

Aus der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Michael Roden
Funktionsbereich Spezielle Endokrinologie
Leiter: Univ.-Prof. Dr. Matthias Schott

**Einfluss der Einnahme oraler Kontrazeptiva
auf den Dexamethasonhemmtest**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Myrella Paschali

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Holger S. Willenberg

Zweitgutachterin: PD Dr. med. Andrea Schanz

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Paschali, M., Willenberg, H.S., Fritzen, R., Schott, M., Scherbaum, W. A., Schinner, S., (2013). False positives on both dexamethasone testing and urinary free cortisol in women on oral contraception: dose – response effects. *Clinical Endocrinology*, (79), 443–445.

Zusammenfassung

Der basale Cortisolspiegel ist oft während der Einnahme von oralen Kontrazeptiva erhöht. Die Diagnose eines Hyperkortisolismus bei Frauen mit Kontrazeptivaeinnahme stellt eine Herausforderung dar, da die Validität des Dexamethason-Hemmtests (DST) unter diesen Bedingungen noch nicht ausreichend evaluiert worden ist. Aus diesem Grunde untersuchten wir die basalen Cortisolspiegel, Cortisolspiegel nach dem Dexamethasonhemmtest und das freie Cortisol im Urin (UFC) während und nach Absetzen der Kontrazeptiva.

Wir führten eine retrospektive Analyse mit Patientinnen die Ethinylestradiol in Form von Kontrazeptiva (Östrogen-Gestagen-Präparate) oder andere Hormonpräparate einnahmen (Studiengruppe) und sich einem DST unterzogen hatten, durch. Die Patientinnen waren 16 – 57 Jahre alt. Gründe für die Hyperkortisolismusdiagnostik waren Akne, Gewichtszunahme, Haarausfall, Hirsutismus, erhöhter Blutdruck, *Striae rubrae* und der Verdacht auf ein polyzystisches Ovarialsyndrom (PCOS). Folgende Werte wurden für die Studiengruppe erfasst und mit den Werten einer Kontrollgruppe (Frauen ohne Ethinylestradioleinnahme) verglichen: basaler Cortisolspiegel, Cortisolspiegel nach Dexamethason, SHBG-Spiegel (Sexualhormon-bindendes Globulin), ACTH-Spiegel (Adrenocorticotropes Hormon). Zusätzlich erfassten wir das UFC in der Studiengruppe.

In der Studiengruppe waren sowohl der basale Cortisolspiegel als auch der Cortisolspiegel nach Dexamethason-Gabe über den Normwert und dosisabhängig von der Ethinylestradioldosierung erhöht.

Zwei Drittel der Patientinnen der Studiengruppe hatten eine normale Suppression des Cortisols nach Dexamethason-Gabe (Grenzwert $<1,8 \mu\text{g/dl}$). Ungefähr ein Drittel der Patientinnen der Studiengruppe zeigte eine inadäquate Suppression; aus dieser Gruppe bekamen 11 Patientinnen einen Dexamethasonhemmtest nach Absetzen der oralen Kontrazeption für zwei Monate. Alle hatten dann eine normale Suppression des Cortisols im DST. Bei 30 % der Patientinnen der Studiengruppe wurde ein erhöhter UFC-Spiegel gemessen (Schwellenwert $80 \mu\text{g}/24\text{h}$). Dies weist darauf hin, dass Östrogene nicht nur den basalen, sondern auch den freien Cortisolspiegel erhöhen können, weshalb die UFC-Bestimmung bei Kontrazeptivaeinnahme nur mit Einschränkung geeignet ist.

Summary

Serum cortisol levels are often elevated during treatment with oral contraceptives (OC). The biochemical diagnosis of hypercortisolism in women on OC is challenging, because the validity of the dexamethasone suppression test (DST) has not yet been sufficiently evaluated. Therefore, we determined basal cortisol concentrations, cortisol after the DST in blood and free urinary cortisol levels (UFC) during OC treatment. We conducted a retrospective study with female patients who were receiving ethinylestradiol as oral contraception or other estrogen preparations and underwent a DST compared to a control group without OC administration. The patients were 16 - 57 years old. In the individuals analysed, the diagnostic work-up of hypercortisolism was triggered by the following clinical conditions: acne, weight gain, hair loss, hirsutism, high blood pressure, red *striae*, and clinical suspicion of polycystic ovary syndrome (PCOS). We determined following sample data of the study group and compared them to those of the control group: basal serum cortisol and serum cortisol concentrations after the DST, as a surrogate parameter to cortisol-binding protein (CGB), the concentrations of sex hormone-binding globulin (SHBG) and plasma adrenocorticotrophic hormone concentrations (ACTH). Furthermore, we acquired free urinary cortisol concentrations in the study group.

In the study group, both basal cortisol concentrations and cortisol concentrations after the DST were elevated in a dose-dependent manner. Two thirds of the patients on OC had a normal suppression of cortisol after the DST (cut-off $<1,8 \mu\text{g/dl}$). About one-third of the patients showed an inadequate suppression of cortisol after the DST. 11 patients within the study group had a re-evaluation of the DST after discontinuation of OC. All of them showed normal suppression of cortisol after the DST. In addition, free urinary cortisol excretion was measured in patients with inadequate suppression of cortisol. Elevated cortisol excretion in urine was found in as many as 30 % of the patients (cut-off threshold of $<80 \mu\text{g}/24\text{h}$).

Our data are not only consistent with a dose-dependent effect of ethinylestradiol intake on the basal cortisol concentration, but also with elevated free urinary cortisol concentrations in women on OC. From our results, it can be concluded that UFC is of limited diagnostic value for hypercortisolism in women receiving oral contraceptives.

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
AGS	Androgenitales Syndrom
BMI	Body-Mass-Index
CBG	Cortisol-bindendes Globulin
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormone
Dex-CRH	Dexamethason-Corticotropin-Releasing-Hormon-Test
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DST	Dexamethason-Hemmtest
EE2	Ethinylestradiol
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
hGR	Human Glucocorticoid Receptor
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophyse-Nebennierenrinden-Achse
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPV	Humane Papillomviren
K_{ass}	Assoziationskonstante
LH	Luteinisierendes Hormon
LNCS	<i>Late-night salivary cortisol screening</i>
MserC	<i>Midnight serum cortisol test</i>
OC	<i>Oral contraceptives</i>
17-OHCS	17-Hydroxycorticosteroide
PCOS	Polyzystisches Ovarialsyndrom
SHBG	Sexualhormon-bindendes Globulin
STH	Somatotropes Hormon
TRH	Thyreotropin-Releasing-Hormon
TSH	Thyreoida-stimulierendes Hormon
UFC	Freies Urincortisol
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Physiologie der Hypothalamus-Hypophyse-Nebennierenrinden-Achse	1
1.2 Cortisol-bindendes Globulin	2
1.3 Sexualhormon-bindendes Globulin	3
1.4 Orale Kontrazeption	4
1.5 Glukokortikoidwirkung	6
1.6 Hyperkortisolismus und das Cushing-Syndrom	8
1.7 Die diagnostischen Tests im Einzelnen	11
1.8 Glukokortikoidresistenz	15
2. Ziele der Arbeit	17
3. Material und Methoden	19
3.1 Studiendesign	19
3.2 Patientenkollektiv	19
3.3 Methoden: Berechnungen	20
3.4 Quantifizierung von Cortisol, Adrenocorticotropem Hormon, Sexualhormon-bindendem Globulin im Blut und freiem Cortisol im Urin	21
3.5 Statistik	22
4. Ergebnisse	23
4.1 Anthropometrische Daten und Blutdruck	23
4.2 Der Effekt von Ethinylestradiol auf den basalen Cortisolspiegel	28
4.3 Der Effekt von Ethinylestradiol auf die Ergebnisse des Dexamethason-Hemmtestes	33
4.4 Der Effekt von Ethinylestradiol auf das freie Cortisol im Urin	36
4.5 Longitudinale Untersuchungen	40
5. Diskussion	41
6. Schlussfolgerungen	47
7. Literaturverzeichnis	48
8. Danksagung	

1. Einleitung

1.1 Physiologie der Hypothalamus-Hypophyse-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse)

Der Hypothalamus liegt an der Basis des Diencephalons und gilt als neuroendokrine Schaltstelle. Er unterliegt Einflüssen von Neurotransmittern des limbischen Systems, der Großhirnrinde und der *Formatio reticularis*. Durch bidirektionale neuronale Verbindungen mit der Neurohypophyse und humorale Kontrolle der Adenohypophyse kontrolliert er vitale Körperfunktionen wie das Wachstum, die Homöostase der Osmolarität und der Energiebilanz, sowie Sexualfunktionen und -verhalten. Höhere Hirnfunktionen werden ebenfalls beeinflusst, z.B. Schlaf-Wach-Rhythmus und Aufmerksamkeit. Adeno- und Neurohypophyse sind unterschiedlichen embryonalen Ursprungs. Die Adenohypophyse geht entwicklungsgeschichtlich aus der Rathke-Tasche hervor, die dem epidermalen, epithelialen Teil entstammt und produziert die Peptidhormone Adrenocorticotropes Hormon (ACTH), Prolaktin, Somatotropes Hormon (STH) und die Glykoproteinhormone Thyreoidea-stimulierendes Hormon (TSH), Follikelstimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH). ACTH stimuliert in der Nebennierenrinde die Synthese von Glukokortikoiden, Mineralkortikoiden und androgenen Steroidhormonen. STH ist essentiell für das Längenwachstum, TSH steuert die Schilddrüsenfunktion, durch Prolaktin wird die Milchbiosynthese stimuliert. LH und FSH steuern die Gonadenfunktion. Die glandotropen Hormone TSH, ACTH, LH und FSH werden über Feedbackmechanismen durch die Hormone ihrer peripheren Drüsen kontrolliert. Die Neurohypophyse ist dagegen embryologisch Teil des Gehirns. Sie ist eine Erweiterung des ventralen Hypothalamus und produziert das antidiuretische Hormon (ADH) und Oxytocin. Die wichtigste Funktion des ADH ist die Rückresorption von Wasser über die V₂-Vasopressinrezeptoren am Sammelrohr der Niere. Zusätzlich werden ADH auch zentralnervöse Funktionen zugeschrieben, wie Einfluss auf die Temperaturregulation, Trinkverhalten und Gedächtnis. Oxytocin führt während des Geburtsvorganges zu Uteruskontraktionen und in der Laktationsphase zur Ejektion von Milch (Klinke *et al.*, 2005, S. 519 - 524).

Zur Regulation der Adenohypophyse werden im Hypothalamus Releasing- und Inhibitinghormone gebildet: Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH), Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH), Somatostatin, Corticotropin-Releasing-Hormone (CRH). TRH stimuliert die Bildung und Ausschüttung von TSH in der Schilddrüse, Somatostatin hemmt die Sekretion von STH, Prolaktin, ACTH und GnRH stimulieren die Sekretion der Gonadotropine LH und FSH. Zusammen mit dem ADH, Angiotensin II und dem vasoaktiven intestinalen Peptid (VIP) stimuliert CRH die Ausschüttung des ACTH (Schmidt *et al.*, 2007, S. 486; Klinker *et al.*, 2005, S. 519 - 524).

1.2 Cortisol-bindendes Globulin (CBG)

CBG oder Transcortin wird v.a. in der Leber produziert, ist ein Plasma α_1 -Glykoprotein und ein wichtiger Steroidhormonbinder im Blut. Es besteht aus 383 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von rund 52000 Dalton und besteht zu 26 - 29 % aus Kohlenhydraten. Seine Affinität zum Cortisol ist mit einer Assoziationskonstante (K_{ass}) von $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ bei 37°C viel höher als die des Albumins. CBG bindet auch Progesteron, Testosteron und Estradiol. Progesteron wird am stärksten gebunden ($K_{\text{ass}} = 9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$), stärker sogar als Cortisol. Testosteron ($K_{\text{ass}} = 1,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) und Estradiol ($K_{\text{ass}} = 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) binden nur mäßig. Die Plasmakonzentration von CBG beträgt rund 40 mg/L, in der Schwangerschaft steigt sie auf 70 mg/L. Durch die Bindung an den Plasmarezeptoren sind nur 1 – 3 % der Glukokortikoide frei im Blut verfügbar. Dexamethason und andere synthetische Glukokortikoide können nicht an CBG gebunden werden (Träger, 1977, S. 219 - 220; Hammond *et al.*, 1991).

Estradiol erhöht die CBG-Konzentration durch Steigerung der CBG-Biosynthese in der Leber (Träger, 1977, S. 220; Anseau *et al.*, 1993; Sandberg *et al.*, 1964; Brien, 1981). Des Weiteren erhöht Mitotan (Zytostatikum) die Expression und Sekretion von CBG (und SHBG) durch einen Östrogen- α -Rezeptor-abhängigen Mechanismus (Gagliardi *et al.*, 2010; Nader *et al.*, 2006).

Es gibt außerdem Hinweise, dass CBG während der Schwangerschaft nicht nur in der Leber, sondern auch in der Plazenta produziert wird (Misao *et al.*, 1999). Eine transdermale Östrogenapplikation scheint keine messbare Erhöhung des CBG zu verursachen (Qureshi *et al.*, 2007), was am ehesten eine Folge der niedrigen Dosierung ist. Sechs Wochen nach Beendigung einer

Östrogentherapie normalisierten sich die zuvor erhöhten CBG-Werte (Perogramvos *et al.*, 2010).

Polytrauma, septischer Schock, Operationen am offenen Herzen, schwere Verbrennungen, Sepsis, sowie schnelle Gewichtsabnahme aufgrund hypokalorischer Ernährung könnten eine Abnahme der CBG-Konzentration bewirken. CBG wirkt also als ein Cortisolreservoir bei erhöhtem Cortisolbedarf, aber auch als Puffer bei zu starker Cortisolanflutung (Beishuizen und Vermes, 2001; Tinnikov *et al.*, 1996; Bernier *et al.*, 1998; Yanovski *et al.*, 1993; Gagliardi *et al.*, 2010).

1.3 Sexualhormon-bindendes Globulin (SHBG)

Das SHBG gehört zur β -Globulin-Fraktion des Plasmas und hat ein Molekulargewicht von 52000 Dalton. Es bindet Estradiol ($K_{\text{ass}} = 6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) und Testosteron ($K_{\text{ass}} = 1,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$). Die beiden Hormone konkurrieren um dieselbe Bindungsstelle des SHBGs, wobei Testosteron eine höhere Affinität besitzt. Die Bindung an SHBG ist außer der Regulation über die Aromatase ein weiterer Steuerungsmechanismus des Verhältnisses zwischen Testosteron und Estradiol außerhalb der hypophysären Regulation. Testosteron verdrängt Estradiol in erhöhten Plasmakonzentrationen aufgrund seiner höheren Affinität zum SHBG; das frei gewordene Estradiol fördert die SHBG-Bildung und somit wiederum die eigene Plasmabindung. Derselbe Mechanismus greift auch, wenn Östrogene primär steigen: die SHBG-Bildung wird induziert und Östrogene werden vermehrt gebunden. An SHBG werden auch andere Steroidhormone gebunden, z.B. 5α -Dihydrotestosteron, Dehydroepiandrosteron (DHEA), Androstendion und Östron. Im Alter steigt die Zahl der androgen-bindenden Rezeptoren im Plasma an, sodass bei gleichbleibender Testosteronbiosynthese weniger freie Androgene im Blut zirkulieren. Beim erwachsenen Mann sind 58 % der Androgene an SHBG gebunden; der Rest bindet an Albumin (38 %), Transcortin (2 - 3 %) und 1 - 2 % bleiben frei im Blut verfügbar. Da Frauen viel niedrigere Testosteronkonzentrationen im Plasma aufweisen, ist der SHBG-gebundene Anteil mit 81,1 % viel höher. Ca. 18 % des Testosterons werden bei der Frau an Albumin gebunden. In der Schwangerschaft steigt der SHBG-gebundene Testosteronanteil auf 97 % und der freie Teil sinkt auf 0,2 %. Deswegen bleibt die Androgenkonzentration im Blut auch bei gesteigerter

Androgenproduktion der Ovarien und Nebennierenrinde konstant. Dadurch wird eine Virilisierung des weiblichen Fetus (und der Mutter) vermieden. Die Plasmakonzentration des SHBGs liegt bei ca. 2 - 3 mg/L, wobei 10^7 M Bindungsstellen zur Verfügung stehen (Träger, 1977, S. 220-221). Bei Frauen ist die SHBG-Plasmakonzentration doppelt so hoch wie bei Männern (Anderson, 1974).

Der SHBG-Spiegel steigt bei einer Östrogentherapie, mit steigendem Alter, unter dem Einfluss von Schilddrüsenhormon und bei verschiedenen Lebererkrankungen (z.B. der Leberzirrhose). Die SHBG-Spiegel sinken bei Adipositas, einer Androgentherapie, während der Pubertät, bei einer Schilddrüsenunterfunktion, bei erhöhten Insulinkonzentrationen und beim Polyzystischen Ovarialsyndrom (PCOS) (Pugeat *et al.*, 1995; Hautanen *et al.*, 1993; Anderson, 1974; Hacihanefioğlu *et al.*, 2013) (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Faktoren, welche die SHBG-Konzentration beeinflussen	
Erhöhung des SHBG	Erniedrigung des SHBG
Östrogentherapie	Hohe Insulinkonzentrationen
Alter	Androgene
Hyperthyreose	Adipositas
Verschiedene Lebererkrankungen	Pubertät
Schwangerschaft	PCOS
Mitotan	Hypothyreose

SHBG = Sexualhormon-bindendes Globulin, PCOS = Polyzystisches Ovarialsyndrom

1.4 Orale Kontrazeption

Orale Kontrazeptiva supprimieren die Gonadotropinsekretion und verhindern dadurch die Ovulation. Der Pearl-Index ist definiert als die Anzahl von ungeplanten Schwangerschaften pro 100 Frauenjahre unter Kontrazeptivaeinnahme. Er wird mittels Dividieren der Anzahl der ungeplanten Schwangerschaften durch die Anzahl der Jahre der Einnahme einer oralen Kontrazeption berechnet (Trussel *et al.*, 2004; Trussel *et al.*, 2013).

Der Pearl-Index gilt als das Maß für die Sicherheit von Verhütungsmitteln. Je niedriger er ist, desto sicherer ist die jeweilige Methode in Bezug auf die

Wahrscheinlichkeit einer Empfängnis. Neue orale Kontrazeptiva auf dem amerikanischen Markt haben einen Pearl-Index von 2 - 3 (Gerlinger *et al.*, 2014).

Die orale Kontrazeption beeinflusst das kardiovaskuläre und das hämostatische System, sowie den Lipid- und Kohlenhydratmetabolismus (Wiegratz und Thaler, 2011). Kontrazeptivaeinnahme bei bestimmten Risikofaktoren kann das Auftreten von Thromboembolien erhöhen (Wiegratz und Thaler, 2011; Reid *et al.*, 2010). Frauen mit einer persistierenden Infektion mit Humanen Papillomviren (HPV), die mit oralen Kontrazeptiva verhüten, haben ein vierfach erhöhtes Risiko, an einem Zervixkarzinom zu erkranken (Moreno *et al.*, 2011). Andererseits erniedrigt die orale Kontrazeption die kumulative Inzidenz von Endometrium- und Ovarialkarzinomen um 30 - 50 % (Vessey und Painter, 2006) und vom Kolorektalkarzinom um etwa 20 % (Fernandez *et al.*, 2001; Bosetti *et al.*, 2009). Das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, scheint durch orale Kontrazeption nicht erhöht zu sein (Marchbanks *et al.*, 2002).

Des Weiteren gibt es Hinweise, dass die orale Kontrazeption eine Wirkung auf die kognitiven Leistungen der einnehmenden Frauen in den Bereichen verbales Gedächtnis, assoziatives Lernen und räumliche Aufmerksamkeit haben könnte (Gogos *et al.*, 2014; Griksiene und Ruksenas, 2011; Maki *et al.*, 2002).

1951 meldete Carl Djerassi das erste für die orale Kontrazeption geeignete synthetische Progesteron Norethindron zum Patent an. Die verhütende Wirkung des Progesterons war schon vorher bekannt, jedoch wurde es oral wegen des hohen *First-Pass-Effektes* schnell abgebaut und somit unwirksam gemacht. Zum ersten Mal wurde die Pille 1957 in den USA zugelassen und zunächst als "Mittel zur Behebung von Menstruationsstörungen" eingeführt (Handelsname "Enovid"). Erst 1960 durfte das Medikament als Kontrazeptionsmittel verkauft werden (White Junod und Marks, 2002). Seit den 1970er Jahren etablierte sich die so genannte „Pille“ auch in Deutschland.

Eine Repräsentativbefragung der Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung im Jahr 2011 erbrachte folgende Ergebnisse: 53 % der befragten Frauen (18 - 49 Jahre) gaben an, dass sie mit der „Pille“ verhüten, 37 % verhüten mit Kondomen, der Rest mit anderen Methoden, nennenswert davon ist nur die Spirale (10 %). Diese erreicht ihren Bedeutungshöhepunkt in der

Altersgruppe 30 - 39 Jahren (Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung, 2011).

1.5 Glukokortikoidwirkung

In der Nebennierenrinde werden Glukokortikoide (v.a. Cortisol), Mineralocorticoide (v.a. Aldosteron und 11-Desoxycorticosteron), Androgene und Östrogene (DHEA, Androstendion, Androstendiol und Östron) sowie Gestagene (Progesteron) synthetisiert (Klinke *et al.* 2005, S. 538; Träger; 1977, S. 141).

Glukokortikoide werden innerhalb von 15 - 30 Minuten nach Stimulation durch ACTH direkt in die Blutbahn freigesetzt. Cortisol beträgt ca. 95 % und Corticosteron 5 % der Glukokortikoidaktivität beim Menschen (Klinke *et al.*, 2005, S. 539). Über 80 % des Cortisols im Blut sind an CBG gebunden, nur ein kleiner Teil zirkuliert frei und ist damit biologisch aktiv (Dhillon *et al.*, 2002; Brien, 1981).

Bei Gesunden wird das Cortisol im zirkadianen Rhythmus ausgeschüttet: der Cortisolspiegel fällt in den Abendstunden und erreicht sein Tiefpunkt um Mitternacht. Gegen 02:00 Uhr beginnt der Spiegel zu steigen und erreicht sein Maximum zwischen 05:00 Uhr und 09:00 Uhr (Trainer & Grossman, 1991).

Zu den Hauptwirkungen der Glukokortikoide zählt die spezifische Stimulation vieler Enzymsynthesen. Vor allem die Enzyme der Glukoneogenese werden beeinflusst. Im peripheren Gewebe wird durch die Glukokortikoide die Glukoseverwertung gehemmt; diese Mechanismen erhöhen den Blutzuckerspiegel und können diabetogen wirken. Die Lipolyse wird gesteigert und die Fettsäuresynthese gehemmt. Diese katabolen Wirkungen sind unter anderem in der Muskulatur, in der Haut und im lymphatischen System bemerkbar. Die dadurch freiwerdende Aminosäuren werden in der Leber für die Glucosebildung verwendet. Glukokortikoide wirken membranstabilisierend (Anwendung beim Schock zur Gefäßabdichtung) und lysosomenstabilisierend (verminderte Prostaglandinfreisetzung). Außerdem wirken sie immunsuppressiv: sie hemmen die Freisetzung der meisten Zytokine und verringern die Anzahl der Lymphozyten im Blut. Glukokortikoide führen zur Adrenalinsynthese und steigern die Empfindlichkeit der Adrenorezeptoren gegenüber Katecholaminen und anderen vasokonstriktiven Substanzen.

Glukokortikoide sind auch Mineralokortikoide und haben als solche eine Wirkung auf den Salz- und Wasserhaushalt: sie fördern die Natrium- und indirekt die Wasserretention, wobei Kalium vermehrt ausgeschieden wird (Klinke *et al.* 2005, S. 540; Träger; 1977, S. 141).

Des Weiteren wird das Verhaltensmuster durch die zentrale Wirkung der Glukokortikoide auf das Gehirn geprägt. Die Cortisoleffekte im Gehirn werden über zwei Rezeptoren vermittelt: einen schnell wirkenden, hochsensiblen Mineralokortikoidrezeptor und einen langsam wirkenden, weniger sensiblen Glukokortikoidrezeptor (de Kloet *et al.*, 2005; Arriza 1988, Reul und de Kloet, 1985). Glukokortikoide können zu gegensätzlichen Stimmungsänderungen führen: Euphorie, Schlafstörungen oder Erregbarkeit (Träger, 1977, S. 141, 151).

Tyrka *et al.* diskutierten, dass erhöhte Cortisolwerte im Blut mit geringer Neigung zur Suche nach Neuem und hoher Bereitschaft zur Schadensvermeidung assoziiert sind (Tyrka *et al.*, 2008). CRH ist einer der hauptsächlichen molekularen Mediatoren des Stresssystems im zentralen Nervensystem. Chronische Aktivierung des Stresssystems im Gehirn ist mit vielen psychiatrischen Störungen, z.B. Depression, Angststörungen und dissoziativen Störungen assoziiert, hinzukommen Substanzmissbrauch sowie Schlafstörungen (Chrousos und Kino, 2009). Es gibt Hinweise, dass die Verfügbarkeit von Tyrosin und L-Tryptophan im Gehirn durch Glukokortikoide erniedrigt wird; diese Verfügbarkeit bestimmt wiederum den Serotonin- und Noradalinmetabolismus im Gehirn (Maes *et al.*, 1990). Die Konzentrationsänderungen beider Neurotransmitter scheinen eine Rolle in der Pathophysiologie von Depression zu spielen (Maes *et al.*, 1992).

Auch bei der Manifestation einer Erkrankung des schizophrenen Formenkreises bei Individuen mit gleicher genetischen Prädisposition scheint es eine Verbindung mit der Aktivität der HPA-Achse zu geben (Corcoran *et al.*, 2003).

Es ist bekannt, dass Östrogene und folglich orale Kontrazeptiva die Konzentration von CBG im Plasma erhöhen. Dieses erhöht die basal gemessenen Gesamtcortisolwerte in diesem Kompartiment (Träger, 1977, S. 220; Smith *et al.*, 1980; Sandberg *et al.*, 1964). Dieser dosisabhängige Effekt beginnt meistens zwei Wochen nach Beginn der Östrogen-therapie (Musa *et al.*, 1965) und hält bis vier Wochen nach Beendigung der Therapie an (Grant *et al.*,

1965). Im Gegensatz dazu bleibt das freie Cortisol unbeeinflusst (Smith *et al.*, 1980). Daher kann die Bestimmung der basalen Cortisolwerte irreführend sein.

1.6 Hyperkortisolismus und Cushing-Syndrom

Ältere bevölkerungsbasierte Studien berichten über eine jährliche Inzidenz vom Cushing-Syndrom von weniger als 2: 1 000 000 (Lindholm *et al.*, 2001).

Durch die erhöhte Adipositas-Inzidenz erscheinen mehr und mehr Patienten mit cushingoiden Phänotyp, was die Differenzierung der Patienten mit einem metabolischen Syndrom von denen mit Cushing-Syndrom schwieriger macht. Neue Studien (zitiert von Carroll und Findling, 2010) von Hochrisikogruppen berichten einen endogenen Hyperkortisolismus bei 0,5 - 1 % der Patienten mit Bluthochdruck, 6 - 9 % von Patienten mit adrenalen Inzidentalomen, 2 - 3% der schlecht eingestellten Diabetiker und bis zu 11 % der Patienten mit Osteoporose und Knochenfrakturen.

Ätiologie

Das Cushing-Syndrom kann in exo- und endogene Formen unterteilt werden. Die häufigste Form ist der exogene Glukokortikoidexzess, verursacht durch die inadäquate Applikation von Glukokortikoiden (Nieman *et al.*, 2008). Diesbezüglich ist erwähnenswert, dass auch topische Glukokortikoide zu klinisch relevanten Erscheinungen führen können, insbesondere, wenn sie zusammen mit Ritonavir gegeben werden, da dieses Medikament den Abbau von Glukokortikoiden über CYP3A4 hemmt (Willenberg *et al.*, 2012).

Das endogene Cushing-Syndrom kann ACTH-abhängig und -unabhängig sein. Ursachen für die ACTH-abhängige Form können ACTH-bildende Adenome der Hypophyse (Morbus Cushing), das ektope ACTH-Syndrom (paraneoplastische ACTH-Bildung) und – sehr selten – eine ektope CRH-Produktion sein. Für die ACTH-unabhängige Form sind meistens einseitige, Cortisol-produzierende Nebennierenrindentumore verantwortlich. In der Mehrzahl finden sich hierbei Adenome, seltener Karzinome und noch seltener mikronoduläre Dysplasien oder makronoduläre Hyperplasien der Nebennieren (Trainer und Grossmann, 1991; Swain *et al.*, 1998; Nieman *et al.*, 2008).

Symptomatik

Obwohl das Cushing-Syndrom in seiner Vollmanifestation unverkennbar ist, ist das Spektrum der Symptomatik so breit, dass vor allem bei leichteren Fällen die Diagnosestellung sehr schwierig sein kann. Sehr wenige Symptome, wenn überhaupt, sind spezifisch; manche sind aber charakteristischer als andere. Besonders kennzeichnend sind hier *Striae rubrae*, *Plethora*, die Entstehung von blauen Flecken ohne adäquates Trauma, eine proximale Muskelschwäche und eine unerklärliche Osteoporose (Schneider *et al.*, 2012).

Viele der durch den Hyperkortisolismus verursachten Symptome sind aber gleichzeitig sehr häufig in der Allgemeinbevölkerung: Gewichtszunahme bzw. Adipositas, Diabetes mellitus, Depression, Müdigkeit, Schlafstörungen, Libidoverlust, arterielle Hypertonie und Unregelmäßigkeiten des Menstrualzyklus. Somit entsteht eine Überlappung in der klinischen Manifestation bei Patienten mit und ohne Cushing-Syndrom.

Auch eine Hyperaktivität der HPA-Achse kann ohne ein echtes Cushing-Syndrom auftreten, sodass es zu Überlappungen zwischen physiologischen und pathophysiologischen Ursachen kommt, die mit mildem Hyperkortisolismus assoziiert sind (Tab. 2). Der Dexamethasonhemmttest (DST) kann pathologisch ausfallen und das freie Cortisol im Urin (UFC) kann leicht erhöht sein (Nieman, 2015).

Tabelle 2: Physiologischer Hyperkortisolismus (oder Pseudo-Cushing-Syndrom)
Mit möglichen klinischen Anzeichen eines Cushing-Syndroms
Schwangerschaft
Depression und andere psychiatrische Erkrankungen
Alkoholabhängigkeit
Glukokortikoidresistenz
Adipositas
Schlecht eingestellter Diabetes mellitus
Eher ohne klinische Anzeichen eines Cushing-Syndroms
Physischer Stress (Krankenhausaufenthalt, Operationen, Schmerz)
Malnutrition, Anorexia nervosa
Hypothalamische Amenorrhoe
CBG-Erhöhung

Modifiziert nach Nieman, 2015. CBG = Cortisol-bindendes Globulin

Aufgrund der vielen gemeinsamen Symptome eines PCOS (Zyklusstörungen, Hyperandrogenämie und Insulinresistenz) und des Hyperkortisolismus sollte bei betroffenen Patientinnen auch ein Cushing-Syndrom ausgeschlossen werden (Nieman *et al.*, 2008).

Patienten mit einem Cushing-Syndrom haben eine zweifach erhöhte Mortalität gegenüber der Allgemeinbevölkerung (Clayton *et al.*, 2011) und neigen zu vielen Komorbiditäten wie stammbetonte Adipositas, Osteoporose, arterielle Hypertonie, Insulinresistenz, *Diabetes mellitus*, Dyslipidämie und koronare Herzerkrankung (Pivonello *et al.*, 2005; Petersenn *et al.*, 2014; Etxabe und Vasquez, 1994). Da eine lange Erkrankungsdauer mit ernststen Komplikationen assoziiert ist, ist die frühe Diagnosestellung essenziell. Eine effektive Behandlung verbessert die Lebenserwartung der Patienten (Clayton *et al.*, 2011).

Diagnostik

Die pulsatile Natur und zirkadiane Variabilität von ACTH und Cortisolsekretion in gesunden Individuen und der Verlust der zirkadianen Rhythmik der Cortisolsekretion bei Patienten mit einem Cushing-Syndrom führen dazu, dass einzelne Stichproben von ACTH und Cortisol im Blut nicht hilfreich für die Diagnostik und für die Evaluation des Therapieerfolgs sind (Clayton *et al.*, 2011; Trainer und Grossman, 1991).

Deshalb wird von der *Endocrine Society* eines der folgenden Verfahren für die Diagnostik empfohlen: Bestimmung des UFC im 24-h-Urin (mindestens 2 Messungen), spät nächtliche Messung des Speichelcortisols (*Late-night salivary cortisol screening*, LNCS, mindestens 2 Messungen), der niedrigdosierte 1 mg-DST und der längere niedrigdosierte DST (2 mg/d für 48h). Wenn der initiale Test pathologisch auffällt, wird die Durchführung eines Anderen zur Kontrolle empfohlen. In der Schwangerschaft wird eher die Cortisoldiurese bestimmt, von einem DST wird häufig Abstand genommen (Nieman, 2008).

Die diagnostische Genauigkeit von in der Vergangenheit empfohlenen diagnostischen Tests wie zufällige Messungen von Cortisol im Serum, Bestimmung der 17-Hydroxycorticosteroide (17-OHCS) im Urin, und Insulintoleranztest ist gering (Crapo, 1979) während es für den Loperamidtest

nicht ausreichende Evidenz gibt (Newell-Price *et al.*, 1998). Die Bestimmung der ACTH-Konzentration im Blut, der CRH-Stimulationstest und der 8 mg-DST können bei Gesunden und Patienten mit einem Cushing-Syndrom pathologisch ausfallen, weshalb sie nicht hilfreich in der Diagnosestellung sind (Newell-Price *et al.*, 1998; Nieman *et al.*, 2008).

Allerdings können die oben erwähnten Screeningtests nicht immer akkurat ein Cushing-Syndrom von einem Pseudo-Cushing-Syndrom differenzieren (Yanovski *et al.*, 1993; Newell-Price *et al.*, 1998; Alwani *et al.*, 2014). Deshalb wurden weitere Tests entwickelt, wie die Bestimmung des Serumcortisols um Mitternacht (*midnight serum cortisol test*, MserC) und der Dexamethason-Corticotropin-Releasing-Hormon-Test (Dex-CRH) (Papanicolaou *et al.*, 1998; Yanovski *et al.*, 1993; Alwani *et al.*, 2014). Perori Gibaldi *et al.* empfehlen die Kombination des niedrigdosierten DST mit dem Desmopressintest. Der Desmopressintest ist für Patienten mit adrenalem Cushing-Syndrom ungeeignet, scheint aber hilfreich bei der Diagnostik bei Patienten mit mildem Hyperkortisolismus und normalen ACTH-Spiegel zu sein. Dies basiert darauf, dass Desmopressin die ACTH-Ausschüttung bei Patienten mit einem Morbus Cushing stimuliert, nicht aber bei normalen Individuen mit einem Pseudo-Cushing-Syndrom (Pecori Gibaldi *et al.*, 2007; Moro *et al.*, 2000).

1.7 Die diagnostischen Testverfahren im Einzelnen

Der Dexamethason-Hemmtest (DST)

Dexamethason ist ein synthetisches Glukokortikoid mit einer 80 - 100-fach stärkeren Glukokortikoidwirkung als Hydrocortison (Rivkees, 2010) und hat keine mineralokortikoide Potenz (Klinke *et al.*, 2005, S. 540). Es wird nicht durch CBG gebunden (Träger, 1977, S. 220). Zum einen hat es eine große strukturelle Homologie zum Cortisol, sodass es wie Cortisol in den endokrinen Rückkopplungs-Mechanismus eingreift und die Ausschüttung von ACTH und damit auch die Freisetzung von Cortisol hemmt. Zum anderen gibt es eindeutige strukturelle Unterschiede, durch die es nicht im Cortisol-Assay kreuzreagiert. Auf diesem Prinzip basiert der DST. Beim gesunden Organismus ist ein signifikanter Abfall (Suppression) des Cortisol-Blutspiegels nachzuweisen, im Falle eines Cushing-Syndroms aber nicht (Klinke *et al.*, 2005,

S. 544). Der DST wurde erstmalig von Grant Liddle 1960 beschrieben (Liddle, 1960).

Der DST wird mit einer einmaligen oralen Gabe von 1 mg Dexamethason durchgeführt. Die Applikation erfolgt am Abend zwischen 22:00 Uhr und 23:00 Uhr und die Kontrolle des Blutcortisolspiegels sollte zwischen 08:00 Uhr und 09:00 Uhr früh stattfinden. Cortisolkonzentrationen von $<1,8 \mu\text{g/dl}$ ($<50 \text{ nmol/l}$) werden als normal gewertet. Höhere Werte sind mit einem fehlenden normalen negativen Feedback bei Patienten mit einem Cushing-Syndrom zu finden. Die Sensitivität des DST liegt bei einem Grenzwert von $1,8 \mu\text{g/dl}$ bei $>95 \%$ und die Spezifität bei 80% (Carroll und Findling, 2010; Nieman *et al.*, 2008; Görge *et al.*, 1999). Laut Crapo *et al.* gibt es bei Gabe von 1,5 mg oder 2 mg Dexamethason keinen diagnostischen Unterschied (Crapo, 1979; Newell-Preis *et al.*, 1998).

Es gibt unterschiedliche Gründe, warum es bei einem DST zu verfälschten Ergebnissen kommen kann. Bei Frauen, die Östrogene (z.B. in Form oraler Kontrazeptiva) nehmen, kann es zu einer CBG-Erhöhung kommen, die nachfolgend zu einer Erhöhung des basalen Cortisols führen kann. Dadurch kann es zu abnormen Ergebnissen im DST kommen (Nickelsen *et al.*, 1989; Nieman, 2015). Außerdem erhöhen Substanzen wie z.B. Phenytoin, Phenobarbital, Carbamazepin, Rifampicin und Alkohol über eine Induktion des CYP3A4-Systems die Dexamethason-Clearance. Sie können somit zu erniedrigten Serumspiegeln von Dexamethason führen. Auch eine gestörte Resorption von Dexamethason kann zu niedrigen Serumspiegeln führen. Durch einen niedrigen Dexamethason-Spiegel kann es zu falsch positiven Ergebnissen beim DST kommen (siehe Tabelle 3). Deswegen ist es sinnvoll, bei bestimmten Patienten (z.B. Patienten mit Antikonvulsivaeinnahme) sowohl den Cortisol- als auch den Dexamethason-Spiegel im Blut zu bestimmen, um sicherzustellen, dass der erwartete Spiegel im Blut erreicht wurde (Carroll und Findling, 2010; Kyriazopoulou und Vagenakis, 1992; Meikle, 1982).

Andererseits können CYP3A4-Hemmer den Abbau glukokortikoid-aktiver Substanzen derart hemmen, dass bei Zufuhr exogener Substanzen falsch niedrige endogene Cortisolspiegel resultieren (Bernecker *et al.*, 2012).

Das freie Cortisol im Urin (UFC)

Eine analytische Methode, welche die tatsächlich freie Cortisolkonzentrationen reflektieren soll, ist die Messung des Urincortisols (gesammelt über 24 Stunden). Etwa 10 % des Cortisols im Blut ist frei (ungebunden) und somit biologisch aktiv. Obwohl der Großteil davon in den renalen Tubulussystem zurückresorbiert wird, wird circa 1 % unverändert im Urin ausgeschieden. Deshalb entspricht die Messung des UFC einer indirekten Bestimmung vom im Blut zirkulierenden, freien Cortisol unbeeinflusst von der CBG-Konzentration (Trainer und Grossmann, 1991; Newell-Preis *et al.*, 1998). Die Messung scheint außerdem weitgehend unabhängig vom Körpergewicht zu sein (Streeten *et al.*, 1969). Das UFC ist der Bestimmung der 17-OHCS überlegen, weil Letztere oft zu falsch positiven oder negativen Ergebnissen führt, sodass die 17-OHCS-Messung in der klinischen Diagnostik heutzutage kaum noch verwendet wird. Die Bestimmung von 17-OHCS erfasst sowohl Cortisolmetabolite als auch Cortisol im Urin (Nieman *et al.*, 2008).

Der Referenzbereich für UFC hängt vom Typ des benutzten Assays ab. Messungen mit Immunoassays (Referenzbereich <80 – 120 µg/24h oder <220 – 330 nmol/24h) sind von einigen Cortisolmetaboliten und manchen synthetischen Glucocorticoiden beeinflusst, während Messungen mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) die Unterscheidung von vielen Cortisolmetaboliten im Urin erlauben (Grenzwerte: <50 µg/24h oder <138 nmol/24h). HPLC oder die Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie liefern die beste Spezifität für die UFC-Messungen und ersetzen deshalb zunehmend die älteren Immunassay-Methoden (Castro und Moreira, 2007; Turpeinen *et al.*, 1997).

Ein Nachteil der UFC-Methode ist die niedrige Sensitivität, die sich in Studien zwischen 45 % und 71 % bewegt, während die Spezifität annähernd 100% beträgt. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich die relativ konstante Cortisolsekretionsrate mit einem relativen Anstieg um Mitternacht bei Patienten mit Cushing-Syndrom. Dieser ist zwar signifikant, erhöht jedoch den 24h-Cortisolwert nicht wesentlich, weil das meiste Cortisol in der Zeit zwischen 04:00 Uhr und 12:00 Uhr sezerniert wird. Die Sensitivität und Spezifität variieren auch aufgrund der unterschiedlichen *cut-off* Werte, die in den Studien

verwendet werden (Carroll und Findling 2010; Papanicolaou *et al.*, 2002; Görge *et al.*, 1999).

Die meisten Medikamente interferieren nicht mit der UFC-Messung. Eine Ausnahme stellen Fenofibrat und Carbamazepin dar (Tab. 3), die bei der Messung mit HPLC einen falsch erhöhten Cortisolspiegel verursachen (Carroll und Findling, 2010; Meikle *et al.*, 2003; Findling *et al.*, 1998). Des Weiteren können UFC-Messungen aufgrund von Niereninsuffizienz oder inkorrektur Sammlung des 24-Stunden-Urins ungenau sein (Elias *et al.*, 2014). Liegt die glomeruläre Filtrationsrate bei <30 ml/min kann das UFC trotz erhöhter Cortisolproduktion normal ausfallen (Castro und Moreira, 2007).

Ein weiterer Nachteil der UFC-Methode ist die Tatsache, dass es abhängig vom angewendeten Assay bei Patienten mit einem milden Cushing-Syndrom zu einer normalen oder erhöhten UFC-Konzentration kommen kann. Die Erklärung dafür ist die Kreuzreaktivität mit Cortisolpräkursoren und -metaboliten bei manchen Assays, nicht aber bei der HPLC oder der Tandem-Massenspektrometrie (Raff, 2013; Elias *et al.*, 2014; Nieman 2015).

Das Speichelcortisol

Einige Studien konnten zeigen, dass die Bestimmung der Cortisolkonzentration im Speichel eine zuverlässige Methode sowohl für den basalen Wert (Umeda *et al.*, 1981), als auch für den Wert im DST ist (Gozansky *et al.*, 2005). Dieser Wert repräsentiert den Spiegel des freien Cortisols im Blut, d.h. er ist CBG-unabhängig (Gozansky *et al.*, 2005) und wird oft für die Diagnostik des Cushing-Syndroms empfohlen (Nieman *et al.*, 2008). Er ist außerdem unabhängig vom Alter, der Speichelflussrate oder dem Rauchen von Zigaretten (Carroll & Findling, 2010; Read *et al.*, 1990; Cherek *et al.*, 1982). Weitere Vorteile dieser Methode stellen die Nichtinvasivität und die Applikation bei nicht-standardisierenden Bedingungen (ambulante Patienten) dar. Es sind mehrere Messungen im Laufe eines Tages möglich, ohne den Alltag des Patienten zu beeinflussen.

Da die zirkadiane Rhythmik des Cortisolspiegels bei Cushing-Patienten aufgehoben ist (v.a. mitternächtlich übersteigt der Cortisolspiegel den normalen Nadir), empfiehlt es sich, ein LNCS durchzuführen. Dieses hat eine höhere Sensitivität (92 %) für die Diagnostik des Cushing-Syndroms als die UFC-

Methode (s. oben). Die Spezifität des Speichelkortisols beträgt 96 %. Castro *et al.* fanden in deren Studie eine ähnliche Sensitivität und Spezifität für den 1 mg-DST und das LNCS (Castro *et al.*, 1999).

Es gibt allerdings auch andere Gründe, welche die zirkadiane Rhythmik des Cortisolspiegels aufheben, wie z.B. Schichtarbeit (veränderter Tag-Nacht-Rhythmus). Psychische Erkrankungen, Schwangerschaft (im 3. Trimenon) und schlecht eingestellter Diabetes Mellitus sind mit erhöhten nächtlichen Cortisolwerten assoziiert. In solchen Fällen ist der Test mit besonderer Vorsicht zu interpretieren (Keller *et al.*, 2006; de Weerth und Buitelaar, 2005; Liu *et al.*, 2005; Carroll und Findling, 2010).

1.8 Glukokortikoidresistenz

Glukokortikoide vermitteln ihre Wirkung durch den Glukokortikoid-Rezeptor (hGR, human Glucocorticoid Receptor). Die hGR- α -Isoform ist die vorherrschende, ubiquitäre Form, an der Glukokortikoide bevorzugt binden können. Über die physiologische Signifikanz der hGR- β -Isoform ist wenig bekannt (Pujols *et al.*, 2001; Oakley *et al.*, 1999).

Die Glukokortikoidresistenz ist eine seltene Krankheit mit generalisierter, partieller Resistenz aller Zielgewebe gegenüber Glukokortikoiden. Durch die kompensatorische Erhöhung des ACTH-Spiegels werden vermehrt Mineralokortikoide und/oder Androgene produziert, außerdem kommt es zu einer Erhöhung des UFC ohne die klinischen Zeichen eines Hyperkortisolismus. Die klinische Manifestation des Syndroms ist breit und variiert zwischen fehlender Symptomatik und ausgeprägter Androgenisierung, Erschöpfung und/oder Mineralokortikoidüberschuss. Die Glukokortikoidresistenz wird durch Mutationen im hGR-Gen, auch genannt NR3C1 (*nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1*) hervorgerufen, wodurch die Glukokortikoid-Signaltransduktion und das Ansprechen der Gewebe auf Glukokortikoide beeinträchtigt werden. Die Therapie erfolgt durch Verordnung von hohen Dosen synthetischer Glukokortikoide wie Dexamethason (1 - 3 mg/d) (Chrousos *et al.*, 1993; Charmandari *et al.*, 2008).

Tabelle 3: Medikamente, die mit den Tests zur Diagnostik eines Cushing-Syndroms interferieren können
Medikamente, die den Dexamethasonmetabolismus beschleunigen (Induktion von CYP3A4)
Phenobarbital
Phenytoin
Carbamazepin
Primidon
Rifampicin
Rifapentin
Ethosuximid
Pioglitazon
Medikamente, die den Dexamethasonmetabolismus hemmen (Inhibition von CYP3A4)
Aprepitant / Fosaprepitant
Itraconazol
Ritonavir
Fluoxetin
Diltiazem
Cimetidin
Medikamente, die CBG erhöhen
Östrogene
Mitotan
Medikamente, die zu einer Erhöhung des UFC führen können
Carbamazepin
Fenofibrat (HPLC)
Bestimmte synthetische Glukokortikoide (Kreuzreaktivität in Immunoassays)
Substanzen, die das Enzym 11 β -HSD2 hemmen (Lakritze, Carbenoxolone)

Modifiziert nach Nieman, 2008. CBG = Cortisol-bindendes Globulin, UFC = freies Urincortisol, HPLC = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, 11 β -HSD2 = 11 β –Hydroxysteroid-Dehydrogenase, Isoform 2

2. Ziele der Arbeit

Der DST ist ein Standardtest, womit ein Hyperkortisolismus ausgeschlossen werden kann (Nieman *et al.*, 2008). Trotz seiner langen Geschichte ist dieser bei Frauen mit Einnahme oraler Kontrazeptiva wenig validiert (Nickelsen *et al.*, 1989). Es existieren Hinweise, dass die Suppression des Cortisols im Serum und im Urin während der Schwangerschaft verfälscht ist (Odagiri *et al.*, 1988; Lindsay und Nieman, 2005; Vilar *et al.*, 2007). Allerdings existiert keine Untersuchung, die diesen Umstand bei Frauen mit Kontrazeptivaeinnahme systematisch analysiert (Paschali *et al.*, 2013).

Bisherige Studien zeigten, dass der Cortisolspiegel im Serum bei Frauen unter oraler Kontrazeption oft erhöht ist (Šimůnková *et al.*, 2008; Maes *et al.*, 1992; Wild *et al.*, 1982; Smith *et al.*, 1980, Grant *et al.*, 1965) und dass der DST falsch positive Ergebnisse liefern kann (Perogamvros *et al.*, 2010; Nickelsen *et al.*, 1989).

Wichtig ist jedoch zu erwähnen, dass ältere Studien vor allem in den 1980er Jahren durchgeführt wurden – also in einer Zeit, in der andere Grenzwerte für Cortisol im DST angewendet wurden. Nickelsen *et al.* berichten von falsch positiven Ergebnissen bei 6 von 19 Frauen mit Kontrazeptivaeinnahme bei einem Grenzwert von 3 µg/dl (0,03 mg - 0,05 mg Ethinylestradiol) (Nickelsen *et al.*, 1989).

Domisse *et al.* fanden bei fast allen untersuchten Patienten eine adäquate Suppression des Cortisols im DST unter Kontrazeptivaeinnahme (Dosis 0,05 mg oder 0,08 mg Mestranol) bei einem Grenzwert von 5 µg/dl (Domisse *et al.*, 1985) und Ansseau *et al.* fanden ebenso keinen signifikanten Einfluss von Kontrazeptiva (Dosis 30 µg oder 50 µg Ethinylestradiol) auf den DST (Grenzwert 5 µg/dl) (Ansseau *et al.*, 1993). Pharmakokinetisch entsprechen 0,05 mg Mestranol 0,035 mg Ethinylestradiol; physiologisch variiert Mestranol zwischen 50 und 100 % der Aktivität von Ethinylestradiol (Goldzieher und Brody, 1990).

Desweiteren wurden die Östrogenkonzentrationen in keiner dieser Studien speziell berücksichtigt und es gibt wenige longitudinale Untersuchungen zu diesem Thema, die einen Vergleich der Serumcortisolwerte vor und nach Absetzen der Pille erlauben würden. Auch das UFC im gesammelten 24h-Urin ist bis dato noch nicht in diesem Kontext untersucht worden (Paschali *et al.*, 2013).

Viele Frauen, die zur Abklärung eines Hyperkortisolismus vorgestellt werden, nehmen orale Kontrazeption ein. In der Literatur finden sich jedoch keine systematisch erhobenen Daten zur Validität des DST in diesem Setting. Aus diesem Grund stellten wir die Frage, ob der DST bei Frauen mit Östrogentherapie ein valides Screening-Werkzeug darstellt. Hierfür untersuchten wir die Cortisolsuppression im DST bei Frauen mit unterschiedlichen Ethinylestradioldosierungen vor und nach Absetzen der oralen Kontrazeption.

3. Material und Methoden

3.1 Studiendesign

In einem retrospektiven Design wurden Patientendaten und Blutwerte aus Archivakten des Universitätsklinikums Düsseldorf und der endokrinologischen Gemeinschaftspraxis Dr. Lippe, Dr. West und Dr. Fritzen Düsseldorf erhoben.

Die Blutentnahmen, aus denen die von uns erhobenen Blutwerte stammen, waren im Rahmen der klinischen Versorgung durchgeführt worden. Zusätzliche Analysen wurden nicht veranlasst, sondern lediglich Befunde aus der klinischen Routine gesammelt und ausgewertet.

Einschlusskriterium war für die Kontrollgruppe ein durchgeführter DST und für die Studiengruppe ein während der Einnahme eines oralen Kontrazeptivums durchgeführter DST. Als Ausschlusskriterium galt ein bekanntes Cushing-Syndrom.

Die Studie wird von der Ethikkommission Düsseldorf unter der laufenden Nummer 4624 geführt.

3.2 Patientenkollektiv

Die retrospektiv erhobenen Patientendaten umfassen Ergebnisse im Zeitraum von 01.01.2004 - 31.12.2010.

Es wurden zwei Gruppen von Patientinnen gebildet:

In der ersten Gruppe (als Studiengruppe bezeichnet) wurden zunächst 69 Patientinnen eingeschlossen, die Kontrazeptiva oder andere Hormonpräparate zum Zeitpunkt der Vorstellung in unserer Klinik oder in der endokrinologischen Praxis eingenommen haben. Bei 63 dieser Frauen waren die Daten hinsichtlich des DST (1 mg) vollständig.

Die zweite Gruppe (Kontrollgruppe, n = 19) bestand aus Patientinnen mit ähnlichen klinischen Merkmalen wie die Frauen der Studiengruppe, die in unserer Klinik oder der endokrinologischen Praxis vorstellig waren und keine Kontrazeptiva oder andere Hormonpräparate eingenommen haben.

Die Patientinnen beider Gruppen waren 16 - 57 Jahre alt.

3.3 Methoden

Bei den Patientinnen beider Gruppen wurden im Rahmen einer stationären Behandlung oder einer ambulanten (Folge-) Untersuchung unterschiedliche Laborwerte erhoben und ein DST durchgeführt.

Für unsere Studie analysierten wir folgende Parameter aus den Patientenakten:

- basales Cortisol im Serum
- basales ACTH im Plasma
- Cortisol im Serum nach Dexamethason-Gabe
- SHBG im Serum (als Surrogatparameter für das CBG; erhoben bei den Patientinnen der Studiengruppe)
- UFC (erhoben bei den Patientinnen der Studiengruppe)

Des Weiteren wurden für beide Gruppen anthropometrische Daten wie Alter, Body-Mass-Index (BMI) sowie systolischer und diastolischer Blutdruck, die Hauptdiagnose, der Name des Hormonpräparates und der Outcome nach einem *Follow-up* (nach zwei bis fünf Jahren) eruiert.

Der DST in unserer Klinik wurde mit einer einmaligen Gabe von 1 mg Dexamethason oral durchgeführt. Die Applikation erfolgte am Abend zwischen 22:00 Uhr und 23:00 Uhr und die Messung geschah am nächsten morgen nüchtern zwischen 08:00 Uhr und 09:00 Uhr.

Als Grenzwert für den Cortisolspiegel nach Dexamethason wurde 1,8 µg/dl gesetzt (Sensitivität von >95 % und Spezifität von 80 %).

Bei einer Subgruppe der Studiengruppe wurde der DST nach 2-monatiger Östrogenpause wiederholt (n = 11).

Berechnungen

Folgende Blutspiegel der beiden Gruppen wurden miteinander verglichen: basales ACTH im Plasma, Cortisol im Serum, SHBG und Cortisol im Serum nach Dexamethason-Gabe. Des Weiteren wurde das Alter, der BMI und die systolische und diastolische Blutdruckwerte von beiden Patientinnen-Gruppen miteinander verglichen.

Wir teilten die Frauen der Studiengruppe nach der Ethinylestradiolkonzentration pro Tag (0,01 mg, 0,02 mg, 0,03 mg und 0,035 mg) in Subgruppen auf und verglichen die Blutspiegel von basalem Cortisol, Cortisol nach Dexamethason-Gabe, SHBG, ACTH im Blut und UFC aller Subgruppen untereinander. Desweiteren verglichen wir o.g. Werte der Subgruppen jeweils mit denen der Kontrollgruppe.

Bei einer weiteren Subgruppe der Studiengruppe (n = 11), in welcher der DST nach zweimonatiger Östrogenpause wiederholt wurde, verglichen wir die jeweiligen Cortisolwerte nach Dexamethason-Gabe miteinander.

3.4 Quantifizierung von Cortisol, Adrenocorticotropem Hormon (ACTH), Sexualhormon-bindendem Globulin (SHBG) im Blut und vom freien Cortisol im Urin (UFC)

Die Cortisolkonzentrationen im Blut wurden mit einem immunometrischen Chemilumineszenz Assay bestimmt (Elecsys, Roche, Mannheim, Germany) mit einer Nachweisgrenze zwischen 0,018 µg/dl und 63 µg/dl und intra- und interassay Koeffizienten von maximal 1,6 % (Referenzbereich 6,2 - 19,4 µg/dl). Um das UFC zu bestimmen wurde cobas® assay von Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, gemäß der Anweisungen des Herstellers benutzt. Dies ist ein Assay mit Extraktion unter Verwendung von Dichlormethan.

Der ACTH-Spiegel wurde mit einem Electrochemiluminescence-Immunoassay (Elecsys, Roche, Switzerland) mit einer Nachweisgrenze von 1,0 pg/ml, intra- und interassay Koeffizienten von maximal 5,4 % bestimmt.

Als Ersatzparameter zum CGB nahmen wir die SHBG Konzentrationen, die mit einer Festphase, Sandwich immunometrischen Chemilumineszenz Assay (IMMULITE 2000 SHBG, Siemens Healthcare, Germany) und mit einer Kalibrationsrate bis 180 nmol/l (Referenzbereich für nichtschwängere Frauen 18 - 144 nmol/l) und eine analytische Sensitivität von 0,02 nmol/l bestimmt wurden. Die Blutproben sind morgens (07:00 - 10:00 Uhr) abgenommen worden.

3.5 Statistik

Die statistische Analyse wurde mit dem Programm GraphPad Prism Version 5.01 (2007) der GraphPad Software, Inc. durchgeführt.

Mittels *t*-Test (ungepaart) wurden Alter, basales Cortisol, Cortisol nach Dexamethason, SHBG, systolischer und diastolischer Blutdruck in beiden Gruppen miteinander verglichen.

Für folgende Vergleiche zwischen Kontrollgruppe und die jeweils unterschiedlichen Östrogenkonzentrationen innerhalb der Studiengruppe wurde der One-Way ANOVA Test mit Bonferroni *post hoc* benutzt: basales Cortisol, ACTH und UFC.

Da bei dem Vergleich zwischen Kontrollgruppe und den jeweils unterschiedlichen Östrogenkonzentrationen innerhalb der Studiengruppe für SHBG und Cortisol nach Dexamethason keine Normalverteilung vorlag, wurde bei diesen Berechnungen der Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Dunn's *post hoc* Test, durchgeführt.

Die Cortisolwerte nach Dexamethason-Gabe vor und nach Absetzen der Kontrazeption wurden mit dem *t*-Test (gepaart) verglichen.

Eine statistische Signifikanz wurde bei einem Konfidenzintervall von 95 % bei einem *p*-Wert von <0,05 angenommen. Die angegebenen Werte sind die durchschnittlichen Werte \pm Standardfehler (mean \pm SE).

4. Ergebnisse

4.1 Anthropometrische Daten und Blutdruck

Bezüglich des Alters der Patientinnen gab es bei den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede (Kontrollgruppe: $33,05 \pm 2,84$; Studiengruppe: $29,94 \pm 1,24$ Jahre, $p=0,33$) (Abb. 1).

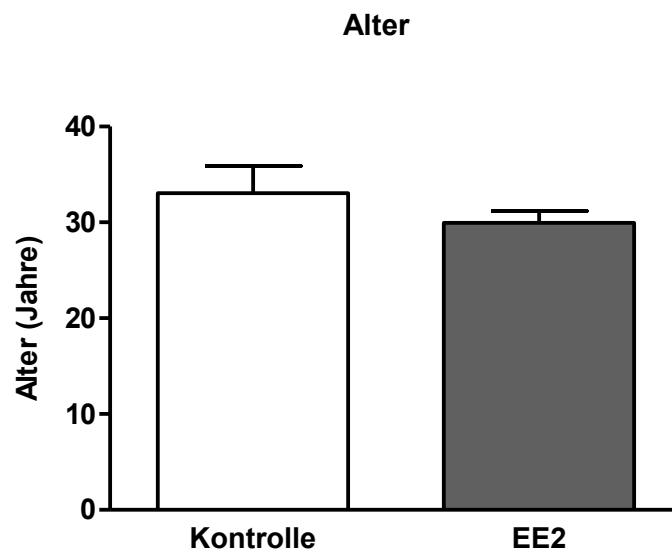


Abb. 1: Es gab keinen statistisch signifikanten Altersunterschied bei den Frauen beider Gruppen (Kontrolle = Kontrollgruppe; EE2 = Frauen mit Ethinylestradioleinnahme, Studiengruppe).

Das Gewicht bzw. der (BMI, kg/m^2) der Frauen beider Gruppen unterschied sich signifikant: die Frauen der Kontrollgruppe waren adipös, während die Frauen der Studiengruppe übergewichtig waren (Kontrollgruppe: $34,89 \pm 2,34$; Studiengruppe: $28,05 \pm 1,23 \text{ kg}/\text{m}^2$, $p=0,021$) (Abb. 2).

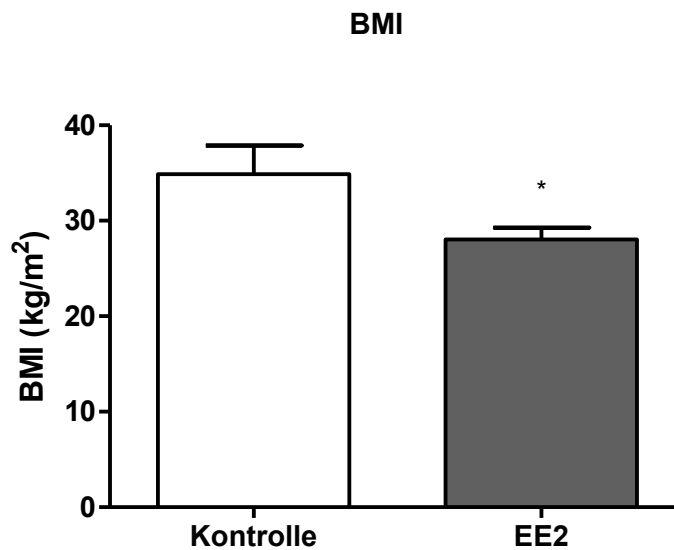


Abb. 2: Der BMI der Frauen beider Gruppen unterschied sich signifikant (Kontrolle = Kontrollgruppe; EE2 = Frauen mit Ethinylestradioleinnahme, Studiengruppe; BMI = Body-Mass-Index).

Der mittlere Blutdruck aller Patientinnen war normal und lag in der Studiengruppe etwas niedriger als in der Kontrollgruppe.

Der systolische Blutdruck war in der Studiengruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (Kontrollgruppe: $134,6 \pm 5,21$; Studiengruppe: $123,2 \pm 2,1$ mmHg, $p=0,022$). Der diastolische Blutdruck war signifikant niedriger in der Studiengruppe: (Kontrollgruppe: $83,5 \pm 3,08$; Studiengruppe: $77,4 \pm 1,34$ mmHg, $p=0,045$) (Abb. 3, 4).

Systolischer Blutdruck

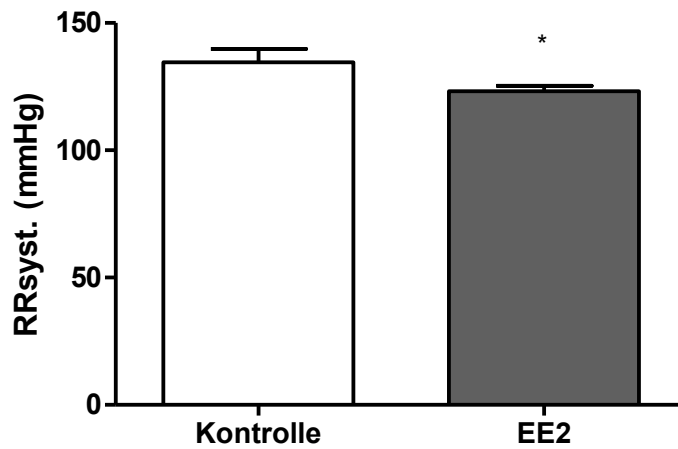


Abb. 3: Der systolische Blutdruck war signifikant niedriger bei Kontrazeptivaeinnahme (Kontrolle = Kontrollgruppe; EE2 = Frauen mit Ethinylestradioleinnahme, Studiengruppe).

Diastolischer Blutdruck

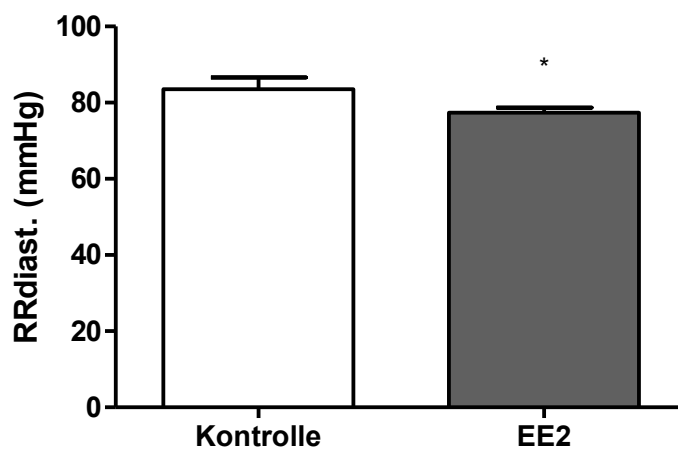


Abb. 4: Der diastolische Blutdruck war signifikant niedriger bei Kontrazeptivaeinnahme (Kontrolle = Kontrollgruppe; EE2 = Frauen mit Ethinylestradioleinnahme, Studiengruppe).

Die häufigste Indikation für die Durchführung des DST war die Hyperkortisolämie gefolgt von der Hyperandrogenämie und Gewichtszunahme. Andere Gründe waren arterielle Hypertonie, v.a. Hyperaldosteronismus, PCOS-Diagnostik, Akne, Alopezie bzw. Haarausfall, Hirsutismus, *Striae cutis*, Hyperprolaktinämie und Ödeme.

Die Patientinnen der Studiengruppe haben Östrogenpräparate (zum Teil Östrogen-Gestagenpräparate) mit folgenden Östrogenkonzentrationen eingenommen: 0,01 mg, 0,02 mg, 0,03 mg sowie 0,035 mg Ethinylestradiol pro Tag. Die meisten Frauen haben Valette (0,03 mg Ethinylestradiol) eingenommen. Die zweithäufigste Pille war Diane 35 (0,035 mg Ethinylestradiol). Deutlich weniger Frauen hatten Östrogenpräparate mit 0,02 mg Ethinylestradiol oder 0,01 mg Ethinylestradiol in Form von Östrogenpflastern oder Vaginalringen benutzt (s. Tabelle 3).

Folgende Gestagene waren in den Östrogen-Gestagen-Präparaten enthalten: Cyproteronacetat (Diane 35, Bella Hexal, Juliette), Norgestimat (Cilest), Chlormadinon (Belara), Dienogest (Valette, Lafemme), Drospirenon (Yasmin, Yasminelle, Aida), Levonorgestrel (Monostep), Gestamenstrol (Esticia), Desogestrel (Lamuna 20, Lovelle).

Tabelle 4: Eingenommene Kontrazeptiva und Gründe, die zur Diagnostik führten

	Frauen ohne orale Kontrazeption (Kontrollgruppe)	Frauen mit oraler Kontrazeption (Studiengruppe)
Eingenommenes orales Kontrazeptivum	n	n
Inhalt 0,035 mg Ethinylestradiol (Diane 35, Cilest, BellaHexal, Juliette)	-	13
Inhalt 0,03 mg Ethinylestradiol (Belara, Valette, Yasmin, Monostep, Esticia)	-	18
Inhalt 0,02 mg Ethinylestradiol (Yasminelle, Aida, Lafemme, Lamuna 20, Lovelle)	-	5
Inhalt 0,01 mg Ethinylestradiol (Presomen, Fem7ContiPflaster, Nuvaring)	-	4
Diagnose/Gründe für Diagnostik (Mehrfachnennung möglich)	n	n
Arterielle Hypertonie inklusive V.a. Hyperaldosteronismus	5	6
Adipositas/Gewichtszunahme	3	10
PCOS	4	3
Hyperandrogenämie/AGS	2	11
Hirsutismus	1	2
Sekundäre Amenorrhoe inklusive Hyperprolaktinämie	1	4
Alopezie	1	3
V.a. Hyperkortisolismus/M. Cushing	1	24
<i>n = Patientinnenzahl, ACTH = Adrenocorticotropes Hormon, SHBG = Sexhormonbindendes Globulin, DST = Dexamethason Hemmttest, PCOS = Polyzystisches Ovarialsyndrom, AGS = Androgenitales Syndrom</i>		

4.2 Der Effekt von Ethinylestradiol auf den basalen Cortisolspiegel im Blut

Entsprechend älteren Analysen stellten wir ebenso fest, dass Ethinylestradiol den basalen Cortisolspiegel im Blut erhöht. 69,6 % der Frauen unserer Studie mit Kontrazeptivaeinnahme hatten einen erhöhten basalen Cortisolspiegel (Referenzbereich 6,2 – 19,4 µg/dl). In der Kontrollgruppe hatte nur 1 der 19 Frauen einen leicht erhöhten basalen Cortisolspiegel.

Erhielten die Patientinnen ein Kontrazeptivum, so war die basale Konzentration des Cortisols im Blut etwa doppelt so hoch wie ohne ($11,59 \pm 1,15$ vs. $23,5 \pm 1,15$ µg/dl, $p < 0,0001$) (Abb. 5).

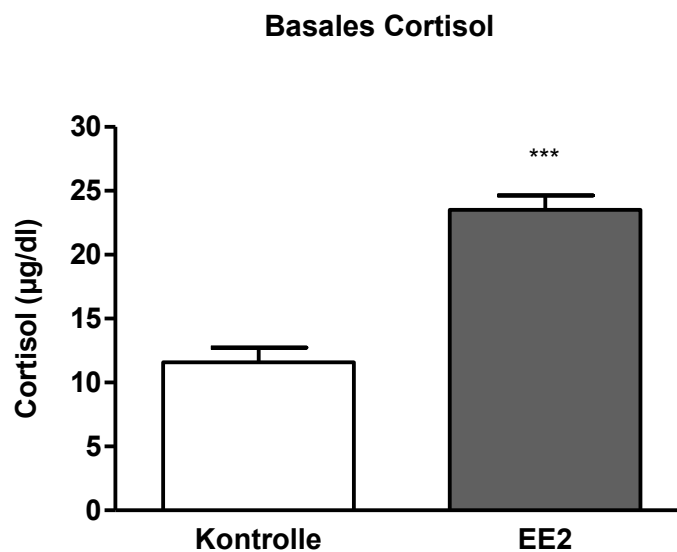


Abb. 5: Signifikanter Unterschied im basalen Cortisolspiegel zwischen den beiden Gruppen (Kontrolle = Kontrollgruppe; EE2 = Frauen mit Ethinylestradioleinnahme, Studiengruppe).

Um den Effekt der Ethinylestradioldosierung auf den basalen Cortisolspiegel zu untersuchen teilten wir die Frauen je nach Inhalt des Hormonpräparates (0,01 mg, 0,02 mg, 0,03 mg und 0,035 mg Ethinylestradiol) in vier Subgruppen ein. Wir verglichen die basalen Cortisolspiegel dieser Subgruppen

- a) mit dem basalen Cortisolspiegel der Kontrollgruppe (Abb. 6)
- b) untereinander (Abb. 7)

Bei beiden Vergleichen konnte ein dosisabhängiger Effekt von Ethinylestradiol auf den basalen Cortisolspiegel im Blut festgestellt werden (Abb. 6, 7).

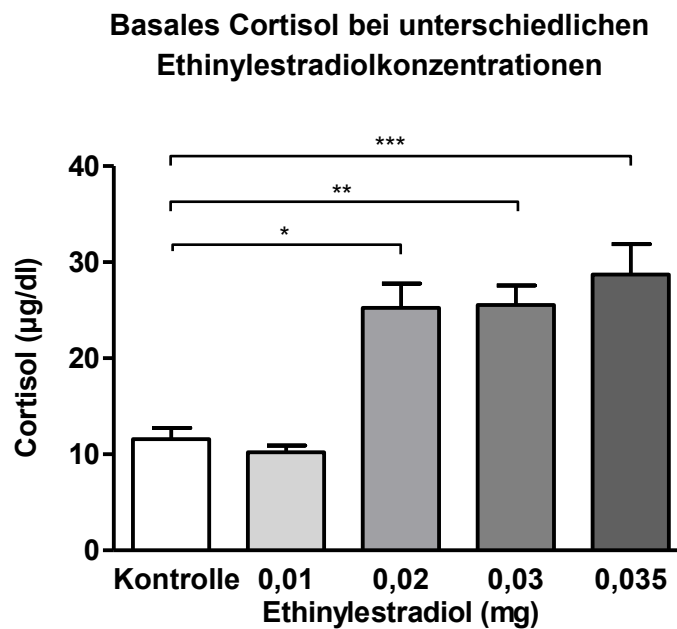


Abb. 6: Signifikante Unterschiede im basalen Cortisolspiegel bei unterschiedlichen Ethinylestradiolkonzentrationen in der Studiengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle = Kontrollgruppe).

Basales Cortisol bei unterschiedlichen Ethinylestradiolkonzentrationen

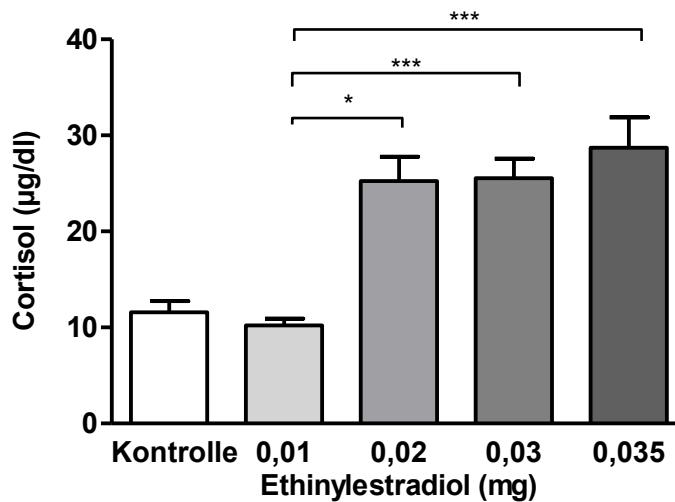


Abb. 7: Signifikante Unterschiede im basalen Cortisolspiegel in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Ethinylestradiolkonzentrationen innerhalb der Studiengruppe (Kontrolle = Kontrollgruppe).

Wie auf der Abbildung 6 gezeigt, führte die Einnahme von über 0,02 mg Ethinylestradiol zu einem signifikanten Anstieg des basalen Cortisolspiegels verglichen mit der Kontrollgruppe (Kontrolle vs. 0,02 mg, $p < 0,05$; Kontrolle vs. 0,03 mg, $p < 0,001$; Kontrolle vs. 0,035 mg, $p < 0,001$).

Auch beim Vergleich zwischen den unterschiedlichen Ethinylestradioldosierungen innerhalb der Studiengruppe gab es signifikante Unterschiede mit steigender Signifikanz (0,01 vs. 0,02 mg, $p < 0,05$; 0,01 vs. 0,03 mg, $p < 0,01$ und 0,01 vs. 0,035 mg, $p < 0,001$). Das spricht für eine dosisabhängige Erhöhung des basalen Cortisols durch Ethinylestradiol (Abb. 7).

Als Surrogatparameter für CBG analysierten wir die uns zur Verfügung stehenden SHBG-Werte. Abbildung 8 zeigt, dass der SHBG-Spiegel durch die Kontrazeptivaeinnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ist ($56,13 \pm 19,95$ vs. $143,9 \pm 10,0$ nmol/l, $p=0,0004$). Der SHBG-Wert war bei 68 % der Frauen mit Kontrazeptivaeinnahme erhöht (erhöht bei 23 Frauen, insgesamt 34 verfügbare SHBG-Werte). Der Referenzbereich für nicht-schwangere Frauen betrug 18 - 144 nmol/l.

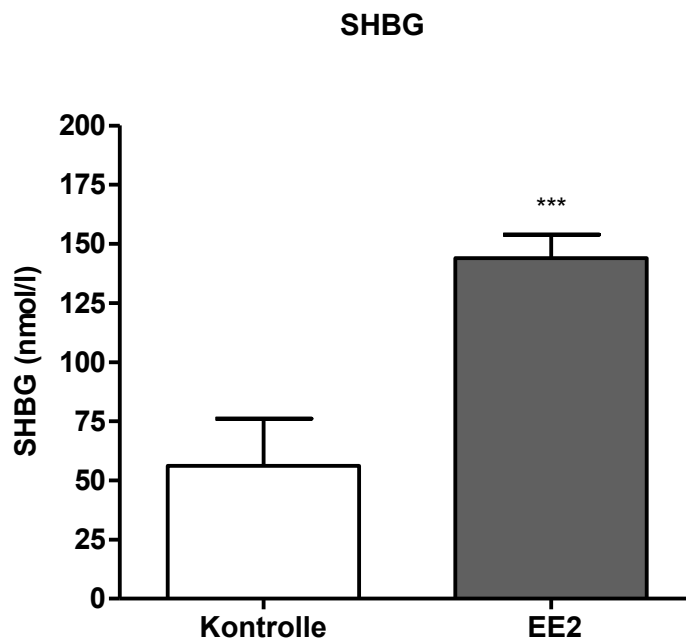


Abb. 8: Der SHBG-Spiegel im Serum ist bei Kontrazeptivaeinnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (Kontrolle = Kontrollgruppe, EE2 = Frauen mit Ethinylestradioleinnahme, Studiengruppe, SHBG = Sexualhormon-bindendes Globulin).

Eine dosisabhängige Erhöhung des SHBG ist in der Abbildung 9 ab der Dosis 0,02 mg zu erkennen, mit einer statistischen Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ab 0,03 mg Ethinylestradiol ($p < 0,01$). Dieser Effekt spiegelt sich auch im Cortisolwert im Serum wider, der ab 0,02 mg Ethinylestradiol signifikant erhöht ist (Abb. 6). Für die Östrogendosierung 0,01 mg lag uns leider nur bei einer Patientin der SHBG Wert vor, sodass keine statistische Analyse möglich war.

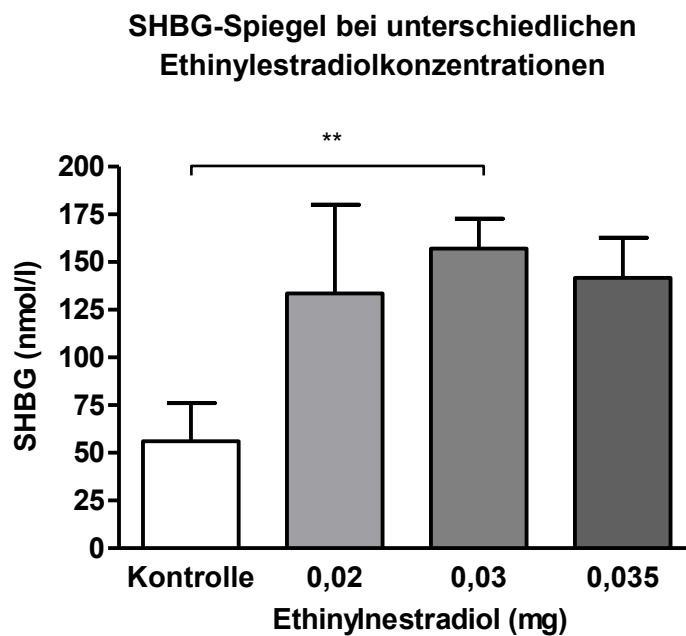


Abb. 9: Der SHBG-Spiegel im Serum ist bei einer Ethinylestradioldosis von 0,03 mg im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (Kontrolle = Kontrollgruppe, SHBG = Sexualhormonbindendes Globulin).

4.3 Der Effekt von Ethinylestradiol auf die Ergebnisse des Dexamethason-Hemmtestes (DST)

Wie auf der Abbildung 10 deutlich zu erkennen ist, war der Cortisolspiegel im Blut nach dem 1 mg-DST bei Frauen mit Kontrazeptivaeinnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ($0,74 \pm 0,1$ vs. $1,97 \pm 0,18$ $\mu\text{g/dl}$, $p < 0,0001$).

Den Grenzwert im DST setzten wir bei einem Cortisolwert von $1,8$ $\mu\text{g/dl}$. 37 % der Patientinnen mit Kontrazeptivaeinnahme zeigten eine inadäquate Suppression des Cortisols, während fast alle Frauen der Kontrollgruppe eine normale Suppression zeigten (Abb. 10). Eine Frau aus der Kontrollgruppe hatte einen leicht erhöhten Cortisolwert nach dem DST (2 $\mu\text{g/dl}$).

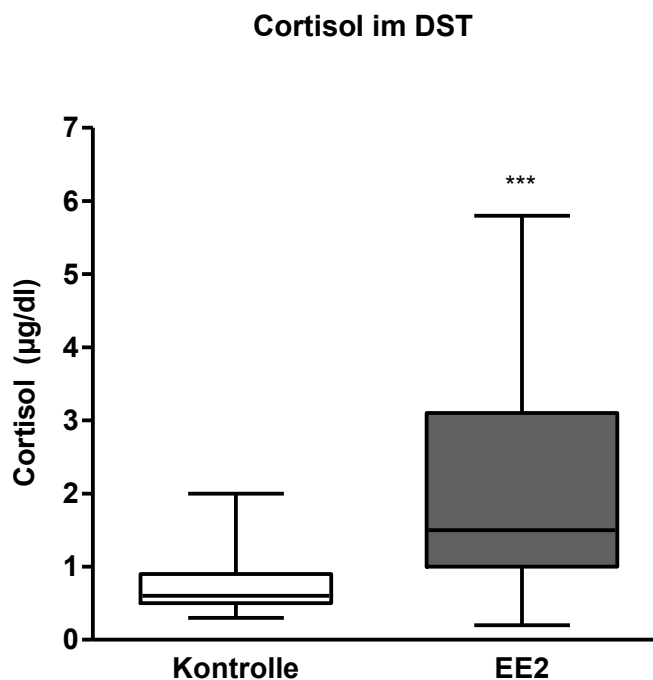


Abb. 10: Signifikant erhöhter Cortisolspiegel im 1 mg-DST bei Kontrazeptivaeinnahme (Kontrolle = Kontrollgruppe; EE2 = Frauen mit Ethinylestradioleinnahme, Studiengruppe; DST = Dexamethason-hemmtest).

Darüber hinaus fanden wir einen eindeutigen dosisabhängigen Effekt von Ethinylestradiol auf den Cortisolspiegel nach Dexamethason-Gabe (Abb. 11). Bei den unterschiedlichen Ethinylestradioldosierungen gab es im Vergleich aller Paare untereinander sowie gegenüber der Kontrollgruppe signifikante Unterschiede nur bei den Paaren Kontrollgruppe vs. 0,03 mg ($p < 0,01$) und Kontrollgruppe vs. 0,035 mg ($p < 0,05$) (Abb. 11).

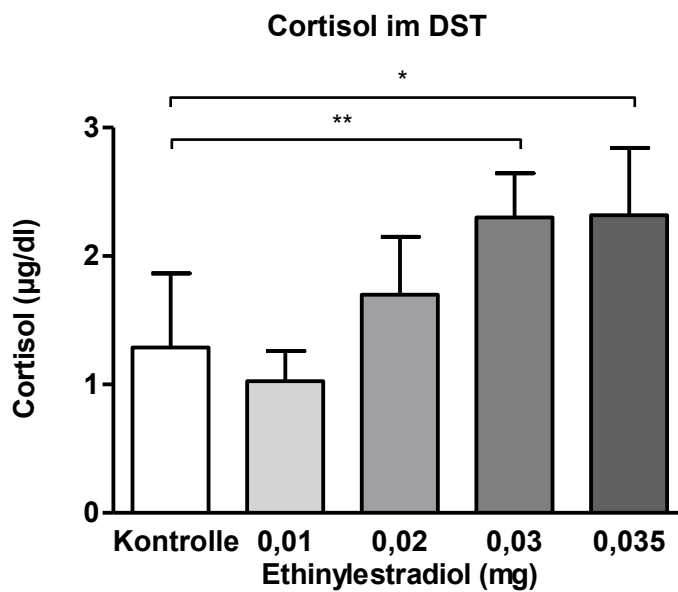


Abb. 11: Statistisch signifikante, dosisabhängige Wirkung der Kontrazeptivaeinnahme auf den Cortisolspiegel im 1 mg-DST ab 0,03 mg Ethinylestradiol (Kontrolle = Kontrollgruppe; DST = Dexamethasonhemmtest).

Bei einer Subgruppe (n=11) der Studiengruppe mit initial inadäquater Cortisol-suppression im DST unter oraler Kontrazeption (mittlerer Cortisolspiegel im DST $3,72 \pm 0,36 \mu\text{g/dl}$), wurde ein zweiter DST zwei Monate nach dem ersten DST sowie nach Absetzen der oralen Kontrazeption durchgeführt. Alle Frauen zeigten eine normale Suppression nach Gabe von 1 mg Dexamethason (mittlerer Cortisolspiegel im DST $0,9 \pm 0,16 \mu\text{g/dl}$). Der Unterschied war mit einem p -Wert von $<0,0001$ statistisch signifikant (Abb. 12).

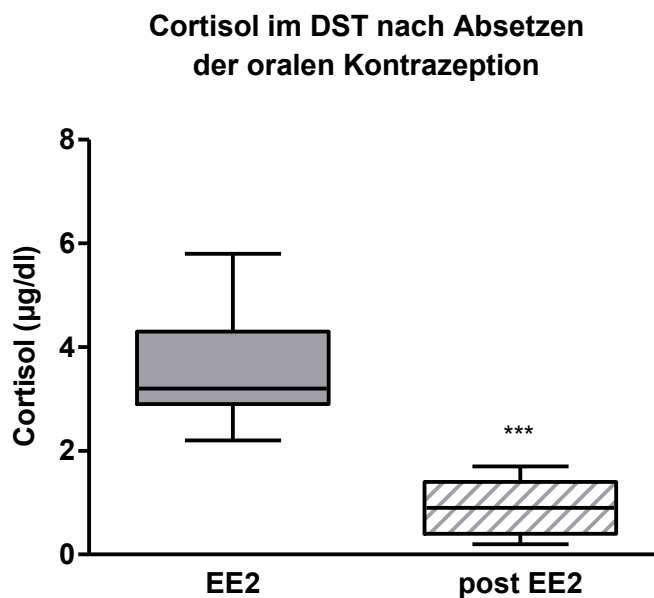


Abb. 12: Signifikant niedrigerer Cortisolspiegel im 1 mg-DST nach Absetzen der oralen Kontrazeption (EE2 = Frauen mit Ethinylestradioleinnahme; post EE2 = nach Absetzen der oralen Kontrazeption, DST = Dexamethasonhemmtest).

4.4 Der Effekt von Ethinylestradiol auf das freie Cortisol im Urin (UFC)

Die Menge des im Urin ausgeschiedenen Cortisols soll den biologisch aktiven freien Cortisolspiegel repräsentieren. Wir sind daher davon ausgegangen, dass das UFC von der Östrogeneinnahme nicht beeinflusst wird und benutzten UFC als zusätzliches Hilfsmittel für die Diagnostik des Hyperkortisolismus unter Kontrazeptivaeinnahme. Allerdings konnte bei 30 % der Patientinnen mit Kontrazeptivaeinnahme (7 aus 21 uns verfügbaren UFC-Werten) ein erhöhter UFC-Wert gemessen werden (Schwellenwert 80 µg/24h, gepunktete Linie in der Abbildung 13). Der mittlere UFC-Wert aller Patientinnen mit Kontrazeptivaeinnahme betrug $72,10 \pm 7,57$ µg/24h.

Zur Bestätigung des Effektes der oralen Kontrazeption auf das UFC schlossen wir weitere 8 Frauen aus der gleichen Kohorte (Vorstellung und Diagnostik aus den gleichen Gründen, Kontrazeptivaeinnahme, Alter 26 - 64 Jahre) in die Berechnung mit ein. Auch dann ergab sich bei 38 % (11 aus 29 verfügbaren Werten) ein erhöhter UFC-Wert. Der mittlere UFC-Spiegel betrug $71,11 \pm 6,06$ µg.

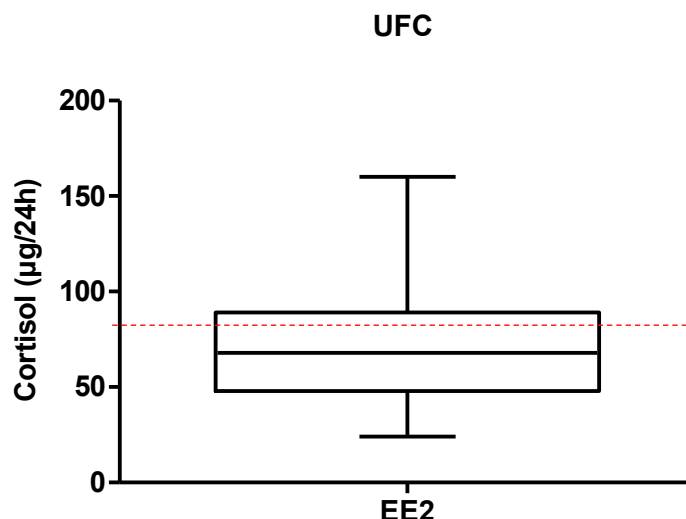


Abb. 13: Der UFC-Wert war bei 30 % der Frauen mit Kontrazeptivaeinnahme erhöht (Grenzwert (gepunktete Linie): 80 µg/24h, EE2 = Frauen mit Ethinylestradioleinnahme, UFC = freies Cortisol im Urin).

Ein dosisabhängiger Effekt von Östrogenen auf den UFC-Spiegel konnte trotz einer sichtbaren Tendenz in diese Richtung nicht nachgewiesen werden. (Abb. 14). Leider lagen uns keine UFC-Werte bei der Kontrollgruppe vor, sodass keine statistische Analyse zwischen Kontrollgruppe und Studiengruppe möglich war. Bei der Dosierung 0,01 mg Ethinylestradiol lag uns nur ein UFC-Wert vor, weshalb ebenfalls keine statistische Analyse durchgeführt wurde.

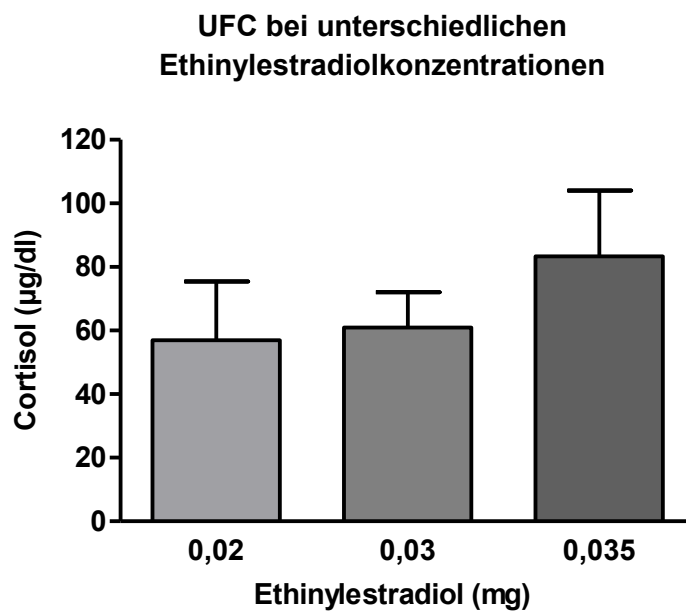


Abb. 14: Der UFC-Wert zeigt eine steigende Tendenz bei höheren Ethinylestradioldosierungen ohne statistische Signifikanz.

Der basale ACTH-Spiegel scheint auch durch die Kontrazeptivaeinnahme beeinflusst zu sein, was ein Hinweis auf einen Einfluss der oralen Kontrazeption auf das freie Cortisol darstellt. Die Frauen der Studiengruppe hatten einen niedrigeren ACTH-Spiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant ($16,11 \pm 2,17$ vs. $13,16 \pm 1,21$ pg/ml, $p=0,097$) (Abb. 15). Der Referenzwert betrug 7,2 - 63 pg/ml.

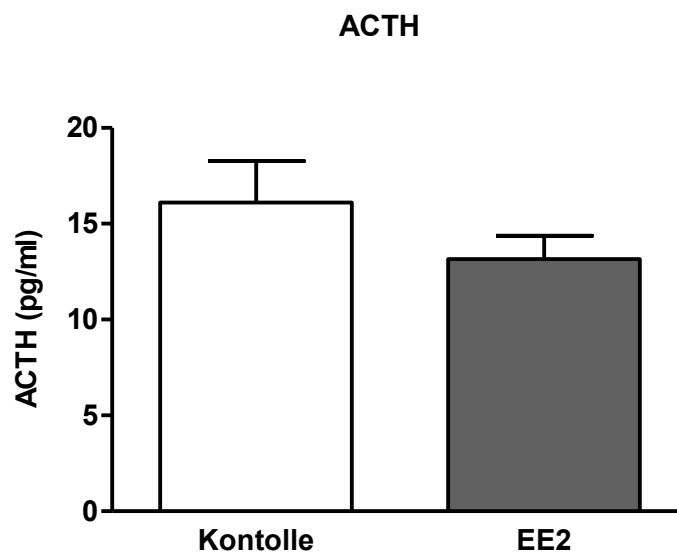


Abb. 15: Der ACTH-Spiegel ist bei Kontrazeptivaeinnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt (Kontrolle = Kontrollgruppe; EE2 = Frauen mit Ethinylestradioleinnahme, Studiengruppe; ACTH = Adrenokortikotropes Hormon).

Ein Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Ethinylestradiol-dosierungen und dem ACTH-Spiegel konnte nicht beobachtet werden (Abb. 16).

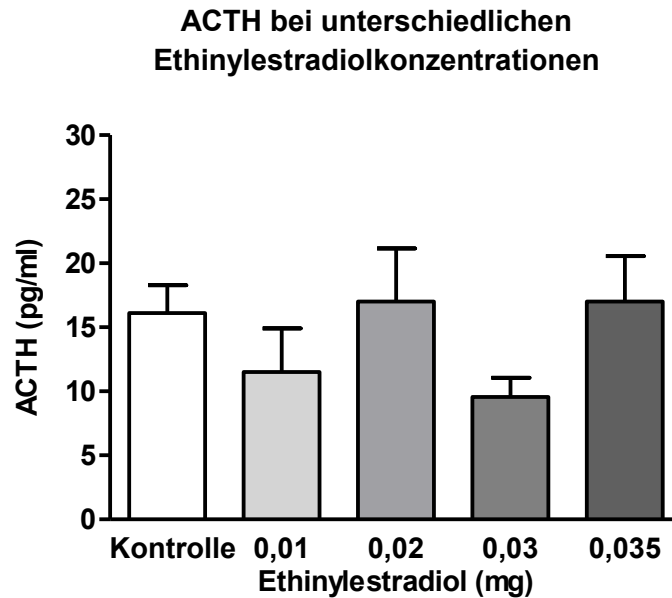


Abb. 16: Es ließ sich kein signifikanter Unterschied des ACTH-Spiegels bei den unterschiedlichen Ethinylestradioldosierungen erkennen. (Kontrolle = Kontrollgruppe; ACTH = Adrenokortikotropes Hormon).

4.5 Longitudinale Untersuchungen: *Follow-up*

Zwei bis fünf Jahre nach Erstvorstellung führten wir ein telefonisches *Follow-up* durch. Wir konnten 35 der Patientinnen der Studiengruppe erreichen und erfragten folgende klinische Charakteristika: Akne, Gewichtszunahme, *Striae rubrae*, Hirsutismus. Keine der Patientinnen mit initial pathologischem DST entwickelte klinische oder laborchemische Zeichen eines Hyperkortisolismus. Drei der Patientinnen, die allerdings initial einen normalen DST hatten, beschwerten sich über Gewichtszunahme und Akne.

Bei 22 der Patientinnen der Studiengruppe war zudem eine Wiedervorstellung in unserer Klinik erfolgt; bei keiner der Patientinnen war ein Morbus Cushing dokumentiert.

5. Diskussion

Die Diagnose des Hyperkortisolismus während Kontrazeptivaeinnahme ist anspruchsvoll (Paschali *et al.*, 2013), unter anderem, weil die darunter häufig auftretenden Nebenwirkungen (Gewichtszunahme, Flüssigkeitsretention) die Unterscheidung zwischen tatsächlich erkrankten Patienten und falsch-positiven Testergebnissen erschwert.

Dass die basalen Cortisolwerte in diesen Fällen nicht richtungsweisend sind, ist gut belegt (Nieman *et al.*, 2008; Perogamvros *et al.*, 2010; Vogeser *et al.*, 2002). In unserer Studie fanden wir dazu übereinstimmend erhöhte basale Cortisolwerte bei etwa zwei Drittel und eine inadäquate Suppression des Cortisols im DST bei ungefähr einem Drittel der untersuchten Frauen mit Kontrazeptivaeinnahme.

Interessanterweise ist ein Ethinylestradiol-abhängiger Anstieg des basalen Serumcortisolspiegels bei Patientinnen unserer Studie mit Kontrazeptivaeinnahme beobachtet worden. Es ist bemerkenswert, dass in den bisher durchgeführten Studien die Östrogenkonzentrationen pro Tag, wenn überhaupt bekannt, über 0,03 mg betragen (Nickelsen *et al.*, 1989; Domisse *et al.*, 1985; Anseau *et al.*, 1993). Im Allgemeinen waren die Östrogenkonzentrationen der oralen Kontrazeptiva vor den 1980er Jahren deutlich höher als heute und enthielten meist mehr als 0,05 mg Ethinylestradiol pro Tag (White Junod und Marks, 2002).

Unsere Ergebnisse sprechen für einen dosisabhängigen Effekt der Kontrazeptivaeinnahme auf die basalen Cortisolwerte. Wir fanden einen signifikanten Spiegelunterschied gegenüber der Kontrollgruppe und innerhalb der Studiengruppe beim Vergleich der Tagesdosen von sowohl 0,01 mg vs. 0,02 mg, 0,01 mg vs. 0,03 mg als auch 0,01 mg vs. 0,035 mg Ethinylestradiol pro Tag (Abb. 6, 7).

Ebenso konnten wir einen dosisabhängigen Effekt der Kontrazeptivaeinnahme auf die supprimierte Cortisolwerte (Cortisol nach Dexamethason-Gabe) feststellen (signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und Studiengruppe mit jeweils Tagesdosis 0,03 mg und 0,035 mg Ethinylestradiol; Abb. 11).

Der Großteil des basalen Cortisolanstiegs ist vermutlich auf die Messung des höheren Anteils an gebundenem Cortisol aufgrund der Konzentrationserhöhung

von CBG zurückzuführen und scheint eine maximale Sättigung zu erreichen (Trainer, 2002; Musa *et al.*, 1965; Doe *et al.*, 1967). Laut Smith *et al.* ist die Konzentrationen der CBG-Bindungsstellen im Plasma von Frauen mit Kontrazeptivaeinnahme fast doppelt so hoch sind wie im Plasma unbehandelter Frauen, wobei die chemischen Eigenschaften und die Affinität für Cortisol unverändert bleiben (Smith *et al.*, 1980). Dieser Effekt wird einem Östrogen- α -Rezeptor-abhängigen Mechanismus zugeschrieben (Gagliardi *et al.*, 2010; Nader *et al.*, 2006).

Im Gegensatz dazu fanden Scott *et al.* bei Einnahme von Kontrazeptionspräparaten mit weniger als 0,035 mg Ethinylestradiol pro Tag erhöhte CBG-Werte im Blut, jedoch ein normales basales (und ungebundenes) Cortisol. Dies könnte darauf hinweisen, dass die CBG-Erhöhung alleine den Anstieg des basalen Cortisols bei Frauen mit Kontrazeptivaeinnahme nicht ausreichend erklären kann. Auch in der Schwangerschaft kann der Anstieg des basalen Cortisols nicht allein durch die CBG-Erhöhung erklärt werden. Dort scheint ein „Zurücksetzen“ (*resetting*) der Sensitivität der HPA-Achse für Cortisol unter dem Einfluss der steigenden Östrogenkonzentrationen die Ursache für den Anstieg der basalen und freien Cortisolkonzentrationen zu sein. Das erhöhte ungebundene Cortisol könnte das cushingoide Aussehen von Frauen kurz vor der Entbindung erklären (Scott *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1980). In der Plazenta wird Cortisol durch das Enzym 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2 zu Cortison abgebaut. So wird der Fetus vor Hyperkortisolämie geschützt (Trainer, 2002).

Im Gegensatz zur oralen Kontrazeption scheint eine transdermale Östrogenapplikation keine Erhöhung des CBG zu verursachen (Qureshi *et al.*, 2007). Somit ist laut Newell-Price *et al.* bei transdormaler Östrogenapplikation eine Östrogenpause vor der Durchführung eines DSTs nicht unbedingt notwendig (Newell-Price *et al.*, 1998). In unserer Studie erhielt nur eine Patientin eine transdermale Östrogenapplikation, weshalb hier keine Analyse möglich war.

Da der CBG-Spiegel im Blut nicht Teil unserer Routineanalysen war, bestimmten wir stattdessen den SHBG-Spiegel, was eine Limitierung unserer Studie darstellt. Jedoch korreliert der SHBG-Anstieg unter Kontrazeptivaeinnahme wahrscheinlich mit dem CBG-Anstieg, denn SHBG und CBG scheinen ähnlich von der oralen Kontrazeption beeinflusst zu werden

(Jung-Hoffmann *et al.*, 1992; White *et al.*, 2006). Tatsächlich wurde ein bis zu 1,6- bzw. 1,8-facher Anstieg bei SHBG- und CBG-Konzentrationen bei Kontrazeptivaeinnahme gemessen (Endrikat *et al.*, 2002).

69,6 % der Frauen mit Kontrazeptivaeinnahme hatten einen erhöhten basalen Cortisolspiegel (Abb. 5). 37 % der Frauen mit Kontrazeptivaeinnahme zeigten eine inadäquate Suppression im DST (*Cut-off* 1,8 µg/dl) (Abb. 10). In der Gruppe mit der inadäquaten Suppression, präsentierten alle Patientinnen, die nach Absetzen der oralen Kontrazeption für 6 Wochen ein erneuter DST bekamen, eine normale Suppression. Analog dazu entwickelte keine der Patientinnen klinische Symptome eines Hyperkortisolismus nach einem *Follow-up* von 2 - 5 Jahren. Dies weist darauf hin, dass der erste, pathologische DST auf die orale Kontrazeption zurückzuführen und demnach ohne pathologische Signifikanz ist.

Die meisten Studien definieren eine normale Suppression im DST mit einem *Cut-off* Cortisolwert von <5 µg/dl (<140 nmol/l). Da manche Patienten mit Morbus Cushing teilweise doch eine Suppression im DST vorweisen, kann es bei diesem *Cut-off* Wert in bis zu 15 % der Fälle zu falsch negativen Ergebnissen kommen (Findling *et al.*, 2004; Nieman *et al.*, 2008). Deshalb wird empfohlen, einen niedrigeren *Cut-off* Wert für die Suppression von Cortisol nach Dexamethason-Gabe zu benutzen und zwar <1,8 µg/dl (50 nmol/l). So kann eine Sensitivität von >95 % erreicht werden (Nieman *et al.*, 2008). Allerdings muss auch der benutzte Cortisol-Assay eine hohe Sensitivität haben (ab 1 µg/dl oder 27,6 nmol/l Cortisol im Plasma) (Castro und Moreira, 2007).

Die Spezifität würde bei einer Erhöhung des Schwellenwerts auf 5 µg/dl auf >95 % steigen; da man in der Regel Testverfahren mit höherer Sensitivität anstrebt, wird davon abgeraten (Nieman *et al.*, 2008; Pecori Giraldi *et al.*, 2007). Somit erwartet man bei der Schwelle von <1,8 µg/dl auch eine höhere Rate von falsch positiven Ergebnissen, die man aber in Kauf zugunsten der einfachen Ausschlussmöglichkeit eines endogenen Cushing-Syndroms mit dem DST bei ambulanten Patienten und der hohen Sensitivität nimmt (Newell-Preis *et al.*, 1998).

Abgesehen von den in der Vergangenheit deutlich höheren Schwellenwerten im DST, könnte die Östrogenkonzentration in den unterschiedlichen Präparaten ein weiterer Grund für die widersprüchlichen Ergebnisse in der Literatur sein. In der Tat wurde dies in keiner der uns bekannten, vergangenen Studien

systematisch untersucht. Unsere Daten sprechen für einen dosisabhängigen Effekt der Östrogenkonzentration auf die Cortisolkonzentrationen nach dem DST.

Das Detektionsproblem des proteingebundenen Cortisols lässt sich größtenteils durch die Analyse von Speichel- und Urin lösen, welche die Konzentration des ungebundenen Cortisols reflektieren sollen. Frühere Berichte (Grant *et al.*, 1965; Burke, 1969; Baumann, 1983; Yu *et al.*, 1988) fanden keine signifikante Erhöhung des UFC bei Frauen mit Kontrazeptivaeinnahme. Bei der Studie von Yu *et al.* handelte es sich um Präparate mit 0,035 mg Ethinylestradiol pro Tag, bei den anderen Studien um höhere Dosierungen: 0,06 - 0,1 mg Mestranol oder 0,05 - 0,1 mg Ethinylestradiol pro Tag.

Im Gegensatz dazu konnten wir bei über 30 % unserer Patientinnen eine erhöhte Cortisoldiurese messen. Es gibt verschiedene Erklärungsmodelle dafür. Zum einen konnten Glasow *et al.* Prolaktinrezeptoren in allen Zonen der Nebennierenrinde nachweisen. Da bekannt ist, dass Estradiol den Prolaktinspiegel erhöhen kann (Aquino *et al.*, 2016; Neill *et al.*, 1971), lässt sich eine direkte Wirkung von Prolaktin auf die Steroidbiosynthese der Nebenniere vermuten (Glasow *et al.*, 1996). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass Estradiol durch Erhöhung der ACTH- und Prolaktinausschüttung zu einer Hypersekretion von Corticosteron in den Nebennierenrindenzellen von Ratten führen kann (Nowak *et al.*, 1995; Lo *et al.*, 2000). Es bleibt noch zu klären, ob dies auch für den Menschen gilt und wenn ja, welche klinische Relevanz dieses Phänomen besitzt. Eine weitere Erklärung könnte die Hypothese sein, dass es unter Östrogen Therapie (und in der Schwangerschaft) zu einer Cortisolresistenz in peripheren Geweben und im zentralen Nervensystem kommt. Dies soll zu einem „Resetting“ der HPA-Achse und zu einem höheren Sollwert für das negative Feedback der ACTH-Ausschüttung führen (Baumann, 1993; Nolten *et al.*, 1980). Dadurch könnte die Erhöhung des ungebundenen Cortisols erklärt werden.

Sharma *et al.* untersuchten in einer Studie die ACTH-Konzentrationen bei postmenopausalen Frauen, die mit Östrogenen (2 mg Estradiol/die) vorbehandelt worden waren im Vergleich zu Frauen ohne Östrogenbehandlung sowie im Vergleich zu Männern mit und ohne Testosteronbehandlung. Bei postmenopausalen Frauen mit Östrogenbehandlung war die ACTH-Konzentration niedriger. Die Erhöhung des Cortisol-vermittelten negativen

Feedbacks für ACTH-Sekretion durch Estradiol konnte eine Ursache darstellen (Sharma *et al.*, 2014).

In dieser Hinsicht ist es interessant, dass wir eine Tendenz zu einem niedrigen ACTH-Spiegel bei Patienten unter Kontrazeptivaeinnahme beobachten konnten. Diese Differenz war nicht statistisch signifikant, könnte aber auf einen leicht erhöhten Spiegel des freien Cortisols bei Kontrazeptivaeinnahme hinweisen.

Auch Doe *et al.* fanden in ihrer Studie signifikant erhöhtes ungebundenes Cortisol morgens (9:00 Uhr) bei Frauen, die 200 µg pro Tag Ethinylestradiol eingenommen haben und diskutieren ebenso das „Resetting“ der HPA-Achse als Ursache für den Spiegelanstieg (Doe *et al.*, 1969). Plager *et al.* konnten auch bei männlichen Patienten unter Östrogenbehandlung (Stilbestrol) drei- bis vierfach erhöhtes, ungebundenes Plasmacortisol nachweisen (Plager *et al.*, 1964).

Lindholm und Schulz-Möller fanden übereinstimmend dazu morgens und abends signifikant erhöhtes UFC bei Schwangeren und Frauen mit Kontrazeptivaeinnahme (0,05 mg Ethinylestradiol oder 0,1 mg Mestranol pro Tag), jeweils im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (Lindholm und Schulz-Möller, 1973). Die Annahme, dass die Disposition des ungebundenen Cortisols unter Östrogentherapie unverändert bleibt, konnten Perogamvros *et al.* widerlegen. Sie konnten zeigen, dass die Pharmakokinetik des ungebundenen Cortisols deutlich durch Östrogene verändert wird und dass Frauen unter Östrogentherapie eine langsamere Clearance und eine längere Halbwertszeit des ungebundenen Cortisols haben. Diese Effekte konnten sie im Speichelcortisol und -cortison nachweisen (Perogamvros *et al.*, 2010).

Die veränderte Clearance könnte aus dem verminderten Abbau von Cortisol als Folge der östrogengesteuerten Inhibition der 5 α -Reduktase in der Leber resultieren (Perogamvros *et al.*, 2010; Finken *et al.*, 1999). Ein weiterer denkbarer Mechanismus ist eine östrogenbedingte Abnahme von IGF-I (*Insulin-like growth factor 1*). IGF-1 hemmt die Reaktivierung von Cortison in Cortisol durch das Enzym 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1 (Perogamvros *et al.*, 2010; Moore *et al.*, 1999; Low *et al.*, 1993).

Um den möglichen direkten Effekt der Östrogene auf die menschliche Nebennierenrinde zu erfassen, sind weitere Studien nötig. Laut unseren Ergebnissen jedoch können wir darauf schließen, dass die Messung des UFC

kein valides Instrument für die Hyperkortisolismusdiagnostik während Östrogeneinnahme ist.

Gegen die Messung des UFC während Östrogeneinnahme spricht auch die Tatsache, dass Patienten mit einem Pseudo-Cushing-Syndrom ebenfalls eine (wenn auch teilweise milde) Erhöhung des UFC vorweisen. Bei diesen Patienten wird eher zu einem der anderen diagnostischen Tests als zu dem UFC geraten (Papanicolaou *et al.*, 1998; Alwani *et al.*, 2014; Nieman, 2015).

Unserer Publikation folgend berichteten Boisseau *et al.* ebenso über eine Erhöhung des UFC-Spiegels bei Frauen mit Kontrazeptivaeinnahme (Boisseau *et al.*, 2013). Dies könnte auf die Annahme, dass das Speichelcortisol dem biologisch aktiven freien Cortisol entspricht und somit den Status der HPA-Achse widerspiegelt (Gozansky *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 1990; Šimůnková *et al.*, 2008) einen Schatten werfen.

Gozansky *et al.* berichteten aber auch von einer Verbesserung der linearen Korrelation zwischen Speichel- und Serumbasalcortisol, nachdem man die Frauen mit Kontrazeptivaeinnahme (oder mit einem aus anderen Gründen erhöhten CBG) aus den Berechnungen entfernte (Gozansky *et al.*, 2005). Dies könnte den Verdacht erhärten, dass Östrogene doch einen Einfluss auf das Speichelcortisol haben können.

Der Einfluss der Kontrazeptivaeinnahme auf die basalen und stimulierten (1 µg-ACTH-Test) Serum- und Speichelcortisolspiegel ist auch von Šimůnková *et al.* untersucht worden. Da der Speichelcortisolspiegel nach ACTH-Gabe im Gegenzug zum erhöhten Serumcortisolspiegel unverändert war, kamen sie zu dem Ergebnis, dass das Speichelcortisol für die Beurteilung der Nebennierenfunktion bei Frauen unter Kontrazeptivaeinnahme geeignet ist (Šimůnková *et al.*, 2008). Dies belegt auch die Studie von Perogamvros *et al.* (Perogamvros *et al.*, 2010).

Die Messung des Speichelcortisols wird jedoch auch durch die Aktivität der 11β-Hydroxysteroiddehydrogenase in der Parotis beeinflusst, welche Cortisol zu Cortison umwandelt. Es gibt hierzu Beweise, dass das Speichelcortison besser mit dem freien Serumcortisol korreliert, als das Speichelcortisol (Perogamvros *et al.*, 2010).

6. Schlussfolgerungen

In Übereinstimmung mit allen bislang publizierten Studien fanden wir heraus, dass orale Kontrazeption zu einer Erhöhung des basalen Cortisolspiegels führt. Durch den Vergleich der basalen Cortisolspiegel sowie der Cortisolspiegel nach Dexamethason-Gabe bei unterschiedlichen Ethinylestradioldosierungen (0,01 mg, 0,02 mg, 0,03 mg, 0,035 mg) konnten wir zeigen, dass dieser Effekt dosisabhängig ist.

Auch der SHBG-Spiegel zeigte sich bei Kontrazeptivaeinnahme bei 68 % der Fälle erhöht; ebenso dosisabhängig.

Die Durchführung eines DST während der Einnahme von oralen Kontrazeptiva führte in unserer Studie bei 37 % der Fälle zu falsch positiven Ergebnissen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Das UFC war im Gegensatz zu der bisherigen Literatur durch orale Kontrazeptiva bei 30 % der Fälle erhöht. Dies weist darauf hin, dass Östrogene nicht nur den basalen, sondern auch den freien Cortisolspiegel erhöhen können. Deshalb ist die UFC-Bestimmung bei Kontrazeptivaeinnahme nur mit Einschränkung, beziehungsweise nur zum Ausschluss eines Hyperkortisolismus geeignet ist.

Da das Speichelcortisol ebenso den freien Cortisolspiegel wiedergibt, könnte seine Eignung zur Diagnostik bei Frauen mit Kontrazeptiva ebenso in Frage gestellt werden. Zur Bestätigung dieser Annahme sind weitere Studien notwendig.

Unsere Empfehlungen bei Patientinnen mit klinischem Verdacht eines endogenen Hyperkortisolismus sind die gründliche Erhebung der Anamnese sowie die Unterbrechung der oralen Kontrazeption und darauffolgend die Evaluation mittels DST.

7. Literaturverzeichnis

1. **Aquino, N. S. S., Araujo-Lopes, R., Batista, I. A. R., Henriques, P. C., Poletini, M. O., Franci, C. R., Reis A.M., Szawka, R. E., 2016.** Hypothalamic effects of tamoxifen on oestrogen regulation of luteinizing hormone and prolactin secretion in female rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 28(1).
2. **Alwani, R. A., Jongbloed, L. W. S., Jong, F. H. de, Lely, A. J. van der, Herder, W. W. de, & Feelders, R. A., 2014.** Differentiating between Cushing's disease and pseudo-Cushing's syndrome: comparison of four tests. *European Journal of Endocrinology*, 170(4), 477–486.
3. **Anderson, D. C., 1974.** Sex-hormone-binding globulin. *Clinical Endocrinology*, 3(1), 69–96.
4. **Anseau, M., Lebouille, D., Sulon, J., von Frenckell, R., & Legros, J. J., 1993.** Oral contraceptives and the dexamethasone suppression test. *Psychoneuroendocrinology*, 18(1), 37–43.
5. **Arriza, J.F., Simerly, R.B., Swanson, L.W., Evans, R.M., 1988.** The neuronal mineralocorticoid as a mediator of glucocorticoid receptor response. *Neuron*, 1, 887–900.
6. **Baumann, G., 1983.** Estrogens and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in man: evidence for normal feedback regulation by corticosteroids. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 57, 1193–1197.
7. **Beishuizen, A., Thijs, L. G., & Vermes, I., 2001.** Patterns of corticosteroid-binding globulin and the free cortisol index during septic shock and multitrauma. *Intensive Care Medicine*, 27(10), 1584–1591.
8. **Bernecker, C., West, T. B., Mansmann, G., Scherbaum, W. A., & Willenberg, H. S., 2012.** Hypercortisolism caused by ritonavir associated inhibition of CYP 3A4 under inhalative glucocorticoid therapy. 2 case reports and a review of the literature. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 120(3), 125–127.
9. **Bernier J., Jobin N., Emptoz-Bugeon A., Pugeat M. M., Garrel D.R., 1998.** Decreased corticosteroid-binding globulin in burn patients: relationship with interleukin-6 and fat in nutritional support. *Critical Care Medicine*, 26(3), 452-460.

10. **Boisseau, N., Enea, C., Diaz, V., Dugué, B., Corcuff, J.-B., Duclos, M., 2013.** Oral contraception but not menstrual cycle phase is associated with increased free cortisol levels and low hypothalamo-pituitary-adrenal axis reactivity. *Journal of endocrinological investigation* 36, 955–964.
11. **Bosetti, C., Bravi, F., Negri, E., & Vecchia, C. L., 2009.** Oral contraceptives and colorectal cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 15(5), 489–498.
12. **Brien, T. G., 1981.** Human corticosteroid binding globulin. *Clinical Endocrinology*, 14, 193–212.
13. **Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung, 2011.** Verhütungsverhalten Erwachsener - Ergebnisse der Repräsentativbefragung. ISBN 978-3-9481-03-8.
14. **Burke, C. W., 1969.** The effect of oral contraceptives on cortisol metabolism. *Journal of Clinical Pathology*, 1, 11–18.
15. **Carroll, T. B. & Findling, J.W., 2010.** The diagnosis of Cushing's syndrome. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 11, 147–153.
16. **Castro, M., Elias, P. C. L., Quidute, A. R. P., Halah, F. P. B., Moreira, A. C., 1999.** Out-patient screening for Cushing's syndrome: the sensitivity of the combination of circadian rhythm and overnight dexamethasone suppression salivary cortisol tests. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84, 878–882.
17. **Castro, M. de, & Moreira, A. C., 2007.** Screening and diagnosis of Cushing's syndrome. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 51(8), 1191–1198.
18. **Charmandari, E., Kino, T., Ichijo, T., & Chrousos, G. P., 2008.** Generalized glucocorticoid resistance: clinical aspects, molecular mechanisms, and implications of a rare genetic disorder. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(5), 1563–1572.
19. **Cherek, D. R., Smith, J. E., Lane, J. D., & Brauchi, J. T., 1982.** Effects of cigarettes on saliva cortisol levels. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 32(6), 765–768.
20. **Chrousos, G. P., Detera-Wadleigh, S. D., Karl, M., 1993.** Syndromes of glucocorticoid resistance. *Annals of Internal Medicine*, 119, 1113–1124.
21. **Chrousos, G. P., & Kino, T., 2009.** Glucocorticoid signaling in the cell: expanding clinical implications to complex human behavioral and somatic

- disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1179, 153–166.
22. **Clayton, R. N., Raskauskiene, D., Reulen, R. C., & Jones, P. W., 2011.** Mortality and morbidity in Cushing's disease over 50 years in Stoke-on-Trent, UK: audit and meta-analysis of literature. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(3), 632–642.
 23. **Corcoran, C., Walker, E., Huot, R., Mittal, V., Tessner, K., Kestler, L., Malaspina, D., 2003.** The stress cascade and schizophrenia: etiology and onset. *Schizophrenia bulletin*, 29, 671–692.
 24. **Crapo, L., 1979.** Cushing's syndrome: a review of diagnostic tests. *Metabolism*, 28(9), 955–977.
 25. **de Kloet, E. R., Joëls, M., Holsboer, F., 2005.** Stress and the brain: From adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience* 6, 463–475.
 26. **de Weerth, C., & Buitelaar, J. K., 2005.** Cortisol awakening response in pregnant women. *Psychoneuroendocrinology*, 30(9), 902–907.
 27. **Dhillon, W. S., Kong, W. M., Le Roux, C. W., Alagband-Zadeh, J., Jones, J., Carter, G., Mendoza, N., Meeran, K., O'Shea, D., 2002.** Cortisol-binding globulin is important in the interpretation of dynamic tests of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *European journal of endocrinology*, 146(2), 231–235.
 28. **Doe, R. P., Mellinger, G. T., Swaim, W. R., Seal, U. S., 1967.** Estrogen dosage effects on serum proteins: A longitudinal study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 27, 1081–1086.
 29. **Domisse, C. S., Hayes, P. E., Kwentus, J. A., 1985.** Effect of estrogens on the dexamethasone suppression test in nondepressed women. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 5, 315–319.
 30. **Elias, P. C. L., Martinez, E. Z., Barone, B. F. C., Mermejo, L. M., Castro, M., & Moreira, A. C., 2014.** Late-night salivary cortisol has a better performance than urinary free cortisol in the diagnosis of Cushing's syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(6), 2045–2051.
 31. **Endrikat, J., Blode, H., Gerlinger, C., Rosenbaum, P., Kuhnz, W., 2002.** A pharmacokinetic study with a low-dose oral contraceptive containing 20 µg ethinylestradiol plus 100 µg levonorgestrel. *The*

- European Journal of Contraception & Reproductive Health Care, 7, 79–90.
32. **Etxabe, J., & Vazquez, J. A., 1994.** Morbidity and mortality in Cushing's disease: An epidemiological approach. *Clinical Endocrinology*, 40(4), 479–484.
 33. **Fernandez, E., Vecchia, C. L., Balducci, A., Chatenoud, L., Franceschi, S., & Negri, E., 2001.** Oral contraceptives and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 84(5), 722–727.
 34. **Findling J. W., Pinkstaff, S. M., Shaker, J.L., Raff H., Nelson, J.C., 1998.** Pseudohypercortisoluria: spurious elevation of urinary cortisol due to carbamazepine. *The Endocrinologist*, 8(2).
 35. **Findling, J. W., Raff, H., & Aron, D. C., 2004.** The low-dose dexamethasone suppression test: A reevaluation in patients with Cushing's syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(3), 1222–1226.
 36. **Finken, M. J., Andrews, R. C., Andrew, R., & Walker, B. R., 1999.** Cortisol metabolism in healthy young adults: Sexual dimorphism in activities of A-ring reductases, but not 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(9), 3316–3321.
 37. **Gagliardi, L., Ho, J.T., Torpy, D.J., 2010.** Corticosteroid-binding globulin: The clinical significance of altered levels and heritable mutations. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 316, 24–34.
 38. **Gerlinger, C., Trussell, J., Mellinger, U., Merz, M., Marr, J., Bannemerschult, R., Schellschmidt, I., Endrikat, J., 2014.** Different Pearl Indices in studies of hormonal contraceptives in the United States: Impact of study population. *Contraception*, 90, 142–146.
 39. **Glasow, A., Breidert, M., Haidan, A., Anderegg, U., Kelly, P.A., Bornstein, S.R., 1996.** Functional aspects of the effect of prolactin (PRL) on adrenal steroidogenesis and distribution of the PRL receptor in the human adrenal gland. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81, 3103–3111.
 40. **Goldzieher, J. W., & Brody, S. A., 1990.** Pharmacokinetics of ethinyl estradiol and mestranol. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 163, 2114–2119.

41. **Gogos, A., Wu, Y. C., Williams, A. S., & Byrne, L. K., 2014.** The effects of ethinylestradiol and progestins (“the pill”) on cognitive function in premenopausal women. *Neurochemical Research*, 39(12), 2288–2300. 6
42. **Görges, R., Knappe, G., Gerl, H., Ventz, M., & Stahl, F., 1999.** Diagnosis of Cushing’s syndrome: Re-evaluation of midnight plasma cortisol vs urinary free cortisol and low-dose dexamethasone suppression test in a large patient group. *Journal of endocrinological investigation*, 22(4), 241–249.
43. **Gozansky, W. S., Lynn, J. S., Laudenslager, M. L., Kohrt, W. M., 2005.** Salivary cortisol determined by enzyme immunoassay is preferable to serum total cortisol for assessment of dynamic hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity, *Clinical Endocrinology*, 63, 336–341.
44. **Grant, S. D., Pavlatos, F. C., Forsham, P. H., 1965.** Effects of estrogen therapy on cortisol metabolism. *Journal of Clinical Endocrinology*, 25, 1057–1065.
45. **Griksiene, R., & Ruksenas, O., 2011.** Effects of hormonal contraceptives on mental rotation and verbal fluency. *Psychoneuroendocrinology*, 36(8), 1239–1248.
46. **Hacihanefioğlu, B., Aybey, B., Özön, Y. H., Berkil, H., & Karşıdağ, K., 2013.** Association of anthropometric, androgenic and insulin-related features with polymorphisms in exon 8 of SHBG gene in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology*, 29(4), 361–364.
47. **Hammond, G. L., Smith, C. L., Underhill, D.A., 1991.** Molecular studies of corticosteroid binding globulin structure, biosynthesis and function. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 40, 755–762.
48. **Hautanen, A., Sarna, S., Pelkonen, R., & Adlercreutz, H., 1993.** Serum sex hormone-binding globulin, cardiovascular risk factors, and adrenal cortisol responses to dexamethasone and corticotropin. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 42(7), 870–874.
49. **Jung-Hoffmann, C., Storch, A., Kuhl, H., 1992.** Serum concentrations of ethinylestradiol, 3-keto-desogestrel, SHBG, CBG and gonadotropins during treatment with a biphasic oral contraceptive containing desogestrel. *Hormone research*, 38, 184–189.

50. **Keller, J., Flores, B., Gomez, R. G., Solvason, H. B., Kenna, H., Williams, G. H., & Schatzberg, A. F., 2006.** Cortisol circadian rhythm alterations in psychotic major depression. *Biological Psychiatry*, 60(3), 275–281.
51. **Klinke R., Pape H. C. & Silbernagl S., 2005.** In: *Physiologie*. 5. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart (ISBN 3-13-796005-3).
52. **Kyriazopoulou, V., & Vagenakis, A. G., 1992.** Abnormal overnight dexamethasone suppression test in subjects receiving rifampicin therapy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 75(1), 315–317.
53. **Liddle, G. W., 1960.** Tests of pituitary-adrenal suppressibility in the diagnosis of Cushing's syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 20(12), 1539–1560.
54. **Lindholm, J., Juul, S., Jørgensen, J. O. L., Astrup, J., Bjerre, P., Feldt-Rasmussen, U., Hagen, C., Jørgensen, J., Kosteljanetz, M., Kristensen, L. Ø., Laurberg, P., Schmidt, K., Weeke, J., 2001.** Incidence and late prognosis of Cushing's syndrome: A Population-based study 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(1), 117–123.
55. **Lindholm, J. & Schultz-Møller N., 1973.** Plasma and urinary cortisol in pregnancy and during estrogen-gestagen treatment. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 31(1), 119–122.
56. **Lindsay, J. R., & Nieman, L. K., 2005.** The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Pregnancy: Challenges in Disease Detection and Treatment. *Endocrine Reviews*, 26(6), 775–799.
57. **Liu, H., Bravata, D. M., Cabaccan, J., Raff, H., & Ryzen, E., 2005.** Elevated late-night salivary cortisol levels in elderly male type 2 diabetic veterans. *Clinical Endocrinology*, 63(6), 642–649.
58. **Lo, M.-J., Chang, L.-L., Wang, P. S., 2000.** Effects of estradiol on corticosterone secretion in ovariectomized rats. *Journal of Cellular Biochemistry*, 77, 560–568.
59. **Low, S. C., Assaad, S. N., Rajan, V., Chapman, K. E., Edwards, C. R., & Seckl, J. R., 1993.** Regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase by sex steroids in vivo: Further evidence for the existence of a second dehydrogenase in rat kidney. *The Journal of Endocrinology*, 139(1), 27–35

60. **Maes, M., Claes, M., Schotte, C., Delbeke, L., Jacquemyn, Y., Verkerk, R., De Meester, I., Scharpé, S., 1992.** Disturbances in dexamethasone suppression test and lower availability of L-tryptophan and tyrosine in early puerperium and in women under contraceptive therapy. *Journal of Psychosomatic Research*, 36, 191–197.
61. **Maes, M., Jacobs, M.P., Suy, E., Minner, B., Leclercq, C., Christiaens, F., Raus, J., 1990.** Suppressant effects of dexamethasone on the availability of plasma L-tryptophan and tyrosine in healthy controls and in depressed patients. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 81, 19–23.
62. **Maki, P. M., Rich, J. B., & Shayna Rosenbaum, R., 2002.** Implicit memory varies across the menstrual cycle: Estrogen effects in young women. *Neuropsychologia*, 40(5), 518–529.
63. **Marchbanks, P. A., McDonald, J. A., Wilson, H. G., Folger, S. G., Mandel, M. G., Daling, J. R., Bernstein L., Malone, K.E., Ursin, G., Strom B. L., Norman, S.A., Wingo, P. A., Burkman, R.T., Berlin, J. A., Simon, M. S., Spirtas, R., Weiss, L. K., 2002.** Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 346(26), 2025–2032.
64. **Meikle, A. W., 1982.** Dexamethasone suppression tests: usefulness of simultaneous measurement of plasma cortisol and dexamethasone. *Clinical Endocrinology*, 16(4), 401–408.
65. **Meikle, A. W., Findling, J., Kushnir, M. M., Rockwood, A. L., Nelson, G. J., & Terry, A. H., 2003.** Pseudo-Cushing syndrome caused by fenofibrate interference with urinary cortisol assayed by high-performance liquid chromatography. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(8), 3521–3524.
66. **Misao, R., Iwagaki, S., Sun, W.-S., Fujimoto, J., Saio, M., Takami, T., & Tamaya, T., 1999.** Evidence for the synthesis of corticosteroid-binding globulin in human placenta. *Hormone Research in Paediatrics*, 51(4), 162–167.
67. **Moore, J. S., Monson, J. P., Kaltsas, G., Putignano, P., Wood, P. J., Sheppard, M. C. Stewart, P. M., 1999.** Modulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase isozymes by growth hormone and insulin-like growth factor: In vivo and in vitro studies 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(11), 4172–4177.

68. **Moreno, V., Bosch, F. X., Muñoz, N., Meijer, C. J. L. M., Shah, K. V., Walboomers, J. M. M., Herrero, R., Franceschi, S., International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group, 2002.** Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet (London, England)*, 359(9312), 1085–1092.
69. **Moro, M., Putignano, P., Losa, M., Invitti, C., Maraschini, C., & Cavagnini, F., 2000.** The desmopressin test in the differential diagnosis between Cushing's disease and pseudo-Cushing states. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(10), 3569–3574.
70. **Musa, B. U., Seal, U. S., Doe, R. P., Lamusga, R.F., Lewis, M. D., Glaser, R., 1965.** Elevation of certain plasma proteins in man following estrogen administration: A dose-response relationship. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25, 1163–1166.
71. **Nader, N., Raverot, G., Emptoz-Bonneton, A., Déchaud, H., Bonnay, M., Baudin, E., & Pugeat, M., 2006.** Mitotane has an estrogenic effect on sex hormone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(6), 2165–2170.
72. **Neill, J. D., Freeman, M. E., & Tillson, S. A., 1971.** Control of the proestrus surge of prolactin and luteinizing hormone secretion by estrogens in the Rat. *Endocrinology*, 89(6), 1448–1453.
73. **Newell-Price, J., Trainer, P., Besser, M., & Grossman, A., 1998.** The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states. *Endocrine Reviews*, 19(5), 647–672.
74. **Nickelsen T., Lissner W. & Schöffling K., 1989.** The dexamethasone suppression test and long-term contraceptive treatment: Measurement of ACTH or salivary cortisol does not improve the reliability of the test. *Experimental and Clinical Endocrinology*, 94, 275-280.
75. **Nieman, L.K., 2015.** Cushing's syndrome: Update on signs, symptoms and biochemical screening. *European Journal of Endocrinology*, 173, M33–M38.
76. **Nieman, L. K., Biller, B. M., 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 & Metabolism*, 93, 1526–1540.
77. **Nolten, W. E., Lindheimer, M. D., Rueckert, P. A., Oparil, S., & Ehrlich, E. N., 1980.** Diurnal Patterns and Regulation of Cortisol Secretion in Pregnancy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 51(3), 466–472.
 78. **Nowak, K. W., Neri, G., Nussdorfer, G. G., & Malendowicz, L. K., 1995.** Effects of sex hormones on the steroidogenic activity of dispersed adrenocortical cells of the rat adrenal cortex. *Life Sciences*, 57(9), 833–837.
 79. **Oakley, R. H., Webster, J. C., Jewell, C. M., Sar, M., & Cidlowski, J. A., 1999.** Immunocytochemical analysis of the glucocorticoid receptor alpha isoform (GRalpha) using GRalpha-specific antibody. *Steroids*, 64(10), 742–751.
 80. **Odagiri, E., Ishiwatari, N., Abe, Y., Jibiki, K., Adachi, T., Demura, R., Shizume, K., 1988.** Hypercortisolism and the resistance to dexamethasone suppression during gestation. *Endocrinologia Japonica*, 35(5), 685–690.
 81. **Papanicolaou, D. A., Yanovski, J. A., Cutler, G. B., Chrousos, G. P., & Nieman, L. K., 1998.** A single midnight serum cortisol measurement distinguishes Cushing's syndrome from pseudo-Cushing states. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(4), 1163–1167.
 82. **Papanicolaou, D.A., Mullen, N., Kyrou, I., Nieman, L. K., 2002.** Nighttime salivary cortisol: A useful test for the diagnosis of Cushing's syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87, 4515–4521.
 83. **Paschali, M., Willenberg, H. S., Fritzen, R., Schott, M., Scherbaum, W. A., & Schinner, S., 2013.** False positives on both dexamethasone testing and urinary free cortisol in women on oral contraception: dose – response effects. *Clinical Endocrinology*, 79, 443–445.
 84. **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. *Clinical Endocrinology*, 66(2).

85. **Perogamvros, I., Keevil, B.G., Ray, D. W., Trainer, P. J., 2010.** Salivary cortisone is a potential biomarker for serum free cortisol. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 95, 4951–4958.
86. **Petersenn, S., Newell-Price, J., Findling, J. W., Gu, F., Maldonado, M., Sen, K., Salgado L.R., Colao A., Biller, B. M. K., 2014.** High variability in baseline urinary free cortisol values in patients with Cushing's disease. *Clinical Endocrinology*, 80(2), 261–269.
87. **Plager, J. E., Schmidt, K. G., & Staubitz, W. J., 1964.** Increased unbound cortisol in the plasma of estrogen-treated subjects. *The Journal of Clinical Investigation*, 43, 1066–1072.
88. **Pivonello, R., Faggiano, A., Lombardi, G., & Colao, A., 2005.** The metabolic syndrome and cardiovascular risk in Cushing's syndrome. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 34(2), 327–339.
89. **Pugeat, M., Moulin, P., Cousin, P., Fimbel, S., Nicolas, M. H., Crave, J. C., & Lejeune, H., 1995.** Interrelations between sex hormone-binding globulin (SHBG), plasma lipoproteins and cardiovascular risk. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 53(1–6), 567–572.
90. **Pujols, L., Mullol, J., Pérez, M., Roca-Ferrer, J., Juan, M., Xaubet, A., Cidlowski J. A., Picado, C., 2001.** Expression of the human glucocorticoid receptor α and β isoforms in human respiratory epithelial cells and their regulation by dexamethasone. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 24(1), 49–57.
91. **Qureshi, A. C., Bahri, A., Breen, L. A., Barnes, S. C., Powrie, J. K., Thomas, S. M., Carroll, P. V., 2007.** The influence of the route of oestrogen administration on serum levels of cortisol-binding globulin and total cortisol. *Clinical Endocrinology*, 66, 632–635.
92. **Raff, H., 2013.** Update on late-night salivary cortisol for the diagnosis of Cushing's syndrome: Methodological considerations. *Endocrine*, 44, 346–349.
93. **Read, G. F., Walker, R. F., Wilson, D. W., & Griffiths, K., 1990.** Steroid analysis in saliva for the assessment of endocrine function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 595(1), 260–274.
94. **Reid, R., & Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada, 2010.** SOGC clinical practice guideline. No. 252, December 2010. Oral

- contraceptives and the risk of venous thromboembolism: An update. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada: JOGC = Journal D'obstétrique et Gynécologie Du Canada: JOGC*, 32(12), 1192–1204.
95. **Reul, J., & Kloet, E. de., 1985.** Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, 117(6), 2505–2511.
 96. **Rivkees, S. A., 2010.** Dexamethasone therapy of congenital adrenal hyperplasia and the myth of the “growth toxic” glucocorticoid. *International Journal of Pediatric Endocrinology*, 2010.
 97. **Sandberg, A. A., Woodruff, M., Rosenthal, H., Nienhouse, S., & Slaunwhite, W. R., 1964.** Transcortin: A corticosteroid-binding protein of plasma. Half-life in normal and estrogen-treated subjects. *Journal of Clinical Investigation*, 43(3), 461–466.
 98. **Schmidt, R.F., Lang, F., Heckmann, M., 2007.** In: *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. 30. Auflage, Springer Verlag (ISBN-13: 978-3540329084).
 99. **Schneider H. J., Dimopoulou C., Stalla G. K., Reincke M., Schopohl J., 2013.** Discriminatory value of signs and symptoms in Cushing's syndrome revisited: what has changed in 30 years? *Clinical Endocrinology*, 78, 152–154.
 100. **Šimůnková, K., Starka, L., Hill, M., Kříž, L., Hampl, R., & Vondra, K., 2008.** Comparison of total and salivary cortisol in a low-dose ACTH (Synacthen) test: influence of three-month oral contraceptives administration to healthy women. *Physiological Research*, 57(1), 193–199.
 101. **Scott, E. M., McGarrigle, H. H. G., & Lachelin, G. C., 1990.** The increase in plasma and saliva cortisol levels in pregnancy is not due to the increase in corticosteroid-binding globulin levels. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 71(3), 639–644.
 102. **Sharma, A. N., Aoun, P., Wigham, J. R., Weist, S. M., & Veldhuis, J. D., 2014.** Estradiol, but not testosterone, heightens cortisol-mediated negative feedback on pulsatile ACTH secretion and ACTH approximate entropy in unstressed older men and women. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 306(9), 627–635.

103. **Smith, J. B., Nolan, G., & Jubiz, W., 1980.** The relationship between unbound and total cortisol: Its usefulness in detecting CBG abnormalities. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 108(3), 435–445.
104. **Swain J. M., Grant C.S., Schlinkert R.T., Thompson, G. B., Heerden, J. A., Lloyd R.V., Young W. F., 1998.** Corticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia: A clinicopathologic correlation. *Archives of Surgery*, 133(5), 541–546.
105. **Tinnikov, A. A., Legan, M. V., Sheveluk, N. A., Cvetovskaya, G. A., Naumenko, S. E., & Sidelnikov, S. G., 1996.** Corticosteroid and immune responses to cardiac surgery. *Steroids*, 61(7), 411–415.
106. **Träger L., 1977.** Steroidhormone - Biosynthese, Stoffwechsel, Wirkung. Springer Verlag (ISBN 3-540-08078-0).
107. **Trainer, P. J., 2002.** Corticosteroids and Pregnancy. 376 Seminars in Reproductive Medicine, 20, 375–380.
108. **Trainer, P. J., & Grossman, A., 1991.** The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Clinical Endocrinology*, 34(4), 317–330.
109. **Trussell, J., 2004.** Contraceptive failure in the United States. *Contraception*, 70(2), 89–96.
110. **Trussell, J. & Portman, D., 2013.** The creeping pearl: why has the rate of contraceptive failure increased in clinical trials of combined hormonal contraceptive pills? *Contraception*, 88, 604–610.
111. **Turpeinen, U., Markkanen, H., Välimäki, M., & Stenman, U.-H., 1997.** Determination of urinary free cortisol by HPLC. *Clinical chemistry*, 43(8), 1386–1391.
112. **Tyrka, A. R., Wier, L. M., Price, L. H., Rikhye, K., Ross, N. S., Anderson, G. M., Wilkinson, C. W., Carpenter, L. L., 2008.** Cortisol and ACTH responses to the Dex/CRH Test: Influence of temperament. *Hormones and Behavior*, 53, 518–525.
113. **Umeda, T., Hiramatsu, R., Iwaoka, T., Shimada, T., Miura, F., & Sato, T., 1981.** Use of saliva for monitoring unbound free cortisol levels in serum. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 110(2–3), 245–253.

114. **Vessey, M., & Painter, R., 2006.** Oral contraceptive use and cancer. Findings in a large cohort study, 1968–2004. *British Journal of Cancer*, 95(3), 385–389.
115. **Vilar, L., Freitas, M. da C., Lima, L. H. C., Lyra, R., & Kater, C. E., 2007.** Cushing's syndrome in pregnancy: An overview. *Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia*, 51(8), 1293–1302.
116. **Vogeser, M., Briegel, J., & Zachoal, R., 2002.** Dialyzable free cortisol after stimulation with Synacthen. *Clinical Biochemistry*, 35(7), 539–543.
117. **White, T., Özel, B., Jain, J. K., & Stanczyk, F. Z., 2006.** Effects of transdermal and oral contraceptives on estrogen-sensitive hepatic proteins. *Contraception*, 74(4), 293–296.
118. **White Junod, S. & Marks, L., 2002.** *Women's Trials: The approval of the first oral contraceptive pill in the United States and Great Britain*, Oxford university press, 57, 117–160.
119. **Wiegatz, I. & Thaler, C. J., 2011.** Hormonal contraception—what kind, when, and for whom? *Deutsches Ärzteblatt International*, 108, 495.
120. **Wild, R. A., Umstot, E. S., Andersen, R. N., & Givens, J. R., 1982.** Adrenal function in hirsutism. II. Effect of an oral contraceptive. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 54(4), 676–681.
121. **Willenberg, H., Gruber, M., Eisenhofer, G., Bornstein, S., 2012.** Endokrine Hypertonie - Neuigkeiten und jüngste Entwicklungen. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 137, 627–630.
122. **Yanovski, J. A., Cutler Jr, G. B., Chrousos, G. P., & Nieman, L. K., 1993.** The dexamethasone-suppressed corticotropin-releasing hormone stimulation test differentiates mild Cushing's disease from normal physiology, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(2), 348–352.
123. **Yu, A.-F., Wu, S.-X., Lju, J.-L., Liu, A.-R., Li, J.-Z., Wu, J.-H., Hu, Z.-Z., Yin, B.-Y., Xu, G.-X., Fortherby, K., 1988.** Metabolic changes in women using a long-acting monthly oral contraceptive and return of ovulation on discontinuation. *Contraception*, 37, 517–528.

8. Danksagung

Herrn Professor Dr. Holger Willenberg danke ich für die Überlassung des Themas und die Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich für die herzliche Unterstützung und die hilfreichen Anregungen von Herrn Alexander Brodski und Frau Eva Bramann.

Meiner Familie danke ich für die unermüdliche Treue und ihrer selbstlosen Hilfe mit der sie hinter mir gestanden haben.