0,263
	N	38	38	38	37	38	38	34	38	32	37	29
Blutdruck diastolisch [mmHg]	r	-0,479	-0,391	0,482	0,388	0,731	1	0,513	-0,18	0,093	0,022	0,192
	p	0,002	0,015	0,002	0,018	0		0,002	0,281	0,613	0,899	0,319
	N	38	38	38	37	38	38	34	38	32	37	29
Tailen- umfang [cm]	r	-0,161	-0,114	0,408	0,893	0,602	0,513	1	0,082	0,434	0,237	0,355
	p	0,364	0,523	0,017	0	0	0,002		0,643	0,021	0,184	0,081
	N	34	34	34	34	34	34	34	34	28	33	25
Dosis/Tag [mg]	r	0,097	0,284	-0,108	-0,045	-0,124	-0,18	0,082	1	0,045	0,688	0,038
	p	0,562	0,084	0,517	0,791	0,46	0,281	0,643		0,809	0	0,843
	N	38	38	38	37	38	38	34	38	32	37	29
Triglyceride [mg/dl]	r	0,177	0,205	0,141	0,292	0,087	0,093	0,434	0,045	1	0,285	0,273
	p	0,332	0,259	0,44	0,11	0,635	0,613	0,021	0,809		0,114	0,177
	N	32	32	32	31	32	32	28	32	32	32	26
gGT [U/l]	r	0,045	0,176	-0,068	0,225	-0,002	0,022	0,237	0,688	0,285	1	0,226
	p	0,791	0,297	0,691	0,187	0,991	0,899	0,184	0	0,114		0,238
	N	37	37	37	36	37	37	33	37	32	37	29
HbA1c [%]	r	-0,225	-0,145	0,556	0,193	0,215	0,192	0,355	0,038	0,273	0,226	1
	p	0,242	0,454	0,002	0,326	0,263	0,319	0,081	0,843	0,177	0,238	
	N	29	29	29	28	29	29	25	29	26	29	29

r = Korrelationskoeffizient nach Pearson

p = Signifikanz (2-seitig)

N = Anzahl

### Korrelation nach Pearson der intervallskalierten Variablen bei Patienten mit aktivem Cushing-Syndrom

		Haarcortisol [pg/mg]	Log. Haarcortisol	Alter bei Haarprobe	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	Blutdruck systolisch [mmHg]	Blutdruck diastolisch [mmHg]	Taillenumfang [cm]	Triglyceride [mg/dl]	gGT [U/l]	HbA1c [%]
Haarcortisol [pg/mg]	r	1	0,985	-0,25	-0,377	0,723	0,637	0,122	-0,422	0,76	-0,7
	p		0,002	0,686	0,532	0,167	0,248	0,878	0,723	0,136	0,19
	N	5	5	5	5	5	5	4	3	5	5
Log. Haarcortisol	r	0,985	1	-0,142	-0,466	0,621	0,52	0,033	-0,45	0,654	-0,68
	p	0,002		0,82	0,429	0,264	0,369	0,967	0,703	0,231	0,211
	N	5	5	5	5	5	5	4	3	5	5
Alter bei Haarprobe	r	-0,25	-0,142	1	-0,675	-0,501	-0,668	-0,98	-0,998	-0,78	0,691
	p	0,686	0,82		0,211	0,39	0,218	0,023	0,041	0,117	0,196
	N	5	5	5	5	5	5	4	3	5	5
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	r	-0,377	-0,466	-0,675	1	-0,19	0,002	0,847	,997*	0,241	-0,3
	p	0,532	0,429	0,211		0,759	0,997	0,153	0,049	0,696	0,628
	N	5	5	5	5	5	5	4	3	5	5
Blutdruck systolisch [mmHg]	r	0,723	0,621	-0,501	-0,19	1	0,976	0,305	0,519	0,815	-0,39
	p	0,167	0,264	0,39	0,759		0,004	0,695	0,653	0,093	0,514
	N	5	5	5	5	5	5	4	3	5	5
Blutdruck diastolisch [mmHg]	r	0,637	0,52	-0,668	0,002	0,976	1	0,581	0,735	0,86	-0,46
	p	0,248	0,369	0,218	0,997	0,004		0,419	0,474	0,061	0,44
	N	5	5	5	5	5	5	4	3	5	5
Taillenumfang [cm]	r	0,122	0,033	-0,977	0,847	0,305	0,581	1	1	0,709	-0,75
	p	0,878	0,967	0,023	0,153	0,695	0,419		.	0,291	0,253
	N	4	4	4	4	4	4	4	2	4	4
Triglyceride [mg/dl]	r	-0,422	-0,45	-0,998	0,997	0,519	0,735	1	1	0,976	-0,68
	p	0,723	0,703	0,041	0,049	0,653	0,474		.	0,141	0,526
	N	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3
gGT [U/l]	r	0,76	0,654	-0,784	0,241	0,815	0,86	0,709	0,976	1	-0,81
	p	0,136	0,231	0,117	0,696	0,093	0,061	0,291	0,141		0,1
	N	5	5	5	5	5	5	4	3	5	5
HbA1c [%]	r	-0,698	-0,676	0,691	-0,297	-0,392	-0,456	-0,75	-0,678	-0,81	1
	p	0,19	0,211	0,196	0,628	0,514	0,44	0,253	0,526	0,1	
	N	5	5	5	5	5	5	4	3	5	5

r = Korrelationskoeffizient nach Pearson

p = Signifikanz (2-seitig)

N = Anzahl

Korrelation nach Pearson der intervallskalierten Variablen bei Patienten mit kontrolliertem Cushing-Syndrom

		Haarcortisol [pg/mg]	Log. Haarcortisol	Alter bei Haarprobe	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	Blutdruck systolisch [mmHg]	Blutdruck diastolisch [mmHg]	Tailenumfang [cm]	Triglyceride [mg/dl]	gGT [U/l]	HbA1c [%]
Haarcortisol [pg/mg]	r	1	0,913	-0,16	-0,196	-0,215	-0,287	0,036	-0,391	-0,24	-0,09
	p		0	0,553	0,467	0,424	0,281	0,903	0,15	0,372	0,749
	N	16	16	16	16	16	16	14	15	16	16
Log. Haarcortisol	r	0,913	1	-0,193	-0,141	-0,053	-0,267	0,103	-0,436	-0,13	0,049
	p	0		0,474	0,603	0,846	0,317	0,727	0,105	0,638	0,858
	N	16	16	16	16	16	16	14	15	16	16
Alter bei Haarprobe	r	-0,16	-0,193	1	-0,352	0,002	0,176	-0,4	0,533	0,626	0,187
	p	0,553	0,474		0,182	0,993	0,515	0,154	0,041	0,009	0,489
	N	16	16	16	16	16	16	14	15	16	16
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	r	-0,196	-0,141	-0,352	1	0,489	0,488	0,546	-0,001	0,005	0,473
	p	0,467	0,603	0,182		0,054	0,055	0,043	0,998	0,986	0,064
	N	16	16	16	16	16	16	14	15	16	16
Blutdruck systolisch [mmHg]	r	-0,215	-0,053	0,002	0,489	1	0,605	0,096	-0,104	-0,07	0,363
	p	0,424	0,846	0,993	0,054		0,013	0,745	0,713	0,802	0,167
	N	16	16	16	16	16	16	14	15	16	16
Blutdruck diastolisch [mmHg]	r	-0,287	-0,267	0,176	0,488	0,605	1	0,497	0,229	0,068	0,17
	p	0,281	0,317	0,515	0,055	0,013		0,071	0,411	0,802	0,528
	N	16	16	16	16	16	16	14	15	16	16
Tailenumfang [cm]	r	0,036	0,103	-0,402	0,546	0,096	0,497	1	-0,108	-0,02	-0,09
	p	0,903	0,727	0,154	0,043	0,745	0,071		0,725	0,947	0,756
	N	14	14	14	14	14	14	14	13	14	14
Triglyceride [mg/dl]	r	-0,391	-0,436	0,533	-0,001	-0,104	0,229	-0,11	1	0,516	0,088
	p	0,15	0,105	0,041	0,998	0,713	0,411	0,725		0,049	0,756
	N	15	15	15	15	15	15	13	15	15	15
gGT [U/l]	r	-0,239	-0,128	0,626	0,005	-0,068	0,068	-0,02	0,516	1	0,169
	p	0,372	0,638	0,009	0,986	0,802	0,802	0,947	0,049		0,531
	N	16	16	16	16	16	16	14	15	16	16
HbA1c [%]	r	-0,087	0,049	0,187	0,473	0,363	0,17	-0,09	0,088	0,169	1
	p	0,749	0,858	0,489	0,064	0,167	0,528	0,756	0,756	0,531	
	N	16	16	16	16	16	16	14	15	16	16

r = Korrelationskoeffizient nach Pearson

p = Signifikanz (2-seitig)

N = Anzahl

## Korrelation nach Pearson der intervallskalierten Variablen bei gesunden Probanden

		Haarcortisol [pg/mg]	Log. Haarcortisol	Alter bei Haarprobe	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	Blutdruck systolisch [mmHg]	Blutdruck diastolisch [mmHg]	Taillenumfang [cm]	Triglyceride [mg/dl]	gGT [U/l]	HbA1c [%]
Haarcortisol [pg/mg]	r	1,000	0,850	0,109	0,051	0,032	0,066	0,121	0,565	0,482	0,100
	p		0,000	0,242	0,584	0,734	0,478	0,193	0,243	0,273	0,873
	N	118	118	118	118	118	118	118	6	7	5
Log. Haarcortisol	r	0,850	1,000	0,053	0,016	0,011	0,003	0,085	0,517	0,428	0,164
	p	0,000		0,571	0,863	0,905	0,975	0,360	0,294	0,338	0,792
	N	118	118	118	118	118	118	118	6	7	5
Alter bei Haarprobe	r	0,109	0,053	1,000	0,467	0,414	0,443	0,589	-0,139	0,016	0,570
	p	0,242	0,571		0,000	0,000	0,000	0,000	0,793	0,974	0,316
	N	118	118	118	118	118	118	118	6	7	5
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	r	0,051	0,016	0,467	1,000	0,495	0,406	0,870	-0,201	-0,174	-0,743
	p	0,584	0,863	0,000		0,000	0,000	0,000	0,702	0,710	0,150
	N	118	118	118	118	118	118	118	6	7	5
Blutdruck systolisch [mmHg]	r	0,032	0,011	0,414	0,495	1,000	0,751	0,542	0,042	0,296	0,491
	p	0,734	0,905	0,000	0,000		0,000	0,000	0,937	0,520	0,401
	N	118	118	118	118	118	118	118	6	7	5,000
Blutdruck diastolisch [mmHg]	r	0,066	0,003	0,443	0,406	0,751	1,000	0,428	0,701	0,761	0,356
	p	0,478	0,975	0,000	0,000	0,000		0,000	0,121	0,047	0,556
	N	118	118	118	118	118	118	118	6	7	5
Taillen- umfang [cm]	r	0,121	0,085	0,589	0,870	0,542	0,428	1,000	-0,162	0,124	0,159
	p	0,193	0,360	0,000	0,000	0,000	0,000		0,759	0,792	0,799
	N	118	118	118	118	118	118	118	6	7	5
Triglyceride [mg/dl]	r	0,565	0,517	-0,139	-0,201	0,042	0,701	-0,162	1,000	0,930	-0,122
	p	0,243	0,294	0,793	0,702	0,937	0,121	0,759		0,007	0,846
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5
gGT [U/l]	r	0,482	0,428	0,016	-0,174	0,296	0,761	0,124	0,930	1,000	0,168
	p	0,273	0,338	0,974	0,710	0,520	0,047	0,792	0,007		0,788
	N	7	7	7	7	7	7	7	6	7	5
HbA1c [%]	r	0,100	0,164	0,570	-0,743	0,491	0,356	0,159	-0,122	0,168	1,000
	p	0,873	0,792	0,316	0,150	0,401	0,556	0,799	0,846	0,788	
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

r = Korrelationskoeffizient nach Pearson

p = Signifikanz (2-seitig)

N = Anzahl

Korrelation nach Spearman der mindestens rangkorrelierten Variablen

		Haarcortisol [pg/mg]	Log. Haarcortisol	STAI X1	STAI X2	BDI II
Haarcortisol [pg/mg]	$r_s$	1	,999**	0,103	0,058	0,016
	p	.	0	0,235	0,503	0,852
	N	177	177	135	135	136
Log. Haarcortisol	$r_s$	,999**	1	0,099	0,053	0,012
	p	0	.	0,251	0,539	0,892
	N	177	177	135	135	136
STAI X1	$r_s$	0,103	0,099	1	,651**	,552**
	p	0,235	0,251	.	0	0
	N	135	135	135	135	135
STAI X2	$r_s$	0,058	0,053	,651**	1	,800**
	p	0,503	0,539	0	.	0
	N	135	135	135	135	135
BDI II	$r_s$	0,016	0,012	,552**	,800**	1
	p	0,852	0,892	0	0	.
	N	136	136	135	135	136

\*\* Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

p = Signifikanz (2-seitig)

$r_s$  = Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho

N = Anzahl

Mann-Whitney-U-Test bei Variablen mit 2 Ausprägungen

	alle Haarproben			Median Cortisol pg/mg Haar			Median Cortisol pg/mg Haar		
	z	p		z	p		z	p	
Geschlecht									
männlich	11	-0,507	0,612	11	-0,206	0,836			
weiblich	13			13					
natürliche Haarfarbe									
hell	13	-0,703	0,482	13	-1	317			
dunkler	13			13					
Locken									
nein	13	-0,245	0,807	13	-0,421	0,674			
ja	13			13					
Haarwäschen pro Woche									
≤4=0	13	-0,815	0,415	13	-0,557	0,578			
>4=1	15			15					
Tönung									
nein	13	0,516	0,606	13	0,87	0,384			
ja	12			12					
Färbung									
nein	14	-2,585	0,01	14	-2,341	0,19			
ja	8,5			8,5					
Haarbehandlung (Dauerwelle, Aufhellung)									
nein	13	-0,68	0,497	13	-734	0,463			
ja	15			15					

z = Koeffizient des Mann-Whitney-U-Tests

p = asymptotische Signifikanz (2-seitig)

## Regressionsanalyse

	B	95%-Konfidenzintervalle von B		Beta	p
		Untergrenze	Obergrenze		
Konstante	55,55	19,91	91,19		0,003
Cortisonsubstitution	14,34	2,20	26,48	0,21	0,021
diastolischer Blutdruck	-0,49	-0,95	-0,04	-0,19	0,032

(korrigiertes R-Quadrat = 0,054)

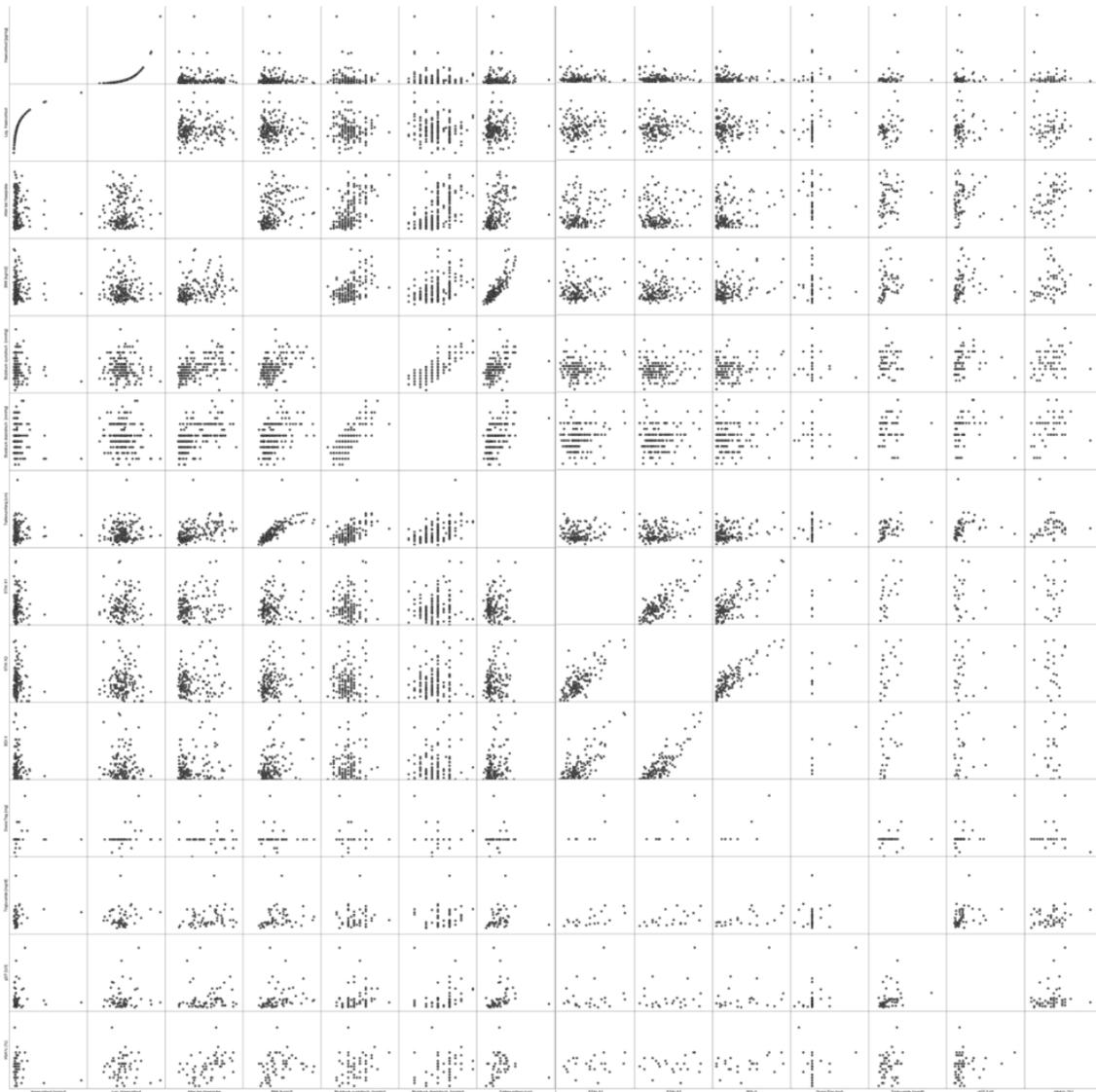
## Ausgeschlossene Variablen

	Beta In	T	p
keine Erkrankung	-0,06	-0,45	0,655
CS kontrolliert	0,00	0,03	0,973
CS aktiv	0,07	0,77	0,445
Alter bei Haarprobe	-0,01	-0,06	0,955
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	0,02	0,19	0,853
Blutdruck systolisch	0,00	0,00	0,998
Taillenumfang	0,10	1,01	0,316
Geschlecht	-0,06	-0,71	0,479
natürliche Haarfarbe	-0,03	-0,36	0,718
Locken	-0,06	-0,64	0,524
Haarwäschen pro Woche	0,07	0,77	0,445
Tönung	-0,07	-0,83	0,409
Färbung	-0,15	-1,69	0,093
STAI X1	-0,03	-0,38	0,702
STAI X2	-0,07	-0,79	0,434
BDI II	-0,07	-0,75	0,455
Rauchen aktuell	0,04	0,39	0,695

Abhängige Variable: Haarcortisol [pg/mg]

Einflussvariablen im Modell: (Konstante), Cortisonsubstituierte, Blutdruck diastolisch [mmHg]

Streumatrix aller Variablen





LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Promotionsbüro  
Medizinische Fakultät



## Eidesstattliche Versicherung

Engels, Teresa Doris

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Etablierung einer Methode zur Analyse von Steroiden in Kopfhaar und Fingernagel bei gesunden Erwachsenen und Patienten mit Erkrankungen des Cortisolstoffwechsels**

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

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

Augsburg, 23.06.2021

---

Ort, Datum

Teresa Doris Engels

---

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand