

Haarcortisol als Marker für Stress in der Schwangerschaft?

Evaluation der Änderung von Haarcortisol und -cortison in der Schwangerschaft und des Zusammenhangs mit selbstangegebenen Depressions-, Somatisierungs- und Stressscores

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von: Friederike Scharlau

geboren am 04.04.1991 in Karlsburg

angefertigt an / in: Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Medizinische Fakultät, Universität Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. med. Wieland Kiess

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Medizinische Fakultät, Universität Leipzig

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 19.03.2019

Inhaltsverzeichnis:

I. Abkürzungsverzeichnis

1. Vorbemerkung	1
2. Einführung in die Thematik	
2.1 Definition Stress	3
2.2 Physiologische Stressreaktion	3
2.3 Modulation der Stresshormone durch das Enzym 11 β - Hydroxysteroid- Dehydrogenase Typ 2	5
2.4 Messung von Stress	6
2.4.1 Messung von Stress durch Biomarker	6
2.4.2 Messung von Stress durch Fragebögen	8
2.5 Stress in der Schwangerschaft	9
3. Fragestellung	11
4. Publikation	13
5. Zusammenfassung der Arbeit	21
6. Literaturverzeichnis	27
II. Anlagen	
II.A Tabellen	37
II.B Ergänzungsunterlagen zur wissenschaftlichen Publikation	41
III. Darstellung des eigenen Beitrags	46
IV. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	47
V. Danksagung	48

I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Erläuterung
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
BMI	Engl. body mass index, Körpermasseindex
CBG	cortisolbindendes Globulin
CRH	Engl. corticotropin- releasing hormone, Corticoliberin
GC	Engl. glucocorticoids, Glukokortikoide
HCC	Engl. hair cortisol concentration, Haarcortisolkonzentration
HCNC	Engl. hair cortisone concentration, Haarcortisonkonzentration
HCNC/HCC	Verhältnis HCNC zu HCC = indirekter Marker der 11 β - HSD Typ 2 Aktivität
HPA	Engl. hypothalamic- pituitary- adrenocortical axis, Hypothalamus- Hypophysen- Nebennierenrinden- Achse
LC- MS³	Flüssigchromatographie- Massenspektrometrie mit linearem Quadrupol- Ionenfallenspektrometer
NNR	Nebennierenrinde
PHQ	Engl. Patient Health Questionnaire = Gesundheitsfragebogen für Patienten
SES	Engl. socioeconomic status, sozioökonomischer Status
ZNS	Zentralnervensystem
11β- HSD	11 β - Hydroxysteroid- Dehydrogenase

1. VORBEMERKUNG

Diese Arbeit ist im Rahmen der LIFE CHILD Studie (Leipziger Forschungszentrum für Zivilisationserkrankungen) entstanden. Die Studie wurde konzipiert, um ein besseres Verständnis über die Mechanismen von epigenetischen, metabolischen und ökologischen Einflussfaktoren auf die Gesundheit und die Entwicklung von Kindern und Jugendlichen in der heutigen Gesellschaft zu erlangen. Die Studie ist eine prospektive und longitudinale Kohortenstudie, die jedem Kind und jeder Schwangeren im Großraum Leipzig die Möglichkeit zur Teilnahme bietet. Zwischen Dezember 2011 und November 2014 wurden über 2700 Kinder und Jugendliche und 370 Schwangere rekrutiert. Die Geburtskohorte LIFE CHILD BIRTH begleitet die Mutter während der Schwangerschaft und über die Geburt hinaus, sodass eine Beobachtung der pränatalen Einflüsse und die längerfristige Entwicklung des Kindes ermöglicht wird (Quante et al., 2012, Poulain et al., 2017).

Schwangere besuchten die Studie in der 24.- 26. Schwangerschaftswoche und in der 34.- 36. Schwangerschaftswoche. Während des Aufenthaltes wurden verschiedene Datensets gesammelt, unter anderem anthropometrische Daten (Gewicht, Größe, Blutdruck und verschiedene Umfänge von Körperteilen), Bildgebung (3D-Bodyscan, Ultraschalluntersuchung des Fötus), biologische Proben (Blut, Urin, Haar, oraler Glucosetoleranztest) und klinische Daten (Familiengeschichte, Schwangerschaftsverlauf, Medikamente). Die Erhebung der Daten wurde durch ein interdisziplinäres Team aus verschiedenen Fachbereichen (Medizin, Zahnmedizin, Ernährungsmedizin) durchgeführt. Des Weiteren füllten die Schwangeren während des Termins verschiedene standardisierte Fragebögen über Soziodemographie, Lebensstil, Allergien, alternative Heilmethoden, Schlafverhalten, Ernährung, vorhandene psychische Beschwerden und Persönlichkeit aus. Mit dem Einverständnis der Probandinnen wurden weitere Proben und Daten während der Geburt gesammelt (Nabelschnurblut, Plazentagewebe, medizinischer Verlauf der Geburt). Follow-up Daten der Kinder wurden im 3., 6. und 12. Lebensmonat und nachfolgend im Abstand von einem Jahr gesammelt.

Die Probandinnen wurden durch verschiedene Rekrutierungsmaßnahmen angeworben, zum Beispiel durch Flyer und Poster in öffentlichen Verkehrsmitteln, Schulen, Kindergärten und Frauenarztpraxen. Die Teilnahme an der Studie war freiwillig. Im Anschluss an jeden Studienbesuch bekamen alle Probandinnen eine finanzielle Aufwandsentschädigung. Den Schwangeren wurde außerdem ein kostenloser Glucosetoleranztest angeboten sowie ein

Ultraschallvideo des Fötus. Um die Anonymität zu gewährleisten, wurde für jede Probandin ein individueller Identifikationscode mit Hilfe eines zweifachen Verschlüsselungsprogramms erstellt.

Die LIFE CHILD Studie wurde in Zusammenarbeit mit der Ethikkommission der Universität Leipzig entworfen und genehmigt (Reg. No. 264-10-19042010) und gemäß den Vorgaben der Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes durchgeführt. LIFE CHILD ist unter der Versuchsnummer NCT02550236 registriert (Quante et al., 2012).

2. EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK

2.1 Definition Stress

Seit den letzten Jahrzehnten wird der Begriff „Stress“ vermehrt in der Alltagssprache und auch der Forschung genutzt. Etymologisch hat „Stress“ seinen Ursprung in dem lateinischen Wort „stringere“, was „in Spannung versetzen“ bedeutet und auf die körperlichen Symptome in einer Notsituation anspielt. Aus dem Englischen wird „stress“ mit Spannung, Beanspruchung und Druck übersetzt. Im Alltag wird der Begriff zum einen für den Auslöser (Prüfung, Streit, extremes Lebensereignis) als auch für die nachfolgende physiologische Reaktion (Herzrasen, Schweißausbruch, Angst, Vermeidungsverhalten) verwendet. In der wissenschaftlichen Forschung verwendete der Mediziner Hans Selye 1930 als einer der Ersten den Begriff „Stress“ (Szabo et al., 2012). Er bezeichnete diesen als physische Reaktion auf einen negativen, schädlichen Stimulus, den „Stressor“. In aktuelleren Stressdefinitionen von Lazarus & Folkman (1984) als auch von Levine & Ursin (1991) wird insbesondere die Beziehung zwischen Individuum und Umwelt betont. Somit wird Stress nicht immer und automatisch in einer schwierigen, anstrengenden oder bedrohlichen Situation ausgelöst, sondern erst dann, wenn die Stressbewältigung die persönlichen Ressourcen strapaziert und letztendlich übersteigt und das individuelle Wohlbefinden stört. Somit ist Stress das Ergebnis eines Ungleichgewichts zwischen der Anforderung und den individuellen Bewältigungsstrategien. Dies verdeutlicht, dass Menschen unterschiedlich auf ein und denselben Stressor reagieren können. Je nach Bewertung kann dieser als mehr oder weniger bedrohlich empfunden werden und es können mehr oder weniger individuelle Ressourcen zur Bewältigung zur Verfügung stehen. Stress wird erst dann als negativ empfunden, wenn er häufig oder dauerhaft auftritt und körperlich und psychisch nicht bewältigt werden kann und damit als unangenehm, bedrohlich oder überfordernd gewertet wird. Ob Stress zu einer chronischen Belastung wird, hängt also auch von den Ressourcen des Individuums ab.

2.2 Physiologische Stressreaktion

Das Auftreten von Stress bedingt zuerst eine Sinneswahrnehmung des Stressors und nachfolgende Weiterleitung durch Nerven an die reizverarbeitende Region. Die physiologische Stressantwort wird im Wesentlichen über zwei Hauptachsen reguliert: Zum einen über den Sympathikus des autonomen Nervensystems, welcher mit der Freisetzung der Transmitter Adrenalin und Noradrenalin wirksam wird (King & Hegadoren, 2002) und

zum anderen über die Aktivierung der Hypothalamus- Hypophysen- Nebennierenrinden-Achse (Engl. hypothalamic- pituitary- adrenocortical axis [HPA]), welche die Freisetzung des Stresshormons Cortisol reguliert. Der Sympathikus reagiert innerhalb von Sekunden, während die HPA kurze Zeit später aktiviert wird (King & Hegadoren, 2002, Gunnar & Quevedo, 2007).

Die Aktivierung des Hypothalamus erfolgt durch Signale aus dem Zentralnervensystem (ZNS), welche im Hypothalamus die Ausschüttung von Corticoliberin (Engl. corticotropin-releasing hormone [CRH]) bewirken. CRH regt im hypophysären Pfortadersystem im Hypophysenvorderlappen die Hormonproduktion an, sodass es zur Ausschüttung von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) kommt. CRH und ACTH gelangen über den Blutfluss zur Zona fasciculata der Nebennierenrinde (NNR), in der Cortisol ausgeschüttet wird (King & Hegadoren, 2002, Scharl et al., 2013). Cortisol ist ein Vertreter der Glukokortikoide (Engl. glucocorticoid [GC]), welche zur Gruppe der Steroidhormone gehören und ist der finale Effektor der physiologischen Stressreaktion (Tsigos & Chrousos, 2002). Die Bildung und Freisetzung von CRH und ACTH unterliegen einer negativen Feedbackhemmung durch die NNR (Golenhofen, 1997). Sie werden durch hohe GC- Spiegel unterdrückt und durch niedrige GC- Spiegel stimuliert (Golenhofen, 1997, Scharl et al., 2013).

Der größte Anteil des im Blut transportierten Cortisols (90- 95 %) ist an Albumin oder das cortisolbindende Globulin (CBG) gebunden. Nur 5- 10 % des Cortisols sind ungebunden und damit biologisch aktiv (Buckingham, 2006). An der Zielzelle angekommen diffundiert das freie Cortisol durch die Membran und bindet im Cytoplasma an den GC- Rezeptor oder auch den Mineralkortikoidrezeptor (Scharl et al., 2013). Der gebildete Komplex gelangt in den Zellkern und reguliert dort die Transkription entsprechender Gene (Bamberger, 1996, Seckl, 1997). Durch die induzierte Stimulation der Glukoneogenese, Glykogenolyse und Proteinolyse werden die Glucose- und Aminosäurekonzentrationen im Blut erhöht und zur Energieverwertung freigegeben. Zeitgleich werden energieverbrauchende Prozesse gestoppt, welche nicht die Risikobereitschaft des Organismus fördern. Dazu gehört die Suppression des Immunsystems, des Muskel- und Knochenwachstums und der Sensibilität der Keimdrüsen für Sexualhormone (Sapolsky et al., 2000, Tegethoff et al., 2009). Akuter und chronischer Stress kann daher zu negativen Einflüssen auf die Gesundheit mit erhöhtem Risiko für psychische (Djernes, 2006, Yehuda, 2006, Vreeburg et al., 2010), kardiovaskuläre (Vogelzang et al., 2010, Manenschijn et al., 2013, Pereg et al., 2013), endokrinologische

(Stalder et al., 2013) und rheumatoide (Straub et al., 2005, de Brouwer et al., 2014) Erkrankungen führen.

2.3 Modulation der Stressreaktion durch das Enzym 11 β - Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2

Zur Modifizierung der Stressreaktion kann Cortisol in das hormonell inaktive Cortison umgewandelt werden. Dies ist sinnvoll, da der Mineralokortikoidrezeptor in einigen Geweben, wie z.B. in Nieren, Kolon und Speicheldrüsen, gemeinsam vom Cortisol und vom Aldosteron genutzt wird. Das Aldosteron liegt im Plasma jedoch in einer 10 bis 1000 -fach niedrigeren Konzentration als Cortisol vor (Buckingham, 2006). Damit Aldosteron seine mineralokortikoide Wirkung am Rezeptor entfalten kann, ist eine Inaktivierung des Cortisols notwendig. Die Transformation vom hormonell aktiven Cortisol ins inaktive Cortison übernimmt dabei das Enzym 11 β - Hydroxysteroid- Dehydrogenase (11B- HSD) Typ 2. Das Verhältnis von Cortison zu Cortisol ist ein indirekter Marker für die Aktivität der 11B- HSD Typ 2 (Ghaemmaghami et al., 2014, Wilson & Thayer, 2017). Cortison wird über den Blutkreislauf in andere Organe und Gewebe transportiert und kann dort durch die 11B- HSD Typ 1 wieder ins aktive Cortisol umgewandelt werden. 11B- HSD Typ 1 gibt es vor allem in Leber, Lunge, Fettgewebe, Gehirn und Gonaden (Buckingham, 2006, Ferrari, 2010), aber auch in Haarfollikel assoziierten Zellen (Hennebert et al., 2007). 11B- HSD Typ 2 gibt es in den Nieren, im Kolon und in den Schweißdrüsen (Smith et al., 1996, Buckingham, 2006, Ferrari, 2010), aber auch in der Plazenta (Sun et al., 1997) (Tabelle 1). Cortison kann in der Leber glucuronidiert oder sulfoniert und über den Harn ausgeschieden werden (Schartl et al., 2013).

Tabelle 1: Vorkommen der 11B- HSD Typen (Buckingham, 2006, Ferrari, 2010).

Enzym	11B- HSD Typ 1	11B- HSD Typ 2
Transformation	Cortison → Cortisol inaktiv → aktiv	Cortisol → Cortison aktiv → inaktiv
Vorkommen	ubiquitär	vereinzelt
Gewebe	Leber, Lunge, Fettgewebe, Gehirn, Gonaden, Haarfollikel assoziierte Zellen	Niere, Kolon, Schweißdrüsen, Parotis, Plazenta

2.4 Messung von Stress

Stress und psychische Belastung können auf verschiedene Arten gemessen werden, zum einen durch Bestimmung der Konzentrationen der Endprodukte der HPA- Achse in Körperflüssigkeiten und Haaren und zum anderen durch die subjektive Selbsteinschätzung des Probanden mit Hilfe eines Fragebogens.

2.4.1 Messung von Stress durch Biomarker

Um Stresslevel und -veränderungen auf biochemischer Ebene darzustellen, können die verschiedenen Produkte der HPA- Stressachse gemessen werden. In der Klinik werden CRH- und ACTH- Messungen zur Diagnostik von endokrinologischen Erkrankungen mit Dysfunktion der HPA angewendet (Golden et al., 2011). Als Marker für die Funktion und Veränderung der HPA wird im Besonderen das Endprodukt Cortisol genutzt (Baum & Grunberg, 1998, Golden et al., 2011).

Nach der Ausschüttung aus der NNR zirkuliert Cortisol mit dem Blutfluss und ist dementsprechend nicht nur im Serum, sondern auch in anderen Körperflüssigkeiten wie im Speichel (Kirschbaum & Hellhammer, 1989, Gröschl, 2009, Wood, 2009), Urin (Vogelzangs et al., 2010, Short et al., 2016) und auch im Haar (Stalder & Kirschbaum, 2012) bestimmbar. Dabei ist die Darstellung der Cortisolausschüttung in Körperflüssigkeiten auf die letzten Minuten bis Stunden (Serum- und Speichel) oder maximal 24 Stunden (Urin) beschränkt. Außerdem unterliegen die Konzentrationen in flüssigen Medien der circadianen Rhythmik, sodass der Abnahmezeitpunkt (Adam et al., 2006) und der Studienablauf (Wolfram et al., 2013) einen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse hat. Hinzu kommt, dass weitere Faktoren wie z.B. Nahrungsaufnahme (Gibson et al., 1999, Kudielka et al., 2009), Rauchen (Rohleder & Kirschbaum, 2006), Koffein (Lovallo et al., 1996, Lovallo et al., 2005) und Sport (Galbo, 1981, Gatti & Palo, 2011) die Ergebnisse beeinflussen. Um die Variabilität angemessen darzustellen und auch die Aktivität der HPA bei chronischem Stress über einen längeren Zeitraum zu untersuchen, sind wiederholte Messungen über 24 Stunden und mehrere Tage erforderlich (Williams et al., 2005, Hellhammer et al., 2007). Das bedeutet nicht nur hohe Kosten, sondern auch eine Belastung des Probanden, vor allem in Hinblick auf die invasive Blutabnahme. Folglich erhöht sich das Abbrecherrisiko, welches letztendlich zu unvollständigen Datensets führt. Gerade im Hinblick darauf, dass eine invasive und zeitintensive Probensammlung beim Probanden eine Stressreaktion mit nachfolgender vermehrter Ausschüttung von Glukokortikoiden auslösen kann, ist eine

stressfreie Probengewinnung erstrebenswert. Im Kontext dieser Limitierungen wurde an der Extraktion von Cortisol in anderen Medien geforscht, wobei sich Haar als zuverlässiges Medium beweisen konnte (Bévalot et al., 2000, Raul et al., 2004, Stalder et al., 2012b). Aufgrund des durchschnittlichen Haarwachstums von 1cm pro Monat (Wennig, 2000) ist es möglich, länger zurückliegende Steroidexpositionen von Wochen oder Monaten zu erfassen (Thomson et al., 2010, Manenschijn et al., 2011a, Stalder & Kirschbaum, 2012). Die Haarcortisolkonzentration (Engl. hair cortisol concentration [HCC]) zeigte einen starken Zusammenhang sowohl mit akkumulierten Cortisolkonzentrationen im Speichel (D'Anna-Hernandez et al., 2011, van Holland et al., 2012, Xie et al., 2011, Vanaelst et al., 2012) als auch im Urin (Sauvé et al., 2007). Ferner wurde gezeigt, dass Probanden mit Hypercortisolismus erhöhte HCC (Thomson et al., 2010, Manenschijn et al., 2011a, Manenschijn et al., 2012) und Probanden mit einer NNR- Insuffizienz erniedrigte HCC aufwiesen (Manenschijn et al., 2011a).

Der Mechanismus der Steroideinlagerung ins Haar ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Stalder & Kirschbaum (2012) stellen mögliche Mechanismen vor. Demnach wird Cortisol zum größten Teil durch passive Diffusion aus dem Blutstrom ins Haar aufgenommen. Die Blutkapillaren umfließen die Haarwurzel, was eine Aufnahme in die wachsenden Haarzellen ermöglicht. Zusätzlich können ungebundene freie Steroide aus dem Schweiß und Talg über denselben Mechanismus direkt in den Haarschaft abgegeben werden (Mendel, 1989, Raul et al., 2004). Außerdem wird diskutiert, dass auch der Haarfollikel Cortisol in kleinen Mengen synthetisiert und absondert (Ito et al., 2005, Slominski et al., 2007). Da auch die 11 β -HSD in Haarfollikel assoziierten Zellen nachgewiesen werden konnte (Hennebert et al., 2007), ist die Bestimmung und Betrachtung des aktiven Cortisols als auch des inaktiven Cortisols von Bedeutung.

Ein wesentlicher Vorteil von Haar im Vergleich zur invasiven Blutabnahme ist die schmerzfreie Probengewinnung. Außerdem wird nur eine geringe Menge von 10 mg benötigt und die Haarsträhne kann an einem unauffälligen Ort am Kopf abgenommen werden. Ein weiterer Vorteil ist die kostengünstige Lagerung bei Raumtemperatur über einen längeren Zeitraum. Man konnte sogar in archäologischen Proben Cortisol nachweisen (Webb et al., 2010) (Tabelle 2).

Die analytische Bestimmung von Steroiden im Haar wurden in den letzten Jahren stetig vorangetrieben und verbessert (Guo et al., 2008, Kirchhoff et al., 2011, Kushnir et al., 2011,

Jones et al., 2012, Keevil, 2013). Mit der Methode der Hochdruckflüssigchromatographie–Massenspektrometrie mit linearem Quadrupol- Ionenfallenspektrometer (HPLC- MS³) (Gaudl et al., 2016) können Steroidwerte auch in der komplexen Matrix des Haares mit hoher Selektivität für Cortisol und Cortison bestimmt werden. Durch die Erweiterung um eine negative Ionisierung (-MS³) (Quinete et al., 2015) wird das Hintergrundrauschen auf ein Minimum reduziert und die Selektivität erhöht.

Die Darstellung der Stressantwort mithilfe von HCC kann durch präanalytische Einflussfaktoren verfälscht werden. Gefärbte und getönte Haare weisen bis zu 60 % niedrigere Konzentrationen von Cortisol und Cortison auf (Sauvé et al., 2007, Manenschijn et al., 2011a, Manenschijn et al., 2012, Wosu et al., 2015, Gaudl et al., 2016, Serwinski et al., 2016). Außerdem sind Steroidkonzentrationen in den distalen Haarabschnitten niedriger (Kirschbaum et al., 2009, Steudte et al., 2011, Xie et al., 2011, Dettenborn et al., 2012, Luo et al., 2012, Skoluda et al., 2012), was möglicherweise mit dem vermehrten Kontakt von Shampoo und Wasser zusammenhängt (Li et al., 2012, Hoffman et al., 2014). Neben den Faktoren der Haarcharakteristik und der -behandlung gibt es weitere mögliche Einflussfaktoren auf Steroidwerte im Haar wie Soziodemographie, körperbezogene Maße und verschiedene Aktivitäten (Sport, Rauchen, Alkohol). Da Studien über Einflussfaktoren auf die HCC widersprüchlich sind (Übersicht siehe Tabelle 3), sind diesbezüglich weitere Untersuchungen erforderlich.

2.4.2 Messung von Stress durch Fragebögen

Um eine subjektive Einschätzung des Probanden über seine psychische Situation zu erhalten, ist in Klinik und Wissenschaft die Erhebung von Selbstauskunftsfragebogen weit verbreitet und allgemein akzeptiert. Es gibt zahlreiche Fragebögen mit unterschiedlichen Schwerpunkten (Franke et al., 2007). Für die Erfassung von Symptomen von Depression, Somatisierung und Stress, sowohl in klinischen Studien als auch in bevölkerungsrepräsentativen Erhebungen, ist der Patient Health Questionnaire (PHQ) als gut untersuchtes, solides Instrument anerkannt (Kroenke et al., 2010). Die psychometrischen Eigenschaften (Realibilität, Validität) werden gegenüber anderen Instrumenten als überlegen eingeschätzt (Löwe et al., 2003, Löwe et al., 2004a, Löwe et al., 2004b, Gräfe et al., 2004). Der PHQ eignet sich sowohl zur Erstdiagnostik als auch zur Verlaufskontrolle. Aufgrund der einfachen und zeitsparenden Handhabung, der einfachen Auswertung und der breiten Anwendbarkeit hinsichtlich der diagnostischen Kriterien wird der PHQ in vielen

Bereichen der Psychologie, Medizin und Epidemiologie verwendet. Der Fragebogen ist in über 30 Sprachen verfügbar (Spitzer et al., 1999, Kroenke et al., 2001, Diez-Quevedo et al., 2001), die Übersetzung ins Deutsche (PHQ-D) wurde von Bernd Löwe entwickelt (Bracken & Barona, 1991). Die deutsche Version des PHQ orientiert sich an der Einteilung des in der USA verwendeten DSM-IV, jedoch gibt es auch eine gute Übereinstimmung mit den diagnostischen Kriterien des in Deutschland verwendeten ICD-10 Schlüssels (Löwe et al., 2002).

Die Komplettversion des PHQ umfasst 78 Fragen und besteht aus Modulen zur Erfassung von somatoformen Störungen, depressiven Störungen, Angststörungen, Essstörungen und Alkoholmissbrauch. Ergänzend zur Störungsdiagnostik finden sich Fragen zur psychosozialen Funktionsfähigkeit, zu Stressoren und kritischen Lebensereignissen und speziell für Frauen zur Menstruation, Schwangerschaft und Geburt. Der Zustimmungsgrad wird auf einer zwei- bis fünfstufigen Antwortskala abgefragt. Das Ausfüllen dauert circa 10 Minuten, die Auswertung durch den Experten nur circa 2 Minuten.

Ergänzend zur kategorialen Diagnostik der psychischen Störungen mittels Schablone oder Tabelle mit Auswertungsalgorithmen können mit Hilfe der kontinuierlichen Auswertungen Schweregrade für die Bereiche der Depressivität, somatischer Symptome und psychologischer Stressoren gebildet werden. Dabei werden Skalensummenwerte aufgrund der numerischen Bewertung der einzelnen Fragen gebildet. Die Summenwerte können als Schweregrade aufgefasst werden und sind somit für die Therapiekontrolle und das Follow-up besonders geeignet.

Skalensummenwerte können für drei Subskalen gebildet werden:

- 1.) Depressionsmodul (PHQ-9) (9 Fragen)
- 2.) Somatisierungsmodul (PHQ-15) (13 Fragen + 2 Fragen aus dem Depressionsmodul)
- 3.) Stressmodul (10 Fragen)

Die Fragen des PHQ-9 Moduls beziehen sich auf die letzten 2 Wochen, die Fragen des PHQ-15 und Stressmoduls auf die letzten 4 Wochen (Tabelle 4).

2.5 Stress in der Schwangerschaft

Während der Schwangerschaft verändert sich die Funktion der HPA (Magiakou et al., 1997). Die Plazenta als endokrines Organ produziert CRH exponentiell mit dem Wachstum (Jones et al., 1989, Riley & Challis, 1991). Das plazentale und mütterliche CRH sind sich

hinsichtlich der Struktur und Bioaktivität weitgehend ähnlich (Grino et al., 1987, Petraglia et al., 1992). Das durch CRH erhöhte Cortisol stimuliert zusätzlich die plazentale CRH-Produktion anstatt sie wie im normalen negativen Feedbackmechanismus zu inhibieren (Magiakou et al., 1997, Nicholson et al., 2004, Weinstock, 2005, Kammerer et al., 2006). Dadurch kommt es zu einer Erhöhung der Cortisolkonzentration mit Werten vergleichbar mit dem Cushing Syndrom oder einer schweren Depression (Magiakou et al., 1997). Während der Schwangerschaft muss das Kind vor dem hohen Cortisolspiegel geschützt werden, da schon in den frühen Stadien der embryonalen Entwicklung GC- Rezeptoren in verschiedenen embryonalen Geweben vorhanden sind (Cole et al., 1995, Speirs et al., 2004). GC sind in der Lage, die Genregulierung über verschiedene Rezeptoren und Enzyme zu variieren. Damit wird die fetale Expression von Rezeptoren, Enzymen, Ionenkanälen und Transportern beeinflusst (Fowden & Forhead, 2004). GC haben also einen entscheidenden Einfluss auf die Funktion, Proliferation und Differenzierung der fetalen Zelle. Auf diese Weise wird der entstehende Phänotyp verändert mit lebenslangen Konsequenzen. Dieser Mechanismus wird fetale Programmierung genannt (Fowden & Forhead, 2004, Schwab, 2009). Zum Schutz des Fetus metabolisiert die plazentale 11 β - HSD Typ 2 (Sun et al., 1997) das aktive Hormon in inaktives Cortison bevor es in den fetalen Blutkreislauf gelangt. So finden sich im Vergleich zur Mutter niedrigere Cortisolwerte beim Kind (Beitins et al., 1973, Campbell & Murphy, 1977). Kurz vor der Geburt nimmt auch die fetale NNR die GC-Produktion auf und der Cortisolspiegel des Kindes steigt an (Beitins et al., 1973, Smith & Shearman, 1974). Die steigenden Steroidkonzentrationen sind essentiell für die Organogenese, vor allem für die Lungenreifung (Bolt et al., 2001, Tegethoff et al., 2009). In der Klinik wird sich dieser Mechanismus zu Nutzen gemacht, in dem man das synthetische GC Betamethason zur Förderung der Lungenreifung beim Ungeborenen bei drohender Frühgeburt einsetzt (Ward, 1994, Gilstrap, 1995). Der Anstieg des maternalen Cortisols während der Schwangerschaft konnte bereits im Plasma und Urin (Jung et al., 2011) sowie im Speichel und Haar (D'Anna- Hernandez et al., 2011) gezeigt werden. Bis zum 3. Trimester steigen die Werte des totalen Serumcortisols und des 24- Stunden- Sammelurins um das Dreifache an (Jung et al., 2011). Der Anstieg des Speichel- und Haarcortisols beträgt das 1,5-Fache im 3. Trimester im Vergleich zu Nichtschwangeren (D'Anna- Hernandez et al., 2011). Die Veränderung der Haarcortisonkonzentration (Engl. hair cortisone concentration [HCNC]) bei Schwangeren war jedoch bisher nicht untersucht worden.

Ein Zusammenhang zwischen erhöhtem Cortisol in stressbehafteten Situationen konnte in Probanden mit Alkohol- (Stalder et al., 2010) und Drogenabhängigkeit (Grassi- Oliveira et al., 2012), mit traumatischem Erlebnis (Karlen et al., 2011, Schreier et al., 2016) als auch bei sehr ängstlichen Kindern nach der Einschulung gezeigt werden (Groeneveld et al., 2013). Studien über den Zusammenhang zwischen subjektivem Stress und physiologischen Stressparametern in der Schwangerschaft sind hingegen immer noch selten und uneinheitlich. Diese unterscheiden sich hinsichtlich der Bestimmung der Stressparameter und des Abnahmezeitpunkts in der Schwangerschaft. Dabei wurde Cortisol vornehmlich im Serum und Fruchtwasser (Glover et al., 2009) oder im Speichel (Van den Bergh et al., 2008, Davis & Sandman, 2010, Rothenberger et al., 2011a, Rothenberger et al., 2011b) bestimmt. Bis jetzt gibt es nur wenige Studien mit Bestimmung von Cortisol in Haaren während der Schwangerschaft (Kalra et al., 2007, Kramer et al., 2009, Braig et al., 2015b, Schreier et al., 2016). Kalra et al. (2007) fanden bei Schwangeren, die im 2. Trimester befragt wurden, einen signifikant positiven Zusammenhang zwischen der Höhe der selbstangegebenen Stressscorewerte und der HCC. Auch wurden höhere HCC bei Schwangeren gefunden, die angaben, häufiger in ihrem Leben traumatische und stressbehaftete Erlebnisse erfahren zu haben (Schreier et al., 2016). Andere Studien konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen (Kramer et al., 2009, Braig et al., 2015b). In einer Studie mit 35 Schwangeren im 2. Trimester konnte kein Zusammenhang zwischen verschiedenen psychologischen Stressmessparametern und der HCC festgestellt werden (Kramer et al., 2009). Auch in einer Studienkohorte von 768 Schwangeren, die kurz nach der Entbindung befragt wurden, konnte kein Zusammenhang zwischen der HCC und verschiedenen Stressfragebögen (chronischer Stress, schwangerschaftsbezogene Angst, depressive Symptome) festgestellt werden (Braig et al., 2015b).

3. FRAGESTELLUNG

Erhöhte GC- Level in utero führen durch fetale Programmierung zu langanhaltenden Effekten auf das Kind mit Folgen für das ganze Leben. Die LIFE CHILD Studie wurde konzipiert, um ein besseres Verständnis über die Mechanismen von Einflussfaktoren auf die Gesundheit und die Entwicklung von Kindern und Jugendlichen in der heutigen Gesellschaft zu erlangen. Im Rahmen dieser Studie wurde eine Studiengruppe von 62 schwangeren Probandinnen mit unbehandelten Naturhaaren untersucht, welche an der Datensammlung im 2. und 3. Trimester teilnahmen.

Folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden:

- 1.) Steigt die durchschnittliche HCC und HCNC in den Schwangeren vom 2. zum 3. Trimester?
- 2.) Gibt es Einflussfaktoren auf die HCC und HCNC?
- 3.) Gibt es einen Zusammenhang zwischen den subjektiv angegebenen Symptomen von Depression, Somatisierung und Stress und der HCC und HCNC in der Schwangerschaft?
- 4.) Gibt es einen Zusammenhang zwischen den Änderungen der subjektiven Symptome und der Änderung der HCC und HCNC?

Die Beantwortung dieser Fragen ist in besonderem Maße interessant, da nur unbehandelte Naturhaare für die Bestimmung der HCC und HCNC mit besonders präziser HPLC- MS³ genutzt werden und weil keine Studien über die Änderung der HCNC während der Schwangerschaft vorliegen.

4. PUBLIKATION

STRESS, 2018
VOL. 21, NO. 1, 43–50
<https://doi.org/10.1080/10253890.2017.1392507>



ORIGINAL ARTICLE



Evaluation of hair cortisol and cortisone change during pregnancy and the association with self-reported depression, somatization, and stress symptoms

Friederike Scharlau^{a,b}, Diana Pietzner^{a,b}, Mandy Vogel^{a,b}, Alexander Gaudl^c, Uta Ceglarek^c, Joachim Thiery^c, Jürgen Kratzsch^c, Andreas Hiemisch^{a,b} and Wieland Kiess^{a,b}

^aDepartment of Women and Child Health, Hospital for Children and Adolescents and Center for Pediatric Research (CPL), University of Leipzig, Leipzig, Germany; ^bLIFE-Child-Leipzig Research Center for Civilization Diseases, University of Leipzig, Leipzig, Germany; ^cInstitute of Laboratory Medicine, Clinical Chemistry, and Molecular Diagnostics (ILM), University of Leipzig, Leipzig, Germany

ABSTRACT

Hair cortisol levels are used to measure long-term stress, while its inactive metabolite cortisone is often not assessed. We measured hair cortisol concentrations (HCC) and hair cortisone concentrations (HCNC) via liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry (LC-MS³) in 62 pregnant women who participated in the LIFE CHILD STUDY in their 2nd and 3rd trimester between 12/2011 and 11/2014. Sociodemographic factors, pregnancy-related factors, and hair characteristics were assessed. Degree of severity of depression, somatization, and stress were evaluated in both trimesters with a self-reported Patient Health Questionnaire (PHQ). Multivariate regression analyses were conducted between HCC and potential influencing factors, as well as with subscales of the PHQ, with HCNC and with the ratio of HCNC to HCC. Spearman correlation coefficients were calculated between steroid concentrations and subscale scores of the PHQ, as well as between the log₂-fold change in HCC and HCNC and the change in PHQ subscale scores. HCC increased 1.3-fold and HCNC increased 1.5-fold by the 3rd trimester. HCNC was more than three times higher than HCC in both trimesters. We found significant associations of PHQ subscores with HCNC. The PHQ depression score was negatively correlated with HCNC in the 2nd trimester ($p < .05$). The PHQ stress score change was negatively correlated with the fold change of HCNC ($p < .05$) and with the change in the ratio of HCNC to HCC ($p < .001$). Our study suggests an association of cortisol/cortisone metabolism with self-reported stress in the 2nd and 3rd trimester of pregnancy. Since associations with PHQ subscores were only found with cortisone or the ratio of cortisone to cortisol, but not with cortisol alone, both cortisone and cortisol should be used as a marker for stress in pregnant woman.

ARTICLE HISTORY

Received 20 January 2017
Accepted 9 October 2017

KEYWORDS

Hair; cortisol; cortisone; pregnancy; Patient Health Questionnaire

Introduction

Reactions to stressors are mainly regulated by two stress axes (Sapolsky, Romero, & Munck, 2000). An immediate increased secretion of catecholamines (epinephrine and norepinephrine) from the sympathetic nervous system is followed by the activation of the multi-organ hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis. Hypothalamic release of corticotropin-releasing hormone (CRH) followed by enhanced secretion of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) from the pituitary gland into blood circulation leads to increased glucocorticoid secretion from the adrenal cortex. The final glucocorticoid effector cortisol affects cells, organs, and glands and also inhibits hypothalamic CRH secretion by negative feedback. Cortisol can be metabolized into its inactive form cortisone by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD) type 2. 11 β -HSD type 2 is highly expressed in the kidneys, colon, salivary glands, and epithelial tissues (Smith et al., 1996), but also in the placenta, thereby protecting the fetus from exposure to rising maternal cortisol (Sun, Yang, & Challis, 1997). The ratio

of cortisone to cortisol is considered to be an indirect marker of 11 β -HSD type 2 activity (Ghaemmaghami, Dainese, La Marca, Zimmermann, & Ehlert, 2014; Wilson & Thayer, 2017). Reverse metabolism occurs in the liver and adipose tissue via 11 β -HSD type 1 to modulate the hormone effect (Ferrari, 2010). Furthermore, 11 β -HSD type 1 is discretely expressed in hair follicle associated cells (Hennebert, Chalbot, Alran, & Morfin, 2007).

Concentrations of steroids, such as cortisol, are susceptible to inter- and intra-individual variation, circadian rhythm, and also to feeding, hydration, physical activity, and sleep (Kudielka, Hellhammer, & Wüst, 2009; Stalder et al., 2012). Cortisol levels in blood, urine, or saliva indicate only the current status of HPA functions and are susceptible to a variety of influences as mentioned above. In contrast, the measurement of steroids in hair enables an examination of accumulated steroid secretion over the past months (D'Anna-Hernandez, Ross, Natvig, & Laudenslager, 2011; Vanaelst et al., 2012). Higher hair cortisol concentrations (HCC) have been detected after extended periods of stress in humans

CONTACT Friederike Scharlau f.scharlau@studserv.uni-leipzig.de Department of Women & Children's Health, Hospital for Children and Adolescents, University of Leipzig, Liebigstrasse 20a, Leipzig 04103, Germany

Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2017 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

(Staufenbiel, Penninx, Spijker, Elzinga, & van Rossum, 2013; van Uum et al., 2008) and apes (Davenport, Tiefenbacher, Lutz, Novak, & Meyer, 2006). Furthermore, HCC has been described to increase during pregnancy (D'Anna-Hernandez et al., 2011). Elevated glucocorticoid levels have consistently been suggested to be essential for normal fetal development and as a trigger for birth (Smith & Shearman, 1974).

Studies on the relationship between steroid levels and the results of surveys conducted via stress questionnaires in pregnancy are rare and conflicting. While Kalra, Einarson, Karaskov, van Uum, and Koren (2007) found a positive association between HCC and self-reported stress, no association was found between HCC and the outcome of different stress measurements (Braig et al., 2015b; Kramer et al., 2009). Confounders of HCC could obstruct the deduction of associations with self-reported stress. Several studies have investigated confounders and determinants of HCC in pregnant women (Bolten et al., 2011; Braig et al., 2015a; D'Anna-Hernandez et al., 2011; Karlén, Frostell, Theodorsson, Faresjö, & Ludvigsson, 2013; Kramer et al., 2009), but significant associations with HCC other than birth weight were not reproduced. To our knowledge, no study thus far has investigated either hair cortisone concentrations (HCNC) or its confounders in pregnant women. Since cortisone is the inactive metabolite of cortisol, and downregulation of its converting enzyme 11 β -HSD has been linked to prenatal anxiety (O'Donnell et al., 2012; Seth, Lewis, Saffery, Lappas, & Galbally, 2015), we were intrigued by its potential, together with cortisol, as a biomarker for prenatal stress.

In our study, we aimed to examine HCC and HCNC by means of liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry (LC-MS³) (Gaudl et al., 2016) in the natural hair of pregnant women, as well as their subjective stress in the 2nd and 3rd trimester of pregnancy, and to observe their change and their relationship over the course of the pregnancy. We expected an association between self-reported Patient Health Questionnaire (PHQ) scores and HCC and/or HCNC. Moreover, we expected an increase in hair steroid levels from the 2nd to 3rd trimester as has previously been found in hair and body fluids (plasma and urine: Jung et al. (2011); hair and saliva: D'Anna-Hernandez et al. (2011)), and an association between the change of PHQ scores and the change of HCNC/HCC.

Methods

Study design

We analyzed data from the LIFE CHILD BIRTH cohort of the "Leipzig Research Center for Civilization Diseases (LIFE) Child Study" conducted in Leipzig, Germany. Pregnant women from across Leipzig were recruited via public advertisements and directly in gynecologists' offices to obtain a longitudinal representative cohort. All pregnant women who joined the study from December 2011 to November 2014 were included. Prenatal examinations were initiated during the 2nd trimester (24th–26th weeks) and followed up during the 3rd trimester (34th–36th weeks) of pregnancy. Several data sets about physical and mental conditions, behavior, and socioeconomic

status were collected during gestation (Poulain et al., 2017; Quante et al., 2012). All participants joined voluntarily, were informed about the purpose of the study, and gave their consent to data collection and further use. Data were pseudonymized. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the University of Leipzig (Reg. No. 264-10-19042010). The LIFE Child study is registered with the trial number: NCT02550236.

Sociodemographic and pregnancy-related parameters

Participants completed several self-administered assessments during their involvement in the study. Factors potentially influencing HCC and HCNC were obtained from the collected data: maternal nationality (German, other), maternal age at delivery in years, maternal education (<9 years, 10–11 years, >11 years), parity and gravidity, gender of the child, and smoking during pregnancy (yes/no). The Winkler index, used to assess socioeconomic status (SES), incorporates different aspects of the SES (education, professional qualification, occupational status, and net household income per month after tax including social, or child benefits) and was calculated as described in Winkler and Stolzenberg (2009). The resulting score ranges from 3 to 21 points and is categorized in low SES (3–8 points), middle SES (9–14 points), and high SES (15–21 points). Information on maternal height and weight at the first detection of gravidity were assessed from self-administered questionnaires. Data on the detailed progress of pregnancy and on medication were obtained from the maternity card ("Mutterpass") from the time of verification of gravidity until delivery. The body mass index (BMI) in the first trimester was calculated as body weight (kg) divided by the square of body height (m²) and classified as underweight, normal weight, overweight, and obese according to the WHO classification (<18.5, \geq 18.5 to <25, \geq 25 to <30, \geq 30 kg/m²) (World Health Organization, 2000).

Stress measurements – Patient Health Questionnaire

In order to collect information about the presence of depressive, somatization, and stress symptoms, the German version of the PHQ was used (Spitzer, Kroenke, & Williams, 1999). Specifically, we utilized the subscale for depression (PHQ-9) which assesses the previous 2 weeks. We also used the subscale for somatization (PHQ-15) and the subscale for stress, both of which assess the previous 4 weeks. The PHQ-9 (0–27 points) sum score creates five levels of depression severity: minimal (0–4), mild (5–9), moderate (10–14), moderately severe (15–19), and severe (20–27) (Kroenke, Spitzer, & Williams, 2001). The PHQ-15 (0–30 points) comprises the degree of severity of somatization symptoms and the stress scale (0–20 points) the degree of severity of psychological stressors (Löwe, Spitzer, Zipfel, & Herzog, 2002). The PHQ-9, PHQ-15, and stress scale have proven to be good instruments with adequate reliability and clear evidence of validity (Kroenke, Spitzer, Williams, & Lowe, 2010). Because of the longitudinal character of the LIFE CHILD BIRTH study, in which a comparison between several dates and different genders

(of parents and children) needs to be possible (Poulain et al., 2017), we chose to use the PHQ over pregnancy-specific stress questionnaires (Lobel et al., 2008).

Collection and laboratory measurement of hair cortisol and cortisone

At both visits during pregnancy, hair samples were cut carefully with a pair of scissors from segments closest to the scalp from the occipital or parietal/temporal region of the pregnant women's head. Information about hair treatment (colored, tinted, natural) and frequency of hair washing per week (<1 per week, every 2nd day, 1–3 d per week, 4–6 d per week, daily) were gathered via interviews.

Strands were tied with an elastic strap and ends were marked. Samples were vacuum-packed and stored in darkness at room temperature. Assuming that hair grows 1 cm/month (Wennig, 2000), the verification of the most proximal centimeter gives an overview of the last month of steroid production prior to hair sampling (Short et al., 2016). Strands of 1 cm most proximal to the scalp were analyzed using LC-MS³ as described by Gaudi et al. (2016). The lower limit of quantification (LLOQ) was 138 pmol/L (0.05 ng/ml) for cortisol and 277 pmol/l (0.1 ng/ml) for cortisone. The LLOQ is dependent on the mass of hair used. When normalized to 10 mg weighed hair, these values correspond to 0.8 and 1.6 pg/mg of cortisol and cortisone, respectively. Samples ranged from 4.9 to 47.1 mg of hair.

Statistical analysis

Data were tested for normality using the Shapiro–Wilk test and are presented as the median, as the Shapiro–Wilk test suggested deviation from a normal distribution for measured values of cortisol and cortisone concentrations. To reach almost normally distributed values, HCC and HCNC as well as the ratio HCNC/HCC, were ln-transformed before statistical analysis. For the following calculations, individuals with missing steroid values (failed detection) and those with values below the LLOQ were excluded. Comparison of means from the 2nd to 3rd trimester was performed using a paired t-test or Wilcoxon signed-rank test, as appropriate. Linear regression analyses were performed to detect bivariate associations of potential influencing factors with ln-transformed values. Linear regression coefficients (b), confidence intervals (CI), and *p* values were noted. Possible influencing independent variables were included in a multiple linear regression model. All tests were two-sided, and a *p* value <.05 was considered significant. *R*² and minimum detectible effect sizes (*min*₂) were added for each model, with the significance level set to .05 and power set to 0.8. Fold change of concentration of steroids was generated as the calculated difference of log₂ of measured values in the 3rd trimester and log₂ of measured values in the 2nd trimester (log₂-fold change HCC, log₂-fold change HCNC, log₂-fold change ratio of HCNC/HCC). Change in subscale scores between the 3rd and 2nd trimester was calculated as the difference between the two scores (Δ PHQ depression, Δ PHQ somatization, and Δ PHQ stress).

Spearman correlation coefficients between HCC and HCNC and subscale scores were calculated, as well as between log₂-fold change of steroids and Δ PHQ subscales. Spearman correlation coefficients (*r*) and *p* values were noted. Statistical analysis was conducted using the Statistical Package for the Social Sciences version 21 (IBM SPSS Statistics; IBM Corporation, IBM SPSS Statistics, Armonk, NY). Figures were designed using GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

Results

Characteristics of the study cohort

A total of 239 pregnant women participated in the study from 12/2011 to 11/2014, from whom 363 hair samples were collected. Exclusion criteria were: colored (*n*=171) or tinted (*n*=37) hair samples because of anticipated confounding (Gaudi et al., 2016; Serwinski, Salavec, Kirschbaum, & Steptoe, 2016), only one visit at the study center during pregnancy (*n*=19), and insufficient sample size for analysis (*n*=12). Of the remaining 124 samples, 115 could be quantified for both steroids by LC-MS³ (Table 1 and Supplementary Figure S3). No women reported steroid or hormone medication or a diagnosed psychiatric disorder.

Most mothers were of German nationality with an average age of 29.7 years and mean duration of school education of more than 11 years (Table 1). The majority of mothers had a normal BMI and did not smoke. While the original study sample was comparable to the KiGGS Study (Lampert, Kroll, Muters, & Stolzenberg, 2013) regarding the distribution of socioeconomic status (SES), exclusion of colored and tinted hair samples led to a strong overrepresentation of mothers with high SES (48.2%) in the study population (*n*=62), as shown in Table 1. A chi-squared test with hair treatment (tinted, bleached, nature) and Winkler index (low SES, middle SES, and high SES) of the whole study population (*n*=239) showed a significant relation between SES and hair treatment (*p*=.015).

Hair of pregnant women contains more cortisone than cortisol

Distributions of HCC and HCNC are shown in Figure 1(A) and Table 1. We found higher HCNC than HCC for both points in time (*p*<.001). The median of HCNC to HCC ratio was 3.04 and 3.8 in the 2nd and 3rd trimester, respectively. Measured values of HCC ranged from 0.4 to 18.3 pg/mg with a median of 3.7 pg/mg in the 2nd trimester. In the 3rd trimester, HCC ranged from 0.5 to 36.4 pg/mg with a median of 3.8 pg/mg. Measured values of HCNC ranged from 2.0 to 28.1 pg/mg with a median of 11.1 pg/mg in the 2nd trimester. In the 3rd trimester, HCCN ranged from 1.9 to 75.2 pg/mg with a median of 16.9 pg/mg.

Change of HCC and HCNC during pregnancy

Both medians of HCC and HCNC were higher in the 3rd compared to the 2nd trimester. Therefore, we aimed to test

Table 1. Medians of hair cortisol (HCC) and hair cortisone concentrations (HCNC) of the study cohort.

	Sample size	2nd trimester		3rd trimester	
		HCC median n = 59 (P25, P75)	HCNC median n = 58 (P25, P75)	HCC median n = 60 (P25, P75)	HCNC median n = 59 (P25, P75)
Study population	n = 62	3.7 (1.4; 5.6)	11.1 (6.9; 16.9)	3.8 (2.6; 6.5)	16.9 (9.5; 22.3)
Maternal nationality	n = 60				
German	92%	3.6 (1.4; 5.9)	11.8 (7.5; 17.1)	3.1 (2.6; 6.5)	18.1 (9.5; 22.3)
Other	8%	3.3 (1.3; 4.3)	6.2 (2.6; 6.8)	3.8 (2.4; 6.6)	16.5 (6.1; 30.5)
Maternal education (years)	n = 60				
10–11	15%	4.5 (1.9; 8.0)	10.1 (5.3; 13.3)	3.7 (2.4; 5.9)	11.7 (9.8; 34.6)
>11	85%	3.5 (1.3; 5.6)	11.7 (7.3; 17.1)	3.9 (2.6; 6.4)	17.4 (9.9; 22.4)
Socioeconomic status (SES) (Winkler index)	n = 56				
Low SES	11%	3.6 (2.3; 5.4)	10.1 (7.7; 13.3)	5.2 (3.8; 6.9)	15.2 (10.5; 21.4)
Middle SES	41%	3.8 (2.3; 5.7)	11.6 (7.4; 14.6)	4.2 (2.3; 8.9)	18.8 (10.1; 24.2)
High SES	48%	3.2 (1.1; 5.5)	9.7 (4.9; 17.1)	3.2 (2.5; 4.4)	14.4 (8.6; 20.6)
Maternal age at delivery (years)	n = 62				
≤25	21%	2.4 (1.0; 3.7)	9.4 (7.2; 11.5)	3.4 (2.6; 4.8)	11.0 (7.3; 20.6)
>25 ≤30	37%	3.9 (1.8; 7.2)	13.4 (9.0; 17.3)	3.3 (2.0; 5.6)	14.6 (10.1; 21.6)
>30 ≤35	27%	4.1 (2.1; 5.6)	11.9 (3.1; 15.8)	4.3 (2.6; 8.5)	18.0 (13.5; 30.5)
>35 ≤40	15%	4.7 (2.6; 6.9)	11.5 (7.0; 17.5)	4.7 (3.4; 5.7)	22.3 (16.1; 26.0)
Maternal BMI at first detection of gravidity	n = 60				
Underweight	2%	3.6	2.0	0.5	1.9
Normal	82%	3.6 (1.3; 5.7)	11.4 (6.6; 17.0)	3.9 (2.9; 6.6)	17.9 (11.7; 22.5)
Overweight	13%	4.6 (1.6; 5.6)	14.4 (9.4; 18.9)	2.7 (1.9; 4.1)	15.1 (8.1; 22.0)
Obese	3%	2.0 (0.4; –)	6.4 (2.6; –)	1.4	6.2
Smoking during pregnancy	n = 61				
No	97%	3.7 (1.6; 5.6)	11.1 (6.9; 16.6)	3.8 (2.5; 6.5)	16.9 (9.2; 22.4)
Yes	3%	4.4 (1.0; –)	13.8 (7.0; –)	2.6 (2.6; –)	15.2 (9.2; –)
PHQ-9 depression scale	n = 52				
Minimal (0–4 points)		3.7 (1.6; 6.2)	12.7 (10.1; 17.3)	3.3 (2.2; 5.1)	15.5 (8.5; 21.4)
Mild (5–9 points)		3.2 (1.4; 4.4)	6.3 (3.7; 15.6)	3.3 (2.6; 6.5)	17.9 (9.8; 24.5)
Moderate (10–14 points)		2.5 (1.7; 11.4)	10.7 (8.0; 21.2)	3.7 (3.4; –)	11.7 (7.1; –)

The study cohort is divided in different groups with respective medians of HCC and HCNC for the 2nd and 3rd trimester. Concentrations are given in pg/mg. P25: 25th percentile; P75: 75th percentile.

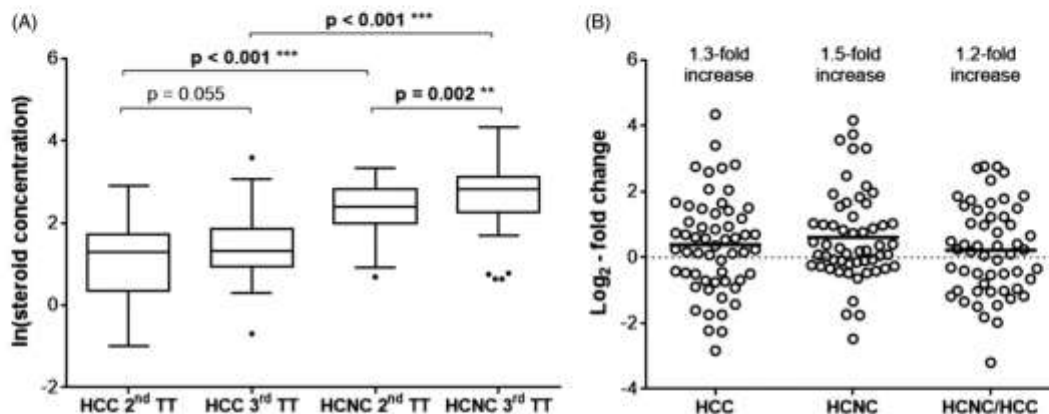


Figure 1. Distribution and change of hair steroid concentrations during pregnancy. Shown are: (A) ln-transformed hair cortisol (HCC) and cortisone concentration (HCNC) in the 2nd and 3rd trimester (TT) and (B) log₂-fold change of HCC, HCNC, and of the ratio HCNC/HCC from the 2nd to the 3rd TT. (A) is presented as Box-and-Whisker plot (Tukey) with outliers shown as dots. In (B) circles correspond to single individuals and the respective mean is presented as a black line. The actual mean fold increase ($2^{\log_2\text{-fold change}}$) is stated. Significances were calculated using the paired t-test. n(HCC) = 57; n(HCNC) = 55.

whether this increase was significant. Graphic representation of ln-transformed data for HCC and HCNC showed normal distribution. Paired t-test for HCC in the 2nd and 3rd trimester showed no significant difference of the mean of HCC from the 2nd to 3rd trimester (Δ mean = 0.265, $T = 1.963$, $p = .055$, CI = -0.005; 0.535), but the narrow confidence interval suggests a positive trend, even though we could not reject the null hypothesis (see Figure 1(A)). A paired t-test for HCNC in the 2nd and 3rd trimester showed a significant increase of the mean of HCNC from the 2nd to the 3rd

trimester (Δ mean = 0.436, $T = 3.366$, $p = .002$, CI = 0.176; 0.696). A paired t-test for the ln-transformed ratio of HCNC to HCC showed no significant increase of the mean from the 2nd to the 3rd trimester (Δ mean = 0.164, $T = 1.278$, $p = .207$, CI = -0.091; 0.421).

To account for different individual cortisol and cortisone levels, we analyzed the fold-change of steroid concentrations between the 2nd and 3rd trimesters of the individual mothers. The log₂-fold change of HCC, HCNC, and the ratio of both are shown in Figure 1(B). Both HCC and HCNC increased

Table 2. Multivariate associations between potential confounders and hair cortisol (HCC) and hair cortisone concentrations (HCNC) and ratio of both steroids (HCNC/HCC).

	2nd trimester			3rd trimester		
	HCC ($R^2 = 0.16$; $\text{min}_{\text{DE}} = 0.37$) b (95% CI)	HCNC ($R^2 = 0.20$; $\text{min}_{\text{DE}} = 0.38$) b (95% CI)	Ratio (HCNC/HCC) ($R^2 = 0.16$; $\text{min}_{\text{DE}} = 0.39$) b (95% CI)	HCC ($R^2 = 0.22$; $\text{min}_{\text{DE}} = 0.35$) b (95% CI)	HCNC ($R^2 = 0.34$; $\text{min}_{\text{DE}} = 0.36$) b (95% CI)	Ratio (HCNC/HCC) ($R^2 = 0.13$; $\text{min}_{\text{DE}} = 0.36$) b (95% CI)
Maternal age at delivery (years)						
≤25	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
>25 ≤30	0.67 (−0.05; 1.38)	0.06 (−0.46; 0.58)	−0.57 (−1.26; 0.11)	−0.57 (−1.19; 0.05)	−0.29 (−0.94; 0.36)	−0.28 (−0.39; 0.95)
>30 ≤35	0.56 (−0.16; 1.28)	−0.04 (−0.57; 0.49)	−0.51 (−1.21; 0.20)	−0.07 (−0.65; 0.52)	0.09 (−0.52; 0.70)	0.16 (−0.47; 0.80)
>35 ≤40	0.82 (−0.01; 1.65)	0.01 (−0.50; 0.70)	−0.79 (−1.62; 0.03)	0.18 (0.84; 0.48)	0.04 (−0.64; 0.73)	0.22 (−0.49; 0.93)
Maternal BMI at first detection of gravidity						
Underweight & normal	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
Overweight & obese	−0.11 (−0.83; 0.61)	0.01 (−0.54; 0.56)	0.31 (−0.42; 1.04)	−0.17 (−0.73; 0.39)	0.01 (−0.58; 0.59)	0.17 (−0.43; 0.77)
Newborn's gender						
Male	0.16 (−0.35; 0.66)	−0.03 (−0.34; 0.40)	−0.19 (−0.68; 0.31)	−0.13 (−0.55; 0.30)	−0.10 (−0.55; 0.35)	0.02 (−0.44; 0.49)
Female	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
Hair washing						
1–3 d/week	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
Every 2nd day	−0.28 (−0.83; 0.27)	−0.42* (−0.81; −0.02)	−0.10 (−0.63; 0.43)	−0.21 (−0.66; 0.25)	−0.27 (−0.73; 0.20)	−0.06 (−0.54; 0.42)
4–6 d/week	0.48 (−0.83; 1.79)	0.43 (−0.52; 1.38)	−0.11 (−1.37; 1.15)	−0.18 (−1.72; 1.36)	−1.30 (−2.88; 0.28)	−1.12 (−2.76; 0.52)
Daily	0.11 (−0.87; 1.09)	−0.57 (−1.37; 0.23)	−1.00 (−2.06; 0.06)	−1.01* (−1.73; −0.28)	−1.38* (−2.19; −0.57)	−0.37 (−1.21; 0.52)
Location of hair sample						
Occipital	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
Parietal/temporal	−0.10 (−0.59; 0.39)	−0.09 (−0.45; 0.26)	−0.05 (−0.53; 0.42)	0.18 (−0.29; 0.64)	0.49* (0.02; 0.97)	0.32 (−0.18; 0.81)

Shown are potential confounders of HCC and HCNC and the respective linear regression coefficient (b), 95% confidence interval (95% CI) and reference category in regression model (ref.). R^2 and minimum detectible effect sizes (min_{DE}) were added for each model. Steroid concentrations and ratio were ln-transformed. * $p < .05$. Bold face indicates significant associations.

Table 3. Medians of subscale scores of Patients Health Questionnaire (PHQ) at 2nd and 3rd trimester and median subscale score change.

	n	2nd trimester Score median (P25, P75)	3rd trimester Score median (P25, P75)	3rd trimester – 2nd trimester median of score change (P25, P75)
PHQ-9 depression scale	52	4.0 (2.0; 6.8)	4.0 (3.0; 7.0)	0.0 (−2.0; 1.8)
PHQ-15 somatization scale	52	7.0 (5.0; 10.0)	8.0 (5.0; 11.8)	1.0 (−2.0; 3.0)
PHQ- stress scale	52	3.0 (1.5; 5.0)	2.0 (1.0; 4.0)	−1.0 (−2.8; 0.0)*

Shown are PHQ-9 as subscale for depression, PHQ-15 as subscale for somatization and PHQ-stress as subscale for stress. P25: 25th percentile; P75: 75th percentile. *Wilcoxon signed-rank test significant at $p < .05$.

from the 2nd to the 3rd trimester, the same applies to the ratio (mean fold change: HCC = 1.3; HCNC = 1.5; HCNC/HCC = 1.2).

Confounders of HCC and HCNC

In a multivariate regression model, we included maternal BMI and gender of the child as potential confounders, as recommended by Braig et al. (2015a) and Rippe et al. (2016), and confounders which showed an association in linear regression (Supplementary Tables S1 and S2). Results of the multiple linear regressions are shown in Table 2. Therefore, daily hair washing turned out to have a major effect, with lower HCC ($b = -1.01$; $p = .008$) and lower HCNC ($b = -1.38$, $p < .001$) in the 3rd trimester. Similarly, hair washing every 2nd day was associated with lower HCNC in the 2nd trimester ($b = -0.42$, $p = .040$). Thus, frequent hair washing can lead to significantly lower steroid concentrations in hair samples. The hair samples obtained from the parietal/temporal region of the head were related to higher HCNC in the 3rd trimester compared to the occipital samples ($b = 0.49$, $p = .043$). We did not find this effect with HCC or with the ratio of steroids. After adjusting for other factors, age, the mother's BMI, and gender of

the child had no significant influence on HCC, HCNC, and the ratio of both.

Negative associations of Patient Health Questionnaire subscores with HCNC, change of HCNC, and the change of the ratio of steroids

Of the 62 pregnant women, 45 with complete data sets of PHQ in both trimesters were included. Characteristics of the PHQ subscale scores are shown in Table 3. Most mothers showed a minimal level on the depression scale (median: 4 of 27 points), and a low degree of somatization symptoms (median: <10 of 30 points) and psychological stressors (median: <5 of 20 points). Spearman correlation between the subscales of depression, somatization, and stress were highly correlated across both trimesters (all $p < .001$). The average of depression scores did not change, whereas the average of the somatization scores increased slightly (Δ PHQ median = 1), and the average of the stress scores decreased slightly (Δ PHQ median = −1). Wilcoxon signed-rank test of score change turned out to be significant only for the stress score ($p = .001$) but not for the depression and somatization score (both $p > .10$) (Table 3). We investigated if PHQ

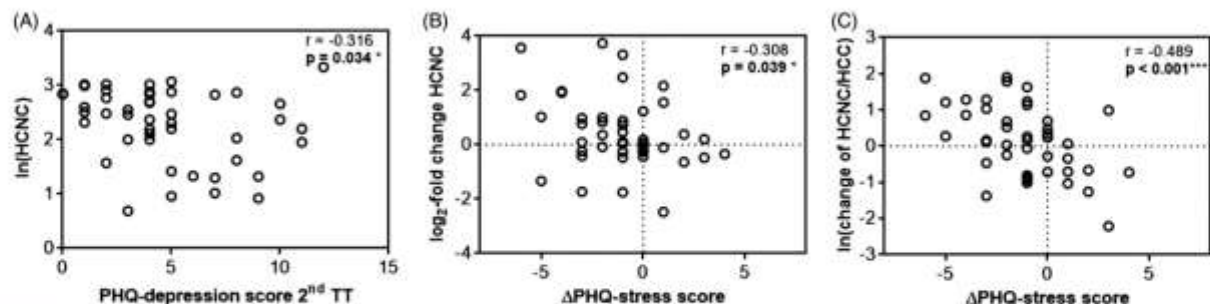


Figure 2. Significant correlations between hair steroid concentrations and Patient Health Questionnaire (PHQ) subscores. Shown are (A) correlation between HCNC in the 2nd trimester (TT) and the PHQ depression score (PHQ-9), (B) correlation between \log_2 -fold change of HCNC and the change of the stress score (Δ PHQ-stress score), and (C) correlation between the change of the ratio of HCNC/HCC and the change of the stress score (Δ PHQ-stress score), with respective Spearman correlation coefficient r and corresponding p value. Steroid concentrations were \ln -transformed. Circles correspond to single individuals. $n = 45$.

subscores are associated with HCC or HCNC in the 2nd and 3rd trimester, and if the changes in PHQ subscores are associated with the increase of HCC or HCNC or the change of the ratio HCNC/HCC. Significant associations are shown in Figure 2. The depression score showed a negative correlation with HCNC in the 2nd trimester ($r = -0.32$, $p = .034$, Figure 2(A)). We also found a negative correlation with the change of stress score and the fold-change of HCN ($r = -0.31$, $p = .039$, Figure 2(B)) and the change in the ratio HCNC/HCC ($r = -0.49$, $p < .001$, Figure 2(C)).

Discussion

In this study, we detected (1) an increase in HCC and HCNC from the 2nd to the 3rd trimester of pregnancy using LC-MS³, found (2) a negative association between cortisone concentrations and depression questionnaire scores and (3) between the stress score change and the change in HCNC and the ratio of HCNC/HCC, and identified (4) an independent association of frequent hair washing with lower hair cortisol and cortisone levels. We suggest (5) considering both hair cortisol and cortisone, rather than cortisol alone, when investigating long-term stress in pregnant women.

Cortisol levels increase during pregnancy and have been suggested to be essential for normal fetal organogenesis and the initiation of labor (Smith & Shearman, 1974). Accordingly, researchers have described a 1.5-fold increase in cortisol levels in hair and saliva (D'Anna-Hernandez et al., 2011) and a 3-fold increase in urine and plasma (Jung et al., 2011) by the 3rd trimester, compared to levels in non-pregnant women. We found a similar increase in HCC from the 2nd to the 3rd trimester, but we are apparently the first to detect an increase in HCNC during pregnancy. Interestingly, HCNC was higher than HCC at both timepoints, underlining the importance of the inactivation of cortisol into cortisone through 11B-HSD type 2. HCNC is also higher than HCC in non-pregnant individuals (Ullmann et al., 2016). 11B-HSD is expressed in peripheral tissues, in the placenta (Sun et al., 1997), in human epithelial tissues (Smith et al., 1996), and in hair follicle associated cells (Hennebert et al., 2007), which is especially noteworthy since steroid concentrations in hair were analyzed. Activity of 11B-HSD type 2 can be indirectly assessed with the ratio of cortisone to cortisol (Ghaemmaghami et al., 2014; Wilson & Thayer, 2017).

The lacking association of perceived stress with HCC has previously been described by two large cohort studies (Braig et al., 2015b; Kramer et al., 2009). We found significant negative associations of PHQ subscores with HCNC and the ratio of HCNC to HCC, but never with HCC alone, underlining the importance of simultaneous determination of HCNC and HCC – especially regarding the ratio as an indirect marker of 11B-HSD activity. We found HCNC to be negatively associated with the PHQ depression score in the 2nd trimester. This suggests that pregnant women who reported higher degrees of depressive symptoms have lower HCNC in early pregnancy. This could be due to inefficient conversion of cortisol to cortisone through 11B-HSD or stressor-induced excess of cortisol. However, the ratio of HCNC to HCC was not associated with the PHQ subscores in the 2nd trimester. Over the course of pregnancy, both HCNC change and the change of the ratio of HCNC to HCC were negatively associated with the change in the stress scores. Therefore, pregnant woman who experienced an increase in stress symptoms during pregnancy seem to have a decrease in HCNC, possibly due to lower activity of 11B-HSD conversion of cortisol to cortisone. Consequently, women who experienced a decrease in stress symptoms during pregnancy may have had an increase in HCNC due to higher activity of 11B-HSD. A negative association between 11B-HSD type 2 and prenatal anxiety and depression has been previously described (O'Donnell et al., 2012; Seth et al., 2015). In line with our results, Seth et al. found a particularly prominent effect during late gestation. Nevertheless, we could not display this effect with other subscores. Stronger associations might have been achieved if a pregnancy-specific stress questionnaire (Lobel et al., 2008), rather than a questionnaire for general stress (PHQ), had been used. Moreover, there is a temporal mismatch between the accumulated steroids in the hair samples and the time-span of the questionnaire, especially for the depression score (which refers to the previous two weeks), since it has been shown that hair is deeply embedded in the skin and that the first 1–5 mm near the scalp cannot be cut with scissors (LeBeau, Montgomery, & Brewer, 2011).

Furthermore, confounders of steroids could hinder finding associations with self-reported stress. We investigated potential influences on HCC and HCNC, even though data from large cohort studies are already available (Braig et al., 2015a; Rippe et al., 2016), because we analyzed both steroids via

precise and reliable LC-MS³. Moreover, we only analyzed natural hair samples, thereby avoiding bias caused by bleached and tinted hair (Gaudi et al., 2016; Serwinski et al., 2016). After adjusting for potential confounders (maternal age, maternal BMI, newborn's gender, hair washing frequency, and location of hair sample), we only found frequent (every 2nd day and daily) hair washing to be independently associated with lower HCC and HCNC. The same effect has been shown by Rippe et al. (2016) and Staufenbiel, Penninx, de Rijke, van den Akker, and van Rossum (2015). Interestingly, the ratio of steroids was not confounded by any factor in the multivariate analysis.

However, the small study sample, detection of perceived general stress rather than pregnancy-specific stress, a temporal mismatch of questionnaire timespan, as well as self-selection and recall bias might explain why the associations could only be found with some subscores and not at both dates.

Conclusion

We analyzed hair cortisol and cortisone of pregnant woman using precise and reliable LC-MS³. By measuring hair steroid concentrations and collecting questionnaires about symptoms of depression, somatization, and stress for two timepoints during pregnancy (2nd and 3rd trimester), we found a negative association of cortisol/cortisone metabolism with self-reported stress over the course of pregnancy. Furthermore, frequent hair washing was associated with lower HCC and HCNC, thereby confounding the analysis. In further epidemiological studies, possible confounders and general and pregnancy-specific stress questionnaires should be considered. Additionally, different biomarkers like HCC, HCNC, 11B-HSD type 2, and CRH should be investigated to capture the interactions of the HPA axis in their entirety. To study a global picture, investigations should be done in an ethnically mixed group of healthy and non-healthy participants at several dates.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This publication is supported by LIFE – Leipzig Research Center for Civilization Diseases, Leipzig University. LIFE is funded by means of the European Union, by the European Regional Development Fund (ERDF), and by means of the Free State of Saxony within the framework of the excellence initiative.

References

- Bolten, M.J., Wurmser, H., Buske-Kirschbaum, A., Papoušek, M., Pirke, K.M., & Hellhammer, D. (2011). Cortisol levels in pregnancy as a psychobiological predictor for birth weight. *Archives of Women's Mental Health, 14*, 33–41. Doi: 10.1007/s00737-010-0183-1.
- Braig, S., Grabber, F., Ntomchukwu, C., Reister, F., Stalder, T., Kirschbaum, C., ... Rothenbacher, D. (2015a). Determinants of maternal hair cortisol concentrations at delivery reflecting the last trimester of pregnancy. *Psychoneuroendocrinology, 52*, 289–296. Doi: 10.1016/j.psyneuen.2014.12.006.
- Braig, S., Grabber, F., Ntomchukwu, C., Reister, F., Stalder, T., Kirschbaum, C., ... Genuneit, J. (2015b). The association of hair cortisol with self-reported chronic psychosocial stress and symptoms of anxiety and depression in women shortly after delivery. *Pediatric and Perinatal Epidemiology, 30*, 97–104. Doi: 10.1111/ppe.12255.
- D'Anna-Hernandez, K.L., Ross, R.G., Natvig, C.L., & Laudenslager, M.L. (2011). Hair cortisol levels as a retrospective marker of hypothalamic-pituitary axis activity throughout pregnancy: Comparison to salivary cortisol. *Physiology & Behavior, 104*, 348–353. Doi: 10.1016/j.physbeh.2011.02.041.
- Davenport, M.D., Tiefenbacher, S., Lutz, C.K., Novak, M.A., & Meyer, J.S. (2006). Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques. *General and Comparative Endocrinology, 147*, 255–261. Doi: 10.1016/j.ygcen.2006.01.005.
- Ferrari, P. (2010). The role of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human hypertension. *Biochimica Et Biophysica Acta, 1802*, 1178–1187. Doi: 10.1016/j.bbdis.2009.10.017.
- Gaudi, A., Kratzsch, J., Bae, Y.J., Kiess, W., Thiery, J., & Ceglarek, U. (2016). Liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry for quantitative steroid hormone analysis in plasma, urine, saliva and hair. *Journal of Chromatography A, 1464*, 64–71. Doi: 10.1016/j.chroma.2016.07.087.
- Ghaemmaghami, P., Dainese, S.M., La Marca, R., Zimmermann, R., & Ehlert, U. (2014). The association between the acute psychobiological stress response in second trimester pregnant women, amniotic fluid glucocorticoids, and neonatal birth outcome. *Developmental Psychobiology, 56*, 734–747. Doi: 10.1002/dev.21142.
- Hennebert, O., Chalbot, S., Alran, S., & Morfin, R. (2007). Dehydroepiandrosterone 7α-hydroxylation in human tissues: Possible interference with type 1 11β-hydroxysteroid dehydrogenase-mediated processes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 104*, 326–333. Doi: 10.1016/j.jsbmb.2007.03.026.
- Jung, C., Ho, J.T., Torpy, D.J., Rogers, A., Doogue, M., Lewis, J.G., ... Inder, W.J. (2011). A longitudinal study of plasma and urinary cortisol in pregnancy and postpartum. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 96*, 1533–1540. Doi: 10.1210/jc.2010-2395.
- Kalra, S., Einarson, A., Karaskov, T., van Uum, S., & Koren, G. (2007). The relationship between stress and hair cortisol in healthy pregnant women. *Clinical & Investigative Medicine, 30*, 103–107. Doi: 10.25011/cim.v30i2.986.
- Karlén, J., Frostell, A., Theodorsson, E., Faresjö, T., & Ludvigsson, J. (2013). Maternal influence on child HPA axis: A prospective study of cortisol levels in hair. *Pediatrics, 132*, 1333–1340. Doi: 10.1542/peds.2013-1178.
- Kramer, M.S., Lydon, J., Séguin, L., Goulet, L., Kahn, S.R., McNamara, H., ... Platt, R.W. (2009). Stress pathways to spontaneous preterm birth: The role of stressors, psychological distress, and stress hormones. *American Journal of Epidemiology, 169*, 1319–1326. Doi: 10.1093/aje/kwp061.
- Kroenke, K., Spitzer, R.L., & Williams, J.B.W. (2001). The PHQ-9: validity of a brief depression severity measure. *Journal of General Internal Medicine, 16*, 606–613. Doi: 10.1046/j.1525-1497.2001.016009606.x.
- Kroenke, K., Spitzer, R.L., Williams, J.B.W., & Lowe, B. (2010). The patient health questionnaire somatic, anxiety, and depressive symptom scales: A systematic review. *General Hospital Psychiatry, 32*, 345–359. Doi: 10.1016/j.genhosppsych.2010.03.006.
- Kudielka, B.M., Hellhammer, D.H., & Wüst, S. (2009). Why do we respond so differently? Reviewing determinants of human salivary cortisol responses to challenge. *Psychoneuroendocrinology, 34*, 2–18. Doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.10.004.
- Lampert, T., Kroll, L.E., Muters, S., & Stolzenberg, H. (2013). Measurement of the socioeconomic status within the German Health Update 2009 (GEDA). *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz, 56*, 131–143. Doi: 10.1007/s00103-012-1583-3.
- LeBeau, M.A., Montgomery, M.A., & Brewer, J.D. (2011). The role of variations in growth rate and sample collection on interpreting results of segmental analyses of hair. *Forensic Science International, 210*, 110–116. Doi: 10.1016/j.forsciint.2011.02.015.

- Lobel, M., Cannella, D.L., Graham, J.E., DeVincent, C., Schneider, J., & Meyer, B.A. (2008). Pregnancy-specific stress, prenatal health behaviors, and birth outcomes. *Health Psychology: Official Journal of the Division of Health Psychology, American Psychological Association, 27*, 604–615. Doi: 10.1037/a0013242.
- Löwe, B., Spitzer, R.L., Zipfel, S., & Herzog, W. (2002). Gesundheitsfragebogen für Patienten (PHQ-D). Manual. Komplettversion und Kurzform. Heidelberg: Universität Heidelberg. [cited 2016 Aug 8]. Available from: URL: https://www.klinikum.uni-heidelberg.de/fileadmin/medizinische_klinik/Abteilung_2/pdf/Komplett_PHQ_Fragebogen.pdf.
- O'Donnell, K.J., Bugge Jensen, A., Freeman, L., Khalife, N., O'Connor, T.G., & Glover, V. (2012). Maternal prenatal anxiety and downregulation of placental 11 β -HSD2. *Psychoneuroendocrinology, 37*, 818–826. Doi: 10.1016/j.psyneuen.2011.09.014.
- Poulain, T., Baber, R., Vogel, M., Pietzner, D., Kirsten, T., Jurkatat, A., ... Kiess, W. (2017). The LIFE Child study: A population-based perinatal and pediatric cohort in Germany. *European Journal of Epidemiology, 32*, 145–158. Doi: 10.1007/s10654-016-0216-9.
- Quante, M., Hesse, M., Döhner, M., Fuchs, M., Hirsch, C., Sergejev, E., ... Kiess, W. LIFE Child Study Investigators. (2012). The LIFE child study: A life course approach to disease and health. *BMC Public Health, 12*, 1021. Doi: 10.1186/1471-2458-12-1021.
- Rippe, R.C.A., Noppe, G., Windhorst, D.A., Tiemeier, H., van Rossum, E.F.C., Jaddoe, V.W.V., ... van den Akker, E.L.T. (2016). Splitting hair for cortisol? Associations of socio-economic status, ethnicity, hair color, gender and other child characteristics with hair cortisol and cortisone. *Psychoneuroendocrinology, 66*, 56–64. Doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.12.016.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., & Munck, A.U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews, 21*, 55–89. Doi: 10.1210/er.21.1.55.
- Serwinski, B., Salavec, G., Kirschbaum, C., & Steptoe, A. (2016). Associations between hair cortisol concentration, income, income dynamics and status incongruity in healthy middle-aged women. *Psychoneuroendocrinology, 67*, 182–188. Doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.02.008.
- Seth, S., Lewis, A.J., Saffery, R., Lappas, M., & Galbally, M. (2015). Maternal prenatal mental health and placental 11 β -HSD2 gene expression: Initial findings from the mercy pregnancy and Emotional Wellbeing Study. *International Journal of Molecular Sciences, 16*, 27482–27496. Doi: 10.3390/ijms161126034.
- Short, S.J., Stalder, T., Marceau, K., Entringer, S., Moog, N.K., Shirtcliff, E.A., ... Buss, C. (2016). Correspondence between hair cortisol concentrations and 30-day integrated daily salivary and weekly urinary cortisol measures. *Psychoneuroendocrinology, 71*, 12–18. Doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.05.007.
- Smith, I.D., & Shearman, R.P. (1974). Fetal plasma steroids in relation to parturition. I. The effect of gestational age upon umbilical plasma corticosteroid levels following vaginal delivery. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology, 81*, 11–15. Doi: 10.1111/j.1471-0528.1974.tb00357.x.
- Smith, R.E., McGuire, J.A., Stein-Oakley, A.N., Sasano, H., Takahashi, K., Fukushima, K., & Krozowski, Z.S. (1996). Localization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II in human epithelial tissues. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 81*, 3244–3248. Doi: 10.1210/jcem.81.9.8784076.
- Spitzer, R.L., Kroenke, K., & Williams, J.B. DSW the Patient Health Questionnaire Primary Care Study Group (1999). Validation and utility of a self-report version of PRIME-MD: The PHQ primary care study. *JAMA, 282*, 1737–1744. Doi: 10.1001/jama.282.18.1737.
- Stalder, T., Steudte, S., Miller, R., Skoluda, N., Dettenborn, L., & Kirschbaum, C. (2012). Intraindividual stability of hair cortisol concentrations. *Psychoneuroendocrinology, 37*, 602–610. Doi: 10.1016/j.psyneuen.2011.08.007.
- Staufenbiel, S.M., Penninx, B., Spijker, A.T., Elzinga, B.M., & van Rossum, E. (2013). Hair cortisol, stress exposure, and mental health in humans: A systematic review. *Psychoneuroendocrinology, 38*, 1220–1235. Doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.11.015.
- Staufenbiel, S.M., Penninx, B.W., de Rijke, Y.B., van den Akker, E.L.T., & van Rossum, E.F.C. (2015). Determinants of hair cortisol and hair cortisone concentrations in adults. *Psychoneuroendocrinology, 60*, 182–194. Doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.06.011.
- Sun, K., Yang, K., & Challis, J.R. (1997). Differential expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in human placenta and fetal membranes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 82*, 300–305. Doi: 10.1210/jcem.82.1.3681.
- Ullmann, E., Barthel, A., Petrowski, K., Stalder, T., Kirschbaum, C., & Bornstein, S.R. (2016). Pilot study of adrenal steroid hormones in hair as an indicator of chronic mental and physical stress. *Scientific Reports, 6*, 25842. Doi: 10.1038/srep25842.
- van Uum, S., Sauvé, B., Fraser, L.A., Morley-Forster, P., Paul, T.L., & Koren, G. (2008). Elevated content of cortisol in hair of patients with severe chronic pain: A novel biomarker for stress. *Stress (Amsterdam, Netherlands), 11*, 483–488. Doi: 10.1080/10253890801887388.
- Vanaelst, B., Huybrechts, I., Bammann, K., Michels, N., de Vriendt, T., Vyncke, K., ... de Henauw, S. (2012). Interrelations between serum, salivary, and hair cortisol and child-reported estimates of stress in elementary school girls. *Psychophysiology, 49*, 1072–1081. Doi: 10.1111/j.1469-8986.2012.01396.x.
- Wenig, R. (2000). Potential problems with the interpretation of hair analysis results. *Forensic Science International, 107*, 5–12. Doi: 10.1016/S0379-0738(99)00146-2.
- Wilson, M., & Thayer, Z. (2017). Maternal salivary cortisone to cortisol ratio in late pregnancy: An improved method for predicting offspring birth weight. *Psychoneuroendocrinology, 78*, 10–13. Doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.12.018.
- Winkler, J., & Stolzenberg, H. (2009). Adjustierung des Sozialen-Schicht-Index für die Anwendung im Kinder- und Jugendgesundheitsurvey (KIGGS) (Adjustments of the social class index for application in the German Childhood and Youth Health Survey (KIGGS))2003/2006. Available from: URL: http://www.wi.hs-wismar.de/~wdp/2009/0907_WinklerStolzenberg.pdf.
- World Health Organization. (2000). *Obesity: Preventing and managing the global epidemic*. 894th ed. Geneva: World Health Organization; (WHO Technical Report Series).

5. ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades *doctor medicinae* (Dr. med.)

Haarcortisol als Marker für Stress in der Schwangerschaft?

Evaluation der Änderung von Haarcortisol und -cortison in der Schwangerschaft und des Zusammenhangs mit selbstangegebenen Depressions-, Somatisierungs- und Stressscores

Eingereicht von: Friederike Scharlau

Angefertigt an: Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Medizinische Fakultät, Universität Leipzig

Betreut von: Prof. Dr. med. Wieland Kiess
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Medizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im: Juni 2018

Hintergrund

Die körperliche Reaktion auf Stressoren erfolgt zum einen über die Aktivierung des Sympathikus mit der Ausschüttung der Effektoren Adrenalin und Noradrenalin und zum anderen über die nachfolgende Aktivierung der Hypothalamus- Hypophysen- Nebennierenrinden-Achse (Engl. hypothalamic- pituitary- adrenocortical axis [HPA]). Dabei folgt der Ausschüttung von Corticoliberin (Engl. corticotropin- releasing hormone [CRH]) aus dem Hypothalamus die hypophysäre Ausschüttung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH), welche letztendlich zur gesteigerten Ausschüttung des Glukokortikoids Cortisol aus der Nebennierenrinde (NNR) führt (Schartl et al., 2013). Der finale Effektor Cortisol führt über Rezeptorbindung zu geänderter Genexpression (Bamberger, 1996, Seckl, 1997), die wiederum zur metabolischen Gewinnung von Energiereserven führt (Sapolsky et al., 2000, Tegethoff et al., 2009). Gleichzeitig inhibiert Cortisol die Ausschüttung von CRH über eine negative Feedbackhemmung (Golenhofen, 1997). Zur Modulierung der

Stressreaktion kann Cortisol in seinen inaktiven Metaboliten Cortison durch das Enzym 11 β -Hydroxysteroid- Dehydrogenase (11B- HSD) Typ 2 umgewandelt werden. 11B- HSD Typ 2 wird hauptsächlich in den Nieren, im Kolon und in den Schweißdrüsen exprimiert (Smith et al., 1996). Das Enzym findet sich aber auch in der Plazenta, wo es den Fetus vor schwangerschaftsinduziertem erhöhten maternalen Cortisol schützen soll (Sun et al., 1997). Das Verhältnis von Cortison zu Cortisol wird als indirekter Marker für die Aktivität des Enzyms 11B- HSD Typ 2 genutzt (Ghaemmaghami et al., 2014, Wilson & Thayer, 2017). Die Umkehrreaktion wird durch die 11B- HSD Typ 1 vor allem im Leber- und Fettgewebe ermöglicht (Ferrari, 2010). Die Konzentration von Steroiden unterliegt Einflussfaktoren wie u.a. zirkadianem Rhythmus (Adam et al., 2006), Nahrungsaufnahme (Kudielka et al., 2009) und physischer Aktivität (Gatti & Palo, 2011). Die Konzentrationen in Flüssigmedien wie Blut, Urin oder Speichel zeigen daher nur eine momentane Abbildung der HPA- Aktivität. Im Gegensatz dazu kann die Bestimmung von Steroiden im Haar die physiologische Stressantwort über Monate darstellen (D'Anna- Hernandez et al., 2011, Vanaelst et al., 2012). Folglich wurden erhöhte Haarcortisolkonzentrationen (Engl. hair cortisol concentration [HCC]) nach langanhaltender Stressexposition in Menschen (Van Uum et al., 2008, Staufenbiel et al., 2013) und in Affen (Davenport et al., 2006) gefunden. Außerdem steigt die HCC in der Schwangerschaft (D'Anna- Hernandez et al., 2011). Dabei wird angenommen, dass erhöhte Glukokortikoidkonzentrationen essentiell für eine normale Entwicklung des Fetus und Einleitung der Geburt sind (Smith & Shearman, 1974).

Studien über den Zusammenhang zwischen Steroidkonzentrationen und selbstangegebenem Stress in der Schwangerschaft sind rar und widersprüchlich. Während Kalra et al. (2007) einen Zusammenhang zwischen der HCC und selbstangegebenem Stress fanden, konnten andere Studien (Kramer et al., 2009, Braig et al., 2015b) keinen Zusammenhang zwischen verschiedenen Stressfragebögen und der HCC finden. Einflussfaktoren können zudem die Ergebnisse verfälschen. Zahlreiche Studien untersuchten verschiedene Einflussfaktoren auf die HCC in Schwangeren (Kramer et al., 2009, Bolten et al., 2011, D'Anna- Hernandez et al., 2011, Karlen et al., 2011, Braig et al., 2015a), doch nur der Zusammenhang zwischen der HCC und dem Geburtsgewicht war reproduzierbar. Die Haarcortisonkonzentration (Engl. hair cortisone concentration [HCNC]) und diesbezügliche Einflussfaktoren waren vor dieser Dissertation noch nicht untersucht worden. Da Cortison der durch 11B- HSD inaktivierte Metabolit von Cortisol ist und ein Zusammenhang zwischen verminderter 11B- HSD Aktivität und pränataler Angst beschrieben wurde (O'Donnell et al., 2012, Seth et al.,

2015), haben wir untersucht, ob beide Steroide, Cortisol und Cortison, als Biomarker für pränatalen Stress genutzt werden könnten.

In unserer Untersuchung nutzten wir Daten aus der LIFE CHILD Studie (Quante et al., 2012, Poulain et al., 2017) von Dezember 2011 bis November 2014. Die Schwangeren nahmen an Untersuchungen im 2. Trimester (24.- 26. Schwangerschaftswoche [SSW]) und 3. Trimester (34.- 36. SSW) teil. Daten über physische und mentale Zustände, Verhalten und sozioökonomischer Status wurden zu beiden Zeitpunkten erhoben. Die Daten wurden pseudonymisiert. Das Studienprotokoll ist durch das Ethikkomitee der Universität Leipzig geprüft (Reg. Nr. 264-10-19042010). Die LIFE CHILD Studie ist unter der Nummer NCT02550236 registriert.

In unserer Studie haben wir die HCC und HCNC in Naturhaaren von Schwangeren im 2. und 3. Trimester mit Hilfe von Hochdruckflüssigchromatographie- Massenspektrometrie mit linearem Quadrupol- Ionenfallenspektrometer (HPLC- MS³) bestimmt (Gaudl et al., 2016). Am selben Tag der Haarprobenentnahme füllten die Schwangeren selbstständig Fragebögen zu Symptomen von Depression, Somatisierung und Stress mittels des Patient Health Questionnaire (PHQ) aus. Unser Ziel war es, die Veränderung der Haarsteroidwerte und der Punktwerte der Fragebögen (Engl. scores) zu vergleichen und zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen den Änderungen gibt.

Wir erwarteten einen Zusammenhang zwischen den Steroidwerten und den Stressscores der subjektiven Symptome, ebenso wie einen Zusammenhang zwischen der Änderung der Steroidwerte und der Änderung der Stressscores über den Zeitraum der Schwangerschaft. Außerdem erwarteten wir einen Anstieg der HCC und HCNC vom 2. zum 3. Trimester, wie es schon zuvor im Plasma und Urin (Jung et al., 2011) und im Haar und Speichel (D'Anna-Hernandez et al., 2011) gezeigt wurde.

Ergebnisse

Von den 239 Schwangeren, die an der LIFE CHILD Studie zwischen Dezember 2011 und November 2014 teilnahmen, konnten 363 Haarproben gesammelt werden. Ausschlusskriterien für die statistischen Berechnungen waren gefärbte (n = 171) oder getönte (n = 37) Haare, ein einzelner Besuch in der Studienambulanz während der Schwangerschaft (n = 19) und insuffizientes Probenmaterial (n = 12). Von den verbleibenden 124 Haarproben konnten für 115 Proben beide Steroide durch HPLC- MS³

bestimmt werden. Keine Schwangere nahm Steroid- oder Hormonpräparate ein oder litt an einer diagnostizierten psychiatrischen Erkrankung.

Durchschnittlich waren die Mütter 30- jährige Nichtraucherinnen, mit deutscher Nationalität, höherem Schulabschluss (> 11 Jahre) und normalem Body- Mass- Index (BMI). Die ursprüngliche Studiengruppe war hinsichtlich des sozioökonomischen Status (Engl. socioeconomic status [SES]) vergleichbar mit der KiGGS Studie (Lampert et al., 2013), der Ausschluss der gefärbten und getönten Haare führte jedoch zu einer Überrepräsentierung von Müttern mit einem hohem SES (48,2 %) in der Studiengruppe (n = 62). Ein Chi- Quadrat Test der ursprünglichen Studiengruppe (n = 239) zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem SES und der Haarbehandlung (p = 0,015).

Die HCNC war stets höher als die HCC in beiden Trimestern (p < 0,001). Der Median des Verhältnisses HCNC zu HCC (HCNC/HCC) betrug 3,04 im 2. Trimester und 3,8 im 3. Trimester. Die Verteilung der HCC reichte von 0,4 bis 18,3 pg/mg (Median 3,7 pg/mg) im 2. Trimester und von 0,5 bis 36,4 pg/mg (Median 3,8 pg/mg) im 3. Trimester. Die Verteilung der HCNC reichte von 2,0 bis 28,1 pg/mg (Median 11,1 pg/mg) im 2. Trimester und von 1,9 bis 75,2 pg/mg (Median von 16,9 pg/mg) im 3. Trimester.

Um für die statistische Analyse eine Normalverteilung zu erhalten, wurden die gemessenen Werte der HCC und HCNC sowie das Verhältnis HCNC/HCC natürlich logarithmiert (ln[x]). Ein gepaarter t- Test der HCC im 2. und 3. Trimester zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten (Δ Mittelwert = 0,265; T = 1,963; p = 0,055; CI = -0,005; 0,535). Das schmale Konfidenzintervall zeigt jedoch einen positiven Trend. Ein gepaarter t- Test der HCNC im 2. und 3. Trimester ergab hingegen einen signifikanten Anstieg des Mittelwertes vom 2. zum 3. Trimester (Δ Mittelwert = 0,436; T = 3,366; p = 0,002; CI = 0,176; 0,696).

Um den individuellen Unterschieden der Probandinnen in Cortisol- und Cortisonkonzentrationen Rechnung zu tragen, wurde zusätzlich die Veränderung der Steroidkonzentrationen zwischen dem 2. und 3. Trimester für jede Probandin berechnet. Die Änderung der HCC, HCNC und des Verhältnisses HCNC/HCC zeigten durchschnittlich höhere Werte im 3. Trimester verglichen zum 2. Trimester (durchschnittliche x-fache Änderung: HCC = 1,3; HCNC = 1,5; HCNC/HCC = 1,2).

In einem multivariaten Regressionsmodell konnte häufiges Haarewaschen als unabhängiger Einflussfaktor auf die HCC und HCNC identifiziert werden. So zeigten täglich gewaschene

Haare niedrigere Steroidwerte im 3. Trimester (HCC: $b = -1,01$; $p = 0,008$ und HCNC: $b = -1,38$; $p < 0,001$) und jeden zweiten Tag gewaschene Haare eine niedrigere HCNC im 2. Trimester ($b = -0,42$; $p = 0,040$). Andere Faktoren wie Alter der Mutter, BMI, Rauchen und Geschlecht des Kindes hatten keinen signifikanten Einfluss auf die HCC und HCNC.

Die Auswertung des PHQ ergab, dass die Mehrzahl der Mütter in beiden Trimestern subjektiv geringe Ausprägung an Depressions-, Somatisierungs- und Stresssymptomen hat (Median des Depressionsscores: 4 von 27 Punkten; Median des Somatisierungsscores: < 10 von 30 Punkten; Median des Stressscores: > 5 von 20 Punkten). Somit waren die Mütter wenig gestresst. Durchschnittlich änderte sich der Depressionsscore vom 2. zum 3. Trimester nicht, der Somatisierungsscore stieg um einen Scorepunkt und der Stressscore sank um einen Scorepunkt.

Der Depressionsscore zeigte einen negativen Zusammenhang mit der HCNC im 2. Trimester ($r = -0,32$, $p = 0,034$). Außerdem zeigte sich ein negativer Zusammenhang zwischen der Änderung des Stressscores und der Änderung der HCNC ($r = -0,31$, $p = 0,039$) und der Änderung des Verhältnisses HCNC/HCC ($r = -0,49$, $p < 0,001$).

Schlussfolgerung

Cortisolkonzentrationen steigen während der Schwangerschaft und sind essentiell für die Organogenese und Einleitung der Geburt (Smith & Shearman, 1974). In dieser Studie haben wir einen Anstieg der HCC und HCNC vom 2. zum 3. Trimester in der Schwangerschaft nachgewiesen. Dabei stieg die HCC um den Faktor 1,3 und die HCNC um den Faktor 1,5. Frühere Studien konnten bereits einen ähnlich hohen physiologischen Anstieg von Cortisol nachweisen um den Faktor 1,5 im Haar und Speichel (D'Anna- Hernandez et al., 2011) und um den Faktor 3 im Urin und Plasma (Jung et al., 2011). Nach bestem Wissen wird in dieser Dissertation zum ersten Mal ein Anstieg der HCNC in der Schwangerschaft beschrieben. Dabei war die HCNC um das Dreifache höher als die HCC in beiden Trimestern, welches die Bedeutung der Inaktivierung von Cortisol zu Cortison durch das Enzym 11B- HSD Typ 2 hervorhebt. Höhere Werte für die HCNC wurden auch in nichtschwangeren Probanden beschrieben (Ullmann et al., 2016).

In unserer Studie ergaben sich negative Assoziationen mit den PHQ- Subscores und der HCNC und dem Verhältnis von HCNC/HCC jedoch nie mit der HCC allein. Die gleichzeitige Bestimmung beider Steroide ist somit sinnvoll, gerade im Hinblick auf deren Verhältnis, welches ein indirekter Marker für die 11B- HSD Typ 2 Aktivität ist

(Ghaemmaghami et al., 2014, Wilson & Thayer, 2017). Der Zusammenhang zwischen steigenden Stressscores und sinkender HCNC sowie sinkendem Verhältnis von HCNC/HCC lässt vermuten, dass Schwangere mit steigenden Stresssymptomen eine geringere Cortisonkonzentration aufweisen, möglicherweise durch niedrigere Aktivität der 11 β -HSD Typ 2, und damit eine geringere Umwandlung von Cortisol zu Cortison.

Als einziger Einflussfaktor auf die Konzentration der Steroide im Haar konnte häufiges Haarewaschen identifiziert werden (signifikant niedrigere Konzentrationen beider Steroide). Dies unterstreicht die Bedeutung einer genauen Datensammlung bei Probenabnahme durch gezieltes Erfragen der Haarbehandlung, nicht nur über Manipulation durch Haarfärbung und -tönung, sondern auch über alltägliche Handhabung des Waschens. Das Verhältnis HCNC/HCC wurde weder signifikant durch häufiges Haarewaschen noch durch andere untersuchte potentielle Einflussfaktoren beeinflusst und stellt daher einen robusteren Messparameter auch für zukünftige Studien dar.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Adam EK, Hawkey LC, Kudielka BM, Cacioppo JT. Day-to-day dynamics of experience--cortisol associations in a population-based sample of older adults. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103(45):17058–63.

Bamberger CM. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocrine Reviews* 1996; 17(3):245–61.

Baum A, Grunberg N. Measurement of stress hormones. In: Cohen S, Kessler RC, Gordon LU (editors). *Measuring Stress: A Guide for Health and Social Scientists*. New York: Oxford University Press; 1998. 175-192.

Beitins IZ, Bayard F, Ances IG, Kowarski A, Migeon CJ. The metabolic clearance rate, blood production, interconversion and transplacental passage of cortisol and cortisone in pregnancy near term. *Pediatric research* 1973; 7(5):509–19.

Bévalot F, Gaillard Y, Lhermitte MA, Pépin G. Analysis of corticosteroids in hair by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 2000; 740(2):227–36.

Bolt RJ, van Weissenbruch MM, Lafeber HN, Delemarre-van de Waal HA. Glucocorticoids and lung development in the fetus and preterm infant. *Pediatric pulmonology* 2001; 32(1):76–91.

Bolten MI, Wurmser H, Buske-Kirschbaum A, Papoušek M, Pirke K-M, Hellhammer D. Cortisol levels in pregnancy as a psychobiological predictor for birth weight. *Archives of Women's Mental Health* 2011; 14(1):33–41.

Bracken BA, Barona A. State of the art procedures for translating, validating and using psychoeducational tests in cross-cultural assessment. *School Psychology International* 1991; 12(1-2):119–32.

Braig S, Grabher F, Ntomchukwu C, Reister F, Stalder T, Kirschbaum C, Genuneit J, Rothenbacher D. Determinants of maternal hair cortisol concentrations at delivery reflecting the last trimester of pregnancy. *Psychoneuroendocrinology* 2015a; 52:289–96.

Braig S, Grabher F, Ntomchukwu C, Reister F, Stalder T, Kirschbaum C, Rothenbacher D, Genuneit J. The association of hair cortisol with self-reported chronic psychosocial stress and symptoms of anxiety and depression in women shortly after delivery. *Paediatric and Perinatal Epidemiology* 2015b; 30(2):97–104.

Buckingham JC. Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *British Journal of Pharmacology* 2006; 147(S1):S258-68.

Campbell AL, Murphy BE. The maternal-fetal cortisol gradient during pregnancy and at delivery. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1977; 45(3):435–40.

Chen Z, Li J, Zhang J, Xing X, Gao W, Lu Z, Deng H. Simultaneous determination of hair cortisol, cortisone and DHEAS with liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in negative mode. *Journal of Chromatography B* 2013; 929:187–94.

Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Schmid W, Aguzzi A, Schütz G. Molecular genetic analysis of glucocorticoid signaling during mouse development. *Steroids* 1995; 60(1):93–6.

D'Anna- Hernandez KL, Ross RG, Natvig CL, Laudenslager ML. Hair cortisol levels as a retrospective marker of hypothalamic-pituitary axis activity throughout pregnancy: comparison to salivary cortisol. *Physiology & Behavior* 2011; 104(2):348–53.

- Davenport MD, Tiefenbacher S, Lutz CK, Novak MA, Meyer JS. Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques. *General and Comparative Endocrinology* 2006; 147(3):255–61.
- Davis EP, Sandman CA. The timing of prenatal exposure to maternal cortisol and psychosocial stress is associated with human infant cognitive development. *Child Development* 2010; 81(1):131–48.
- de Brouwer S, de Jong EMGJ, Donders ART, Eijbouts A, Evers AWM, Joosten I, Kraaijmaat FW, Radstake TRDJ, Schalkwijk J, Stormink C, van de Kerkhof PCM, van Middendorp H, van Riel PLCM. Immune responses to stress in rheumatoid arthritis and psoriasis. *Rheumatology (Oxford, England)* 2014; 53(10):1844–8.
- Dettenborn L, Tietze A, Bruckner F, Kirschbaum C. Higher cortisol content in hair among long-term unemployed individuals compared to controls. *Psychoneuroendocrinology* 2010; 35(9):1404–9.
- Dettenborn L, Tietze A, Kirschbaum C, Stalder T. The assessment of cortisol in human hair: associations with sociodemographic variables and potential confounders. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 2012; 15(6):578–88.
- Diez-Quevedo C, Rangil T, Sanchez-Planell L, Kroenke K, Spitzer RL. Validation and utility of the patient health questionnaire in diagnosing mental disorders in 1003 general hospital Spanish inpatients. *Psychosomatic Medicine* 2001; 63(4):679–86.
- Djernes JK. Prevalence and predictors of depression in populations of elderly: a review. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 2006; 113(5):372–87.
- Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Thomson S, Oh PI, van Uum S, Koren G, Lanctôt KL. Relationship between hair cortisol concentrations and depressive symptoms in patients with coronary artery disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 2010; 6:393–400.
- Feller S, Vigl M, Bergmann MM, Boeing H, Kirschbaum C, Stalder T. Predictors of hair cortisol concentrations in older adults. *Psychoneuroendocrinology* 2014; 39:132–40.
- Ferrari P. The role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human hypertension. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010; 1802(12):1178–87.
- Fowden AL, Forhead AJ. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reproduction (Cambridge, England)* 2004; 127(5):515–26.
- Franke GH, Jagla M, Salewski C, Jäger S. Psychologisch-diagnostische Verfahren zur Erfassung von Stress und Krankheitsbewältigung im deutschsprachigen Raum. *Zeitschrift für Medizinische Psychologie* 2007; 16(1- 2):41–55.
- Galbo H. Endocrinology and metabolism in exercise. *International Journal of Sports Medicine* 1981; 2(4):203–11.
- Gatti R, Palo EF de. An update: salivary hormones and physical exercise. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* 2011; 21(2):157–69.
- Gaudl A, Kratzsch J, Bae YJ, Kiess W, Thiery J, Ceglarek U. Liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry for quantitative steroid hormone analysis in plasma, urine, saliva and hair. *Journal of Chromatography A* 2016; 1464:64–71.

- Gerber M, Kalak N, Elliot C, Holsboer-Trachsler E, Puhse U, Brand S. Both hair cortisol levels and perceived stress predict increased symptoms of depression: an exploratory study in young adults. *Neuropsychobiology* 2013; 68(2):100–9.
- Ghaemmaghami P, Dainese SM, La Marca R, Zimmermann R, Ehlert U. The association between the acute psychobiological stress response in second trimester pregnant women, amniotic fluid glucocorticoids, and neonatal birth outcome. *Developmental Psychobiology* 2014; 56(4):734–47.
- Gibson EL, Checkley S, Papadopoulos A, Poon L, Daley S, Wardle J. Increased Salivary Cortisol Reliably Induced by a Protein-Rich Midday Meal. *Psychosomatic Medicine* 1999; 61(2):214–24.
- Gilstrap LC. Effect of corticosteroids for fetal maturation on perinatal outcomes. *JAMA* 1995; 273(5):413–8.
- Glover V, Bergman K, Sarkar P, O'Connor TG. Association between maternal and amniotic fluid cortisol is moderated by maternal anxiety. *Psychoneuroendocrinology* 2009; 34(3):430–5.
- Golden SH, Wand GS, Malhotra S, Kamel I, Horton K. Reliability of hypothalamic-pituitary-adrenal axis assessment methods for use in population-based studies. *European Journal of Epidemiology* 2011; 26(7):511–25.
- Golenhofen K. *Physiologie: Lehrbuch, Kompendium, Fragen und Antworten*. 2. Auflage. München [u.a.]: Urban & Schwarzenberg; 1997.
- Gräfe K, Zipfel S, Herzog W, Löwe B. Screening psychischer Störungen mit dem "Gesundheitsfragebogen für Patienten (PHQ-D)". *Diagnostica* 2004; 50(4):171–81.
- Grassi-Oliveira R, Pezzi JC, Daruy-Filho L, Viola TW, Francke ID, Leite CE, Brietzke E. Hair cortisol and stressful life events retrospective assessment in crack cocaine users. *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse* 2012; 38(6):535–8.
- Grino M, Chrousos GP, Margioris AN. The corticotropin releasing hormone gene is expressed in human placenta. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1987; 148(3):1208–14.
- Groeneveld MG, Vermeer HJ, Linting M, Noppe G, van Rossum EFC, van IJendoorn, Marinus H. Children's hair cortisol as a biomarker of stress at school entry. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 2013; 16(6):711–5.
- Gröschl M. The physiological role of hormones in saliva. *BioEssays* 2009; 31(8):843–52.
- Gunnar M, Quevedo K. The neurobiology of stress and development. *Annual Review of Psychology* 2007; 58:145–73.
- Guo T, Gu J, Soldin OP, Singh RJ, Soldin SJ. Rapid measurement of estrogens and their metabolites in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry without derivatization. *Clinical Biochemistry* 2008; 41(9):736–41.
- Hellhammer J, Fries E, Schweisthal OW, Schlotz W, Stone AA, Hagemann D. Several daily measurements are necessary to reliably assess the cortisol rise after awakening: state- and trait components. *Psychoneuroendocrinology* 2007; 32(1):80–6.
- Hennebert O, Chalbot S, Alran S, Morfin R. Dehydroepiandrosterone 7 α -hydroxylation in human tissues: possible interference with type 1 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-mediated processes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2007; 104(3-5):326–33.

- Hoffman MC, Karban LV, Benitez P, Goodteacher A, Laudenslager ML. Chemical processing and shampooing impact cortisol measured in human hair. *Clinical and Investigative Medicine* 2014; 37(4):E252-7.
- Ito N, Ito T, Kromminga A, Bettermann A, Takigawa M, Kees F, Straub RH, Paus R. Human hair follicles display a functional equivalent of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and synthesize cortisol. *The FASEB Journal* 2005; 19(10):1332-4.
- Jones RL, Owen LJ, Adaway JE, Keevil BG. Simultaneous analysis of cortisol and cortisone in saliva using XLC-MS/MS for fully automated online solid phase extraction. *Journal of Chromatography B* 2012; 881-882:42-8.
- Jones SA, Brooks AN, Challis JR. Steroids modulate corticotropin-releasing hormone production in human fetal membranes and placenta. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1989; 68(4):825-30.
- Jung C, Ho JT, Torpy DJ, Rogers A, Doogue M, Lewis JG, Czajko RJ, Inder WJ. A longitudinal study of plasma and urinary cortisol in pregnancy and postpartum. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2011; 96(5):1533-40.
- Kalra S, Einarson A, Karaskov T, van Uum S, Koren G. The relationship between stress and hair cortisol in healthy pregnant women. *Clinical and Investigative Medicine* 2007; 30(2):103-7.
- Kammerer M, Taylor A, Glover V. The HPA axis and perinatal depression: a hypothesis. *Archives of Women's Mental Health* 2006; 9(4):187-96.
- Karlen J, Ludvigsson J, Frostell A, Theodorsson E, Faresjo T. Cortisol in hair measured in young adults - a biomarker of major life stressors? *BMC Clinical Pathology* 2011; 11:12.
- Keevil BG. Novel liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) methods for measuring steroids. *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism* 2013; 27(5):663-74.
- King SL, Hegadoren KM. Stress Hormones: How do they measure up? *Biological Research for Nursing* 2002; 4(2):92-103.
- Kirchhoff F, Briegel J, Vogeser M. Quantification of free serum cortisol based on equilibrium dialysis and isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* 2011; 44(10-11):894-9.
- Kirschbaum C, Hellhammer DH. Salivary cortisol in psychobiological research: An overview. *Neuropsychobiology* 1989; 22(3):150-69.
- Kirschbaum C, Tietze A, Skoluda N, Dettenborn L. Hair as a retrospective calendar of cortisol production-Increased cortisol incorporation into hair in the third trimester of pregnancy. *Psychoneuroendocrinology* 2009; 34(1):32-7.
- Kramer MS, Lydon J, Séguin L, Goulet L, Kahn SR, McNamara H, Genest J, Dassa C, Chen MF, Sharma S, Meaney MJ, Thomson S, van Uum S, Koren G, Dahhou M, Lamoureux J, Platt RW. Stress pathways to spontaneous preterm birth: the role of stressors, psychological distress, and stress hormones. *American Journal of Epidemiology* 2009; 169(11):1319-26.
- Kroenke K, Spitzer RL, Williams JBW. The PHQ-9: Validity of a brief depression severity measure. *Journal of General Internal Medicine* 2001; 16(9):606-13.

- Kroenke K, Spitzer RL, Williams JBW, Lowe B. The Patient Health Questionnaire somatic, anxiety, and depressive symptom scales: a systematic review. *General Hospital Psychiatry* 2010; 32(4):345–59.
- Kudielka BM, Hellhammer DH, Wüst S. Why do we respond so differently? Reviewing determinants of human salivary cortisol responses to challenge. *Psychoneuroendocrinology* 2009; 34(1):2–18.
- Kushnir MM, Rockwood AL, Roberts WL, Yue B, Bergquist J, Meikle AW. Liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of steroids in clinical laboratories. *Clinical Biochemistry* 2011; 44(1):77–88.
- Lampert T, Kroll LE, Muters S, Stolzenberg H. Measurement of the socioeconomic status within the German Health Update 2009 (GEDA). *Bundesgesundheitsblatt- Gesundheitsforschung- Gesundheitsschutz* 2013; 56(1):131–43.
- Lazarus RS, Folkman S. *Stress, appraisal, and coping*. New York: Springer Pub. Co; 1984.
- Levine S, Ursin H. What is stress? In: Brown MR, Koob GF, Rivier C (editors). *Stress: Neurobiology and Neuroendocrinology*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1991. p. 3–21.
- Li J, Xie Q, Gao W, Xu Y, Wang S, Deng H, Lu Z. Time course of cortisol loss in hair segments under immersion in hot water. *Clinica Chimica Acta* 2012; 413(3-4):434–40.
- Lovallo WR, Al'absi M, Blick K, Whitsett TL, Wilson MF. Stress-like adrenocorticotropin responses to caffeine in young healthy men. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1996; 55(3):365–9.
- Lovallo WR, Whitsett TL, Al'absi M, Sung BH, Vincent AS, Wilson MF. Caffeine stimulation of cortisol secretion across the waking hours in relation to caffeine intake levels. *Psychosomatic Medicine* 2005; 67(5):734–9.
- Löwe B, Grafe K, Zipfel S, Witte S, Loerch B, Herzog W. Diagnosing ICD-10 depressive episodes: superior criterion validity of the Patient Health Questionnaire. *Psychotherapy and Psychosomatics* 2004a; 73(6):386–90.
- Löwe B, Gräfe K, Zipfel S, Spitzer RL, Herrmann-Lingen C, Witte S, Herzog W. Detecting panic disorder in medical and psychosomatic outpatients: Comparative validation of the hospital anxiety and depression Scale, the Patient Health Questionnaire, a screening question, and physicians' diagnosis. *Journal of Psychosomatic Research* 2003; 55(6):515–9.
- Löwe B, Spitzer RL, Gräfe K, Kroenke K, Quenter A, Zipfel S, Buchholz C, Witte S, Herzog W. Comparative validity of three screening questionnaires for DSM-IV depressive disorders and physicians' diagnoses. *Journal of Affective Disorders* 2004b; 78(2):131–40.
- Löwe B, Spitzer RL, Zipfel S, Herzog W. PHQ- D. Gesundheitsfragebogen für Patienten: Manual. Komplettversion und Kurzform. 2. Auflage. Universität Heidelberg; 2002, [online]: https://www.klinikum.uni-heidelberg.de/fileadmin/Psychosomatische_Klinik/download/PHQ_Manual1.pdf [14.05.2018].
- Luo H, Hu X, Liu X, Ma X, Guo W, Qiu C, Wang Y, Wang Q, Zhang X, Zhang W, Hannum G, Zhang K, Liu X, Li T. Hair cortisol level as a biomarker for altered hypothalamic-pituitary-adrenal activity in female adolescents with posttraumatic stress disorder after the 2008 Wenchuan earthquake. *Biological Psychiatry* 2012; 72(1):65–9.

- Magiakou MA, Mastorakos G, Webster E, Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1997; 816(1):42–56.
- Manenschijn L, Koper JW, Lamberts SWJ, van Rossum EFC. Evaluation of a method to measure long term cortisol levels. *Steroids* 2011a; 76(10-11):1032–6.
- Manenschijn L, Koper JW, van den Akker ELT, de Heide LJM, Geerdink EAM, de Jong FH, Feelders RA, van Rossum EFC. A novel tool in the diagnosis and follow-up of (cyclic) Cushing's syndrome: measurement of long-term cortisol in scalp hair. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2012; 97(10):E1836- E1843.
- Manenschijn L, Schaap L, van Schoor NM, van der Pas S, Peeters GMEE, Lips P, Koper JW, van Rossum EFC. High long-term cortisol levels, measured in scalp hair, are associated with a history of cardiovascular disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2013; 98(5):2078–83.
- Manenschijn L, van Kruysbergen RGPM, de Jong FH, Koper JW, van Rossum EFC. Shift work at young age is associated with elevated long-term cortisol levels and body mass index. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2011b; 96(11):E1862- E1865.
- Mendel CM. The free hormone hypothesis: A physiologically based mathematical model. *Endocrine Reviews* 1989; 10(3):232–74.
- Nicholson RC, King BR, Smith R. Complex regulatory interactions control CRH gene expression. *Frontiers in Bioscience* 2004; 9:32–9.
- Noppe G, van Rossum EFC, Koper JW, Manenschijn L, Bruining GJ, de Rijke YB, van den Akker ELT. Validation and reference ranges of hair cortisol measurement in healthy children. *Hormone Research in Paediatrics* 2014; 82(2):97–102.
- O'Brien KM, Tronick EZ, Moore CL. Relationship between hair cortisol and perceived chronic stress in a diverse sample. *Stress & Health* 2012; 29(4):337–44.
- O'Donnell KJ, Bugge Jensen A, Freeman L, Khalife N, O'Connor TG, Glover V. Maternal prenatal anxiety and downregulation of placental 11 β -HSD2. *Psychoneuroendocrinology* 2012; 37(6):818–26.
- Pereg D, Chan J, Russell E, Berlin T, Mosseri M, Seabrook JA, Koren G, van Uum S. Cortisol and testosterone in hair as biological markers of systolic heart failure. *Psychoneuroendocrinology* 2013; 38(12):2875–82.
- Petraglia F, Tabanelli S, Galassi MC, Garuti GC, Mancini AC, Genazzani AR, Gorpide E. Human decidua and in vitro decidualized endometrial stromal cells at term contain immunoreactive corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF messenger ribonucleic acid. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1992; 74(6):1427–31.
- Poulain T, Baber R, Vogel M, Pietzner D, Kirsten T, Jurkutat A, Hiemisch A, Hilbert A, Kratzsch J, Thiery J, Fuchs M, Hirsch C, Rauscher FG, Loeffler M, Körner A, Nüchter M, Kiess W. The LIFE Child study: a population-based perinatal and pediatric cohort in Germany. *European Journal of Epidemiology* 2017; 32(2):145–58.
- Quante M, Hesse M, Döhnert M, Fuchs M, Hirsch C, Sergeev E, Casprzig N, Geserick M, Naumann S, Koch C, Sabin MA, Hiemisch A, Körner A, Kiess W, LIFE Child Study Investigators. The LIFE child study: a life course approach to disease and health. *BMC Public Health* 2012; 12:1021.

- Quinete N, Bertram J, Reska M, Lang J, Kraus T. Highly selective and automated online SPE LC-MS3 method for determination of cortisol and cortisone in human hair as biomarker for stress related diseases. *Talanta* 2015; 134:310–6.
- Raul J-S, Cirimele V, Ludes B, Kintz P. Detection of physiological concentrations of cortisol and cortisone in human hair. *Clinical Biochemistry* 2004; 37(12):1105–11.
- Riley SC, Challis JRG. 2. Corticotrophin-releasing hormone production by the placenta and fetal membranes. *Placenta* 1991; 12(2):105–19.
- Rippe RCA, Noppe G, Windhorst DA, Tiemeier H, van Rossum EFC, Jaddoe VWV, Verhulst FC, Bakermans-Kranenburg MJ, van IJzendoorn MH, van den Akker ELT. Splitting hair for cortisol? Associations of socio-economic status, ethnicity, hair color, gender and other child characteristics with hair cortisol and cortisone. *Psychoneuroendocrinology* 2016; 66:56–64.
- Rohleder N, Kirschbaum C. The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in habitual smokers. *International Journal of Psychophysiology* 2006; 59(3):236–43.
- Rothenberger SE, Moehler E, Reck C, Resch F. Prenatal stress: Course and interrelation of emotional and physiological stress measures. *Psychopathology* 2011a; 44(1):60–7.
- Rothenberger SE, Resch F, Doszpod N, Moehler E. Prenatal stress and infant affective reactivity at five months of age. *Early Human Development* 2011b; 87(2):129–36.
- Saleem M, Herrmann N, Swardfager W, Oh PI, Shammi P, Koren G, van Uum S, Kiss A, Lanctôt KL. Higher cortisol predicts less improvement in verbal memory performance after cardiac rehabilitation in patients with coronary artery disease. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology* 2013.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews* 2000; 21(1):55–89.
- Sauvé B, Koren G, Walsh G, Tokmakejian S, Van Uum SHM. Measurement of cortisol in human hair as a biomarker of systemic exposure. *Clinical and Investigative Medicine* 2007; 30(5):E183–E191.
- Schartl M, Gessler M, von Eckardstein A. *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*. London: Elsevier Health Sciences Germany; 2013.
- Schreier HMC, Enlow MB, Ritz T, Coull BA, Gennings C, Wright RO, Wright RJ. Lifetime exposure to traumatic and other stressful life events and hair cortisol in a multi-racial/ethnic sample of pregnant women. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 2016; 19(1):45–52.
- Schwab M. Intrauterine Programmierung von Störungen der Hirnfunktion im späteren Leben. *Gynäkologisch-geburtshilfliche Rundschau* 2009; 49(1):13–28.
- Seckl JR. Glucocorticoids, feto-placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and the early life origins of adult disease. *Steroids* 1997; 62(1):89–94.
- Serwinski B, Salavecz G, Kirschbaum C, Steptoe A. Associations between hair cortisol concentration, income, income dynamics and status incongruity in healthy middle-aged women. *Psychoneuroendocrinology* 2016; 67:182–8.
- Seth S, Lewis AJ, Saffery R, Lappas M, Galbally M. Maternal prenatal mental health and placental 11 β -HSD2 gene expression: Initial findings from the Mercy Pregnancy and Emotional Wellbeing Study. *International Journal of Molecular Sciences* 2015; 16(11):27482–96.

- Short SJ, Stalder T, Marceau K, Entringer S, Moog NK, Shirtcliff EA, Wadhwa PD, Buss C. Correspondence between hair cortisol concentrations and 30-day integrated daily salivary and weekly urinary cortisol measures. *Psychoneuroendocrinology* 2016; 71:12–8.
- Skoluda N, Dettenborn L, Stalder T, Kirschbaum C. Elevated hair cortisol concentrations in endurance athletes. *Psychoneuroendocrinology* 2012; 37(5):611–7.
- Slominski A, Wortsman J, Tuckey RC, Paus R. Differential expression of HPA axis homolog in the skin. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2007; 265-266:143–9.
- Smith ID, Shearman RP. Fetal plasma steroids in relation to parturition. I. The effect of gestational age upon umbilical plasma corticosteroid levels following vaginal delivery. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1974; 81(1):11–5.
- Smith RE, MaGuire JA, Stein-Oakley AN, Sasano H, Takahashi K, Fukushima K, Krozowski ZS. Localization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II in human epithelial tissues. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1996; 81(9):3244–8.
- Speirs H, Seckl JR, Brown RW. Ontogeny of glucocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type-1 gene expression identifies potential critical periods of glucocorticoid susceptibility during development. *Journal of Endocrinology* 2004; 181(1):105–16.
- Spitzer RL, Kroenke K, Williams, J.B.W. and the Patient Health Questionnaire Primary Care Study Group. Validation and utility of a self-report version of PRIME-MD: The PHQ Primary Care Study. *JAMA* 1999; 282(18):1737–44.
- Stalder T, Kirschbaum C. Analysis of cortisol in hair- State of the art and future directions. *Brain, Behavior, and Immunity* 2012; 26(7):1019–29.
- Stalder T, Kirschbaum C, Alexander N, Bornstein SR, Gao W, Miller R, Stark S, Bosch JA, Fischer JE. Cortisol in hair and the metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2013; 98(6):2573–80.
- Stalder T, Kirschbaum C, Heinze K, Steudte S, Foley P, Tietze A, Dettenborn L. Use of hair cortisol analysis to detect hypercortisolism during active drinking phases in alcohol-dependent individuals. *Biological Psychology* 2010; 85(3):357–60.
- Stalder T, Steudte S, Alexander N, Miller R, Gao W, Dettenborn L, Kirschbaum C. Cortisol in hair, body mass index and stress-related measures. *Biological Psychology* 2012a; 90(3):218–23.
- Stalder T, Steudte S, Miller R, Skoluda N, Dettenborn L, Kirschbaum C. Intraindividual stability of hair cortisol concentrations. *Psychoneuroendocrinology* 2012b; 37(5):602–10.
- Staufenbiel SM, Penninx BWJH, Spijker AT, Elzinga BM, van Rossum EFC. Hair cortisol, stress exposure, and mental health in humans: A systematic review. *Psychoneuroendocrinology* 2013; 38(8):1220–35.
- Steudte S, Stalder T, Dettenborn L, Klumbies E, Foley P, Beesdo-Baum K, Kirschbaum C. Decreased hair cortisol concentrations in generalised anxiety disorder. *Psychiatry Research* 2011; 186(2-3):310–4.
- Straub RH, Dhabhar FS, Bijlsma JWJ, Cutolo M. How psychological stress via hormones and nerve fibers may exacerbate rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2005; 52(1):16–26.
- Sun K, Yang K, Challis JR. Differential expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in human placenta and fetal membranes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1997; 82(1):300–5.

- Szabo S, Tache Y, Somogyi A. The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: A retrospective 75 years after his landmark brief "letter" to the editor# of Nature. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 2012; 15(5):472–8.
- Tegethoff M, Pryce C, Meinlschmidt G. Effects of intrauterine exposure to synthetic glucocorticoids on fetal, newborn, and infant hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in humans: A systematic review. *Endocrine Reviews* 2009; 30(7):753–89.
- Thomson S, Koren G, Fraser L-A, Rieder M, Friedman TC, Van Uum SHM. Hair analysis provides a historical record of cortisol levels in Cushing's syndrome. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 2010; 118(2):133–8.
- Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research* 2002; 53(4):865–71.
- Ullmann E, Barthel A, Petrowski K, Stalder T, Kirschbaum C, Bornstein SR. Pilot study of adrenal steroid hormones in hair as an indicator of chronic mental and physical stress. *Scientific Reports* 2016; 6:25842.
- Vaghri Z, Guhn M, Weinberg J, Grunau RE, Yu W, Hertzman C. Hair cortisol reflects socio-economic factors and hair zinc in preschoolers. *Psychoneuroendocrinology* 2013; 38(3):331–40.
- Van den Bergh BRH, van Calster B, Smits T, van Huffel S, Lagae L. Antenatal maternal anxiety is related to HPA-axis dysregulation and self-reported depressive symptoms in adolescence: a prospective study on the fetal origins of depressed mood. *Neuropsychopharmacology* 2008; 33:536–45.
- van Holland BJ, Frings-Dresen MHW, Sluiter JK. Measuring short-term and long-term physiological stress effects by cortisol reactivity in saliva and hair. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 2012; 85(8):849–52.
- Van Uum SHM, Sauvé B, Fraser LA, Morley-Forster P, Paul TL, Koren G. Elevated content of cortisol in hair of patients with severe chronic pain: a novel biomarker for stress. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 2008; 11(6):483–8.
- Vanaelst B, Huybrechts I, Bammann K, Michels N, de Vriendt T, Vyncke K, Sioen I, Iacoviello L, Günther K, Molnar D, Lissner L, Rivet N, Raul J-S, Henauw S de. Intercorrelations between serum, salivary, and hair cortisol and child-reported estimates of stress in elementary school girls. *Psychophysiology* 2012; 49(8):1072–81.
- Vogelzangs N, Beekman ATF, Milaneschi Y, Bandinelli S, Ferrucci L, Penninx BWJH. Urinary cortisol and six-year risk of all-cause and cardiovascular mortality. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2010; 95(11):4959–64.
- Vreeburg SA, Zitman FG, van Pelt J, Derijk RH, Verhagen JCM, van Dyck R, Hoogendijk WJG, Smit JH, Penninx BWJH. Salivary cortisol levels in persons with and without different anxiety disorders. *Psychosomatic Medicine* 2010; 72(4):340–7.
- Ward RM. Pharmacologic enhancement of fetal lung maturation. *Clinics in Perinatology* 1994; 21(3):523–42.
- Webb E, Thomson S, Nelson A, White C, Koren G, Rieder M, van Uum S. Assessing individual systemic stress through cortisol analysis of archaeological hair. *Journal of Archaeological Science* 2010; 37(4):807–12.
- Weinstock M. The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. *Brain, Behavior, and Immunity* 2005; 19(4):296–308.

- Wennig R. Potential problems with the interpretation of hair analysis results. *Forensic Science International* 2000; 107(1–3):5–12.
- Williams E, Magid K, Steptoe A. The impact of time of waking and concurrent subjective stress on the cortisol response to awakening. *Psychoneuroendocrinology* 2005; 30(2):139–48.
- Wilson M, Thayer Z. Maternal salivary cortisone to cortisol ratio in late pregnancy: An improved method for predicting offspring birth weight. *Psychoneuroendocrinology* 2017; 78:10–3.
- Wolfram M, Bellingrath S, Feuerhahn N, Kudielka BM. Cortisol responses to naturalistic and laboratory stress in student teachers: comparison with a non-stress control day. *Stress & Health* 2013; 29(2):143–9.
- Wood P. Salivary steroid assays - research or routine? *Annals of Clinical Biochemistry* 2009; 46(3):183–96.
- Wosu AC, Gelaye B, Valdimarsdóttir U, Kirschbaum C, Stalder T, Shields AE, Williams MA. Hair cortisol in relation to sociodemographic and lifestyle characteristics in a multiethnic US sample. *Annals of Epidemiology* 2015; 25(2):90–5.
- Xie Q, Gao W, Li J, Qiao T, Jin J, Deng H, Lu Z. Correlation of cortisol in 1-cm hair segment with salivary cortisol in human: hair cortisol as an endogenous biomarker. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2011; 49(12):2013–9.
- Yehuda R. Advances in understanding neuroendocrine alterations in PTSD and their therapeutic implications. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006; 1071(1):137–66.

II. ANLAGEN

II. A Tabellen

Tabelle 2

Gegenüberstellung Cortisol in den verschiedenen Medien

Merkmale/Medium	Haar	Blut/ Speichel/ Urin
Abbildungszeitraum der Cortisolexposition	<ul style="list-style-type: none">- Monate bis Jahre- Anhaltende Exposition abbildbar	<ul style="list-style-type: none">- Minuten- Stunden- Momentaufnahme der Konzentration
Abnahme/ Invasivität	<ul style="list-style-type: none">- Nicht- invasiv- Schmerzfrei	<ul style="list-style-type: none">- Invasiv- Mit Schmerzen und möglichem Anstieg der Cortisolkonzentration verbunden
Einflussfaktoren	<ul style="list-style-type: none">- Einige/unklar- Keinen Einfluss durch akute Ereignisse- Intraindividuelle Stabilität <p>Aber:</p> <ul style="list-style-type: none">- Einflüsse durch Haarbehandlung (Waschen, Färben)	<ul style="list-style-type: none">- Circadiane Rhythmik- Tageszeitpunkt- Nahrungsaufnahme- Sport
Anzahl der Messungen	<ul style="list-style-type: none">- Seltener nötig, da Haare über Monate bis Jahre wachsen- Haarwachstum: 1cm/Monat	<ul style="list-style-type: none">- Mehrfachmessungen benötigt, um längere Exposition zu untersuchen
Lagerung	<ul style="list-style-type: none">- Trocken- Bei Raumtemperatur- Kostengünstig	<ul style="list-style-type: none">- Gekühlt- Kostenintensiv

Tabelle 3

Zusammenfassung der Einflussfaktoren auf Haarcortisol (HCC)

	Einfluss	Kein Einfluss
Haarcharakteristik		
<i>Naturhaarfarbe</i>	Dunklere Haare zeigen höhere HCC (Rippe et al., 2016).	Die Farbe des Naturhaars zeigt keinen Einfluss auf die HCC (Raul et al., 2004, Sauvé et al., 2007, Kirschbaum et al., 2009, Dowlati et al., 2010, Manenschijn et al., 2011a, Dettenborn et al., 2012, Skoluda et al., 2012, Groeneveld et al., 2013).
<i>Waschfrequenz der Haare pro Woche</i>	Nach Einwirken von Shampoo im heißen Wasser zeigen sich niedrigere HCC (Li et al., 2012, Hoffman et al., 2014), vor allem im distalen Segment (9cm von der Kopfhaut entfernt) (Dettenborn et al., 2012). Personen, die angaben, sich häufiger die Haare zu waschen, haben signifikant geringere HCC (Braig et al., 2015a).	Häufigeres Waschen zeigt keinen Einfluss auf die HCC (Kirschbaum et al., 2009, Manenschijn et al., 2011a, Stalder et al., 2012a, Groeneveld et al., 2013, Noppe et al., 2014).
<i>Haarsegment</i>	Distale Haarsegmente zeigen niedrigere HCC (Kirschbaum et al., 2009, Steudte et al., 2011, Xie et al., 2011, Dettenborn et al., 2012, Luo et al., 2012, Skoluda et al., 2012), wahrscheinlich durch den sogenannten Auswascheffekt (siehe Haarwaschfrequenz).	Das Haarsegment hat keinen Einfluss auf die HCC (Davenport et al., 2006, Manenschijn et al., 2011a, Noppe et al., 2014).
<i>Haarfärbung, Haarbehandlung</i>	Gefärbte oder getönte Haare zeigen niedrigere HCC (Sauvé et al., 2007, Manenschijn et al., 2011a, Manenschijn et al., 2012, Manenschijn et al., 2013, Braig et al., 2015a, Wosu et al., 2015, Gaudl et al., 2016, Serwinski et al., 2016).	Haarbehandlung zeigt keinen Einfluss auf die HCC (Dowlati et al., 2010, Stalder et al., 2012a, Skoluda et al., 2012).
<i>UV- Licht</i>	Nach längerer UV- Bestrahlung zeigen sich niedrigere HCC (Li et al., 2012, Gaudl et al., 2016).	
Soziodemographie		
<i>Biologisches Geschlecht</i>	Jungen (Rippe et al., 2016) und Männer (Dettenborn et al., 2012, O'Brien et al., 2012, Skoluda et al., 2012, Manenschijn et al., 2013, Feller et al., 2014) zeigen höhere HCC im Vergleich zu weiblichen Probandinnen.	Das Geschlecht hat keinen Einfluss auf die HCC (Raul et al., 2004, Karlen et al., 2011, Manenschijn et al., 2011a, Manenschijn et al., 2012, Chen et al., 2013, Groeneveld et al., 2013, Stalder et al., 2013, Vaghri et al., 2013, Noppe et al., 2014).
<i>Alter</i>	Die HCC steigt bei Kindern (4- 10 Jahre) (Noppe et al., 2014) und Erwachsenen (16- 82 Jahre) (Stalder et al., 2013, Feller et al., 2014) mit dem Alter. Grundsätzlich zeigen Kinder höhere HCC	Das Alter zeigt keinen Einfluss auf die HCC (Raul et al., 2004, Manenschijn et al., 2011a, Manenschijn et al., 2012, O'Brien et al., 2012, Stalder et al., 2012a,

	als Erwachsene (Dettenborn et al., 2012), dabei haben Kinder im Alter zwischen 8 und 14 Jahren ähnliche Werte wie Erwachsene (Noppe et al., 2014).	Vaghri et al., 2013, Chen et al., 2013, Manenschijn et al., 2013).
<i>Bildung</i>	Probanden mit niedrigerer Schulbildung zeigen höhere Cortisolkonzentrationen (Braig et al., 2015a, Rippe et al., 2016).	Schulbildung zeigt keinen Einfluss auf die HCC (Chen et al., 2013, Groeneveld et al., 2013).
<i>Einkommen</i>	Probanden mit einem niedrigeren Einkommen zeigen höhere HCC Werte (Rippe et al., 2016, Serwinski et al., 2016).	
<i>Arbeitsumfeld</i>	Arbeitslose (Dettenborn et al., 2010) und Schichtarbeiter (Manenschijn et al., 2011b) zeigen höhere HCC im Vergleich zur Kontrollgruppe.	
<i>Ethnizität</i>	People of Colour zeigen höhere HCC im Vergleich zu Probanden kaukasischer Herkunft (Wosu et al., 2015, Rippe et al., 2016).	Ethnische Herkunft hat keinen Einfluss auf die HCC (O'Brien et al., 2012, Vaghri et al., 2013, Braig et al., 2015a).
Aktivität		
<i>Adipositas, BMI</i>	Es konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der HCC und dem BMI (Manenschijn et al., 2011b, Stalder et al., 2012a, Saleem et al., 2013, Braig et al., 2015a, Rippe et al., 2016), dem Hüftumfang (Manenschijn et al., 2011a), dem Taille- Hüft-Verhältnis (Manenschijn et al., 2011a, O'Brien et al., 2012) und dem Gewicht (Stalder et al., 2012a) gefunden werden.	In anderen Studien zeigt sich kein Zusammenhang zwischen der HCC und dem BMI (Manenschijn et al., 2011a, Skoluda et al., 2012, Manenschijn et al., 2013, Noppe et al., 2014) und dem Hüftumfang (Manenschijn et al., 2011a, Manenschijn et al., 2013).
<i>Alkoholkonsum</i>	Alkoholiker zeigen im Vergleich zu Abstinenzlern und einer Kontrollgruppe höhere HCC (Stalder et al., 2010). Die HCC korreliert außerdem mit der Gamma- Glutamyltransferase (Leberenzym, das bei verstärktem Alkoholkonsum steigt) (Stalder et al., 2013) und ist höher je mehr Alkohol konsumiert wurde (Manenschijn et al., 2013, Feller et al., 2014).	Zwischen selbstangegebenem Alkoholkonsum und HCC konnte kein Zusammenhang gefunden werden (Stalder et al., 2013).
<i>Rauchen</i>	Die HCC ist höher bei Rauchern (Braig et al., 2015a, Wosu et al., 2015).	Rauchen zeigt keinen Einfluss auf die HCC (Dettenborn et al., 2012, Skoluda et al., 2012, Stalder et al., 2012a, Manenschijn et al., 2013, Stalder et al., 2013).
<i>Sport</i>	Sportler zeigen höhere HCC (Skoluda et al., 2012, Gerber et al., 2013).	Die physische Aktivität hat keinen Einfluss auf die HCC (Stalder et al., 2013).

Tabelle 4

Beschreibung und Merkmale der einzelnen Module des Patient Health Questionnaires (PHQ)

Modul	Kurz- bezeichnung	Abgefragter Zeitraum	Fragen- anzahl	Antwortkategorien	Skala
Depression	PHQ-9	Letzten 2 Wochen	9	0 = „Überhaupt nicht“ 1 = „An einzelnen Tagen“ 2 = „An mehr als der Hälfte der Tage“ 3 = „Beinahe jeden Tag“	0- 27 Punkte < 5 Punkte = Fehlen einer depressiven Störung 5- 10 Punkte = Leichte/ unterschwellige depressive Störung > 10 Punkte = Major Depression
Somatisierung	PHQ-15	Letzten 4 Wochen	13 +2 Fragen (aus PHQ-9)	0 = „Nicht beeinträchtigt“ 1 = „Wenig beeinträchtigt“ 2 = „Stark beeinträchtigt“ + 0 = „Überhaupt nicht“ 1 = „An einzelnen Tagen“ 2 = „An mehr als der Hälfte der Tage“ 3 = „Beinahe jeden Tag“	0- 30 Punkte
Stress	stress	Letzten 4 Wochen	10	0 = „Nicht beeinträchtigt“ 1 = „Wenig beeinträchtigt“ 2 = „Stark beeinträchtigt“	0- 20 Punkte

II. B Ergänzungsunterlagen zur wissenschaftlichen Publikation (Supplementary Data)

Table S1: Bivariate associations between sociodemographic and pregnancy- related factors and hair cortisol (HCC) and hair cortisone concentrations (HCNC). Shown are potential confounders of HCC and HCNC and the respective linear regression coefficient (b), 95 % confidence interval (95% CI) and reference category in regression model (ref.). Steroid concentrations were ln- transformed. *p≤ 0.05. Bold face indicates significant associations.

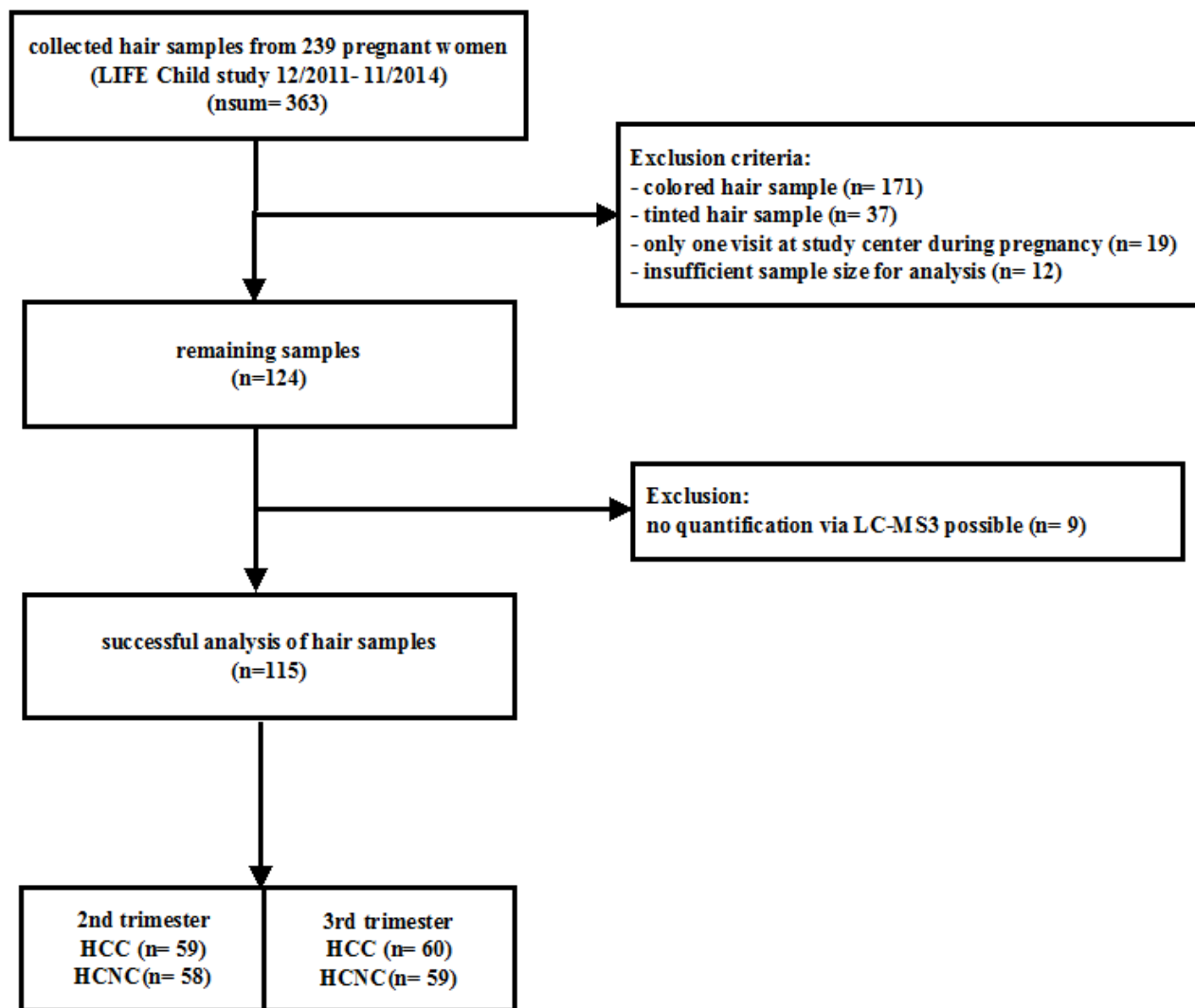
	n	2 nd trimester		3 rd trimester	
		HCC b (95 % CI)	HCNC b (95 % CI)	HCC b (95 % CI)	HCNC b (95 % CI)
Sociodemographic factors					
<i>Maternal nationality</i>					
German	55/60	ref.	ref.	ref.	ref.
Other	5/60	-0.20 (-1.10; 0.69)	-0.94* (-1.57; -0.31)	-0.09 (-0.82; 0.65)	-0.16 (-1.02; 0.69)
<i>Maternal education (years)</i>					
10- 11	9/60	ref.	ref.	ref.	ref.
> 11	51/60	-0.34 (-0.99; 0.31)	0.11 (-0.37; 0.59)	-0.04 (-0.61; 0.53)	-0.14 (-0.73; 0.46)
<i>Socioeconomic status (SES) (Winkler Index)</i>					
Low SES	6/56	0.33 (-0.43; 1.08)	-0.02 (-0.61; 0.57)	0.40 (-0.30; 1.10)	0.22 (-0.68; 0.78)
Middle SES	23/56	0.35 (-0.12; 0.83)	0.04 (-0.33; 0.41)	0.27 (-0.16; 0.71)	0.13(-0.33; 0.58)
High SES	27/56	ref.	ref.	ref.	ref.
<i>Maternal age at delivery (years)</i>					
≤ 25	13/62	ref.	ref.	ref.	ref.
> 25 ≤ 30	23/62	0.60* (0.03; 1.17)	0.22 (-0.24; 0.69)	-0.13 (-0.70; 0.44)	0.17 (-0.42; 0.76)
> 30 ≤ 35	17/62	0.64* (0.01; 1.26)	-0.11 (-0.61; 0.39)	0.16 (-0.44; 0.76)	0.21 (-0.42; 0.84)
> 35 ≤ 40	9/62	0.78* (0.03; 1.52)	0.17 (-0.42; 0.76)	0.06 (-0.63; 0.76)	0.30 (-0.43; 1.02)

<i>Persons living in household (Excluding newborn)</i>					
2	32/55	-0.25 (-0.90; 0.40)	-0.05 (-0.55; 0.45)	0.11 (-0.49; 0.70)	0.15 (-0.47; 0.77)
3	15/55	-0.31 (-1.05; 0.43)	0.02 (-0.56; 0.60)	0.04 (-0.62; 0.70)	0.36 (-0.33; 1.04)
≥ 4	8/55	ref.	ref.	ref.	ref.
Pregnancy-related factors					
<i>Maternal BMI at first detection of Gravidity</i>					
Underweight	1/60	0.16 (-1.57; 1.88)	-1.58* (-2.81; -0.34)	-2.20* (-3.65; -0.76)	-2.06* (-3.73; -0.62)
Normal	49/60	ref.	ref.	ref.	ref.
Overweight	8/60	0.32 (-0.34; 0.97)	0.31 (-0.161; 0.776)	-0.41 (-0.96; 0.13)	-0.19 (-0.90; 0.28)
Obese	2/60	-0.89 (-2.12; 0.35)	-0.63 (-1.52; 0.25)	-1.20 (-2.64; 0.25)	-2.24 (-2.56; 0.55)
BMI Group 1 (underweight & normal)	50/60	ref.	ref.	ref.	ref.
BMI Group 2 (overweight & obese)	10/60	0.07 (-0.53; 0.67)	0.15 (-0.30; 0.61)	-0.45 (-1.01; 0.10)	-0.34 (-0.93; 0.25)
<i>Primipara</i>	33/60	-0.06 (-0.51; 0.39)	-0.05 (-0.40; 0.29)	0.07 (-0.34; 0.48)	-0.03 (-0.45; 0.40)
<i>Newborn`s gender</i>					
Male	34/62	0.10 (-0.35; 0.54)	0.05 (-0.29; 0.39)	0.08 (-0.33; 0.49)	-0.01 (-0.43; 0.42)
Female	28/62	ref.	ref.	ref.	ref.
<i>Smoking during pregnancy yes</i>	2/61	-0.08 (-1.31; 1.15)	0.26 (-0.72; 1.15)	-0.45 (-1.58; 0.67)	-0.08 (-1.25; 1.10)
<i>Previous abortion</i>	4/62	-0.57 (-1.45; 0.30)	-0.49 (-1.15; 0.18)	-0.50 (-1.30; 0.30)	-0.49 (-1.10; 0.82)
<i>Number of miscarriage(s)</i>					
0	49/62	ref.	ref.	ref.	ref.
1	12/62	-0.08 (-0.64; 0.48)	-0.39 (-0.82; 0.04)	0.19 (-0.32; 0.70)	-0.15 (-0.68; 0.42)
2	1/62	-0.42 (-2.17; 1.32)	0.13 (-1.17; 1.42)	0.53 (-1.07; 2.12)	0.22 (-1.59; 1.72)

Table S2.: Bivariate associations between hair characteristics and hair cortisol (HCC) and hair cortisone concentrations (HCNC). Shown are potential confounders of HCC and HCNC and the respective linear regression coefficient (b), 95 % confidence interval (95 % CI) and reference category in regression model (ref.). Steroid concentrations were ln-transformed. *p≤ 0.05. Bold face indicates significant associations.

	2 nd trimester			3 rd trimester		
	n	HCC b (95 % CI)	HCNC b (95 % CI)	n	HCC b (95 % CI)	HCNC b (95 % CI)
<i>Location of hair sample</i>						
Occipital	27/55	ref.	ref.	39/58	ref.	ref.
Parietal/temporal	28/55	-0.09 (-0.56; 0.38)	-0.12 (-0.47; 0.23)	19/58	0.16 (-0.26; 0.58)	0.47* (0.03; 0.92)
<i>Frequency of hair washing per week</i>						
1- 3 days/week	34/60	ref.	ref.	32/59	ref.	ref.
Every 2 nd day	19/60	-0.28 (-0.77; 0.21)	-0.35 (-0.72; 0.02)	18/59	-0.24 (-0.70; 0.21)	-0.23 (-0.66; 0.44)
4-6 days/ week	2/60	0.54 (-0.69; 1.76)	0.50 (-0.42; 1.42)	2/59	0.08 (-1.04; 1.20)	-0.64 (-1.88; 0.84)
Daily	5/60	-0.29 (-1.10; 0.52)	-0.58 (-1.25; 0.09)	7/59	-0.92* (-1.60; -0.23)	-1.41* (-2.13; -0.70)
<i>Season of hair sample collection</i>						
Winter	17/62	ref.	ref.	17/62	ref.	ref.
Spring	15/62	0.08 (-0.61; 0.78)	-0.08 (-0.56; 0.40)	19/62	-0.30 (-0.86; 0.27)	0.01 (-0.51; 0.52)
Summer	14/62	-0.03 (-0.76; 0.70)	0.04 (-0.47; 0.54)	12/62	0.10 (-0.60; 0.78)	0.49 (-0.14; 1.12)
Fall	16/62	0.04 (-0.67; 0.75)	0.52 (-0.03; 1.01)	14/62	-0.10 (-0.71; 0.52)	0.21 (-0.35; 0.77)
<i>Storage duration (years)</i>						
< 1	3/62	ref.	ref.	9/62	ref.	ref.
1- 1.5	17/62	0.21 (-0.95; 1.37)	0.51 (-0.33; 1.35)	24/62	-0.04 (-0.71; 0.64)	-0.32 (-0.95; 0.31)

1.5- 2	26/62	0.14 (-0.97; 1.25)	0.13 (-0.67; 0.93)	22/62	-0.14 (-0.81; 0.54)	-0.34 (-0.98; 0.30)
> 2	16/62	0.03 (-1.10; 1.16)	0.24 (-0.57; 1.05)	7/62	0.48 (-0.37; 1.32)	-0.30 (-1.10; 0.49)



Supplementary Figure S3: Flow chart of sample exclusion. Criteria for exclusion of samples with the respective sample size (n) are shown.

III. DARSTELLUNG DES EIGENEN BEITRAGS

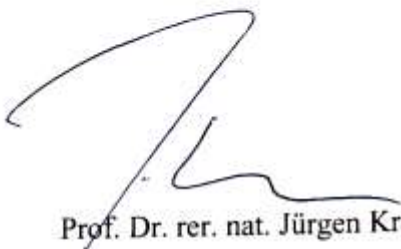
Die Idee zum Thema der Dissertationsarbeit habe ich gemeinsam mit meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Wieland Kiess erarbeitet. Die Daten stammen aus der LIFE Child Studie (Quante et al., 2012, Poulain et al., 2017). Bei der Datensammlung und Datenbereinigung habe ich als studentische Hilfskraft mitgeholfen. Die Haarsteroidwerte wurden durch das Institut für Labormedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik (ILM) bestimmt, genauer durch M. Sc. Alexander Gaudl unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Uta Ceglarek und Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Kratzsch (Gaudl et al., 2016). Die Analyse der Daten und die Interpretation der Ergebnisse habe ich selbstständig durchgeführt. Dr. rer. medic. Diana Pietzner, Dr. rer. medic Mandy Vogel und M. Sc. Alexander Gaudl haben mich dabei freundlicherweise unterstützt. Die Formulierung des Manuskriptes habe ich selbst erarbeitet. Ideen und Kommentare der Co-Autoren habe ich im Verlauf eingearbeitet.



M. Sc. Alexander Gaudl



Prof. Dr. med. Wieland Kiess



Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Kratzsch



Dr. rer. medic. Mandy Vogel

IV. ERKLÄRUNG ÜBER DIE EIGENSTÄNDIGE ABFASSUNG DER ARBEIT

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

Datum

Unterschrift

V. DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Wieland Kiess für die Möglichkeit im Rahmen der LIFE CHILD Studie - Leipzig zu promovieren. Gemeinsam haben wir ein nicht nur für mich spannendes, sondern auch gesellschaftlich wichtiges Thema herausgearbeitet. Ich danke ihm für die hilfreichen Ratschläge und Diskussionen, die wissenschaftlichen Anregungen und praktischen Hilfestellungen während meiner Promotionsarbeit.

Besonderen Dank richte ich auch an die Mitarbeiter der Studienambulanz und der IT-Abteilung der LIFE CHILD Studie in Leipzig. Durch die unermüdliche Sammlung und Aufarbeitung der Daten war diese Dissertation erst möglich. Dr. rer. medic. Mandy Vogel, Prof. Dr. -Ing. Thoralf Kirsten und Dr. rer. medic. Diana Pietzner standen mir stetig bei Fragen zur Statistik und zum Publizieren zur Seite.

Ich danke außerdem Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Kratzsch, Prof. Dr. rer. nat. Uta Ceglarek und M. Sc. Alexander Gaudl, welche die Methode der Bestimmung von Haarcortisol und -cortison weiterentwickelt und laborchemisch durchgeführt haben.

Ein großer Dank geht an meine Familie und Freunde. Besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern Dr. med. Antje Scharlau und Dr. med. Gunnar Scharlau, die mir in allen Lebensabschnitten Rückhalt bei der Verwirklichung meiner Ziele und Wünsche gegeben haben. Auch danke ich meinen Großeltern, Ingrid und Eckhard Bethke sowie Anneliese und Eberhard Scharlau. Ohne die emotionale und finanzielle Unterstützung meiner Familie wäre diese Promotion nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt auch meinem Partner Stephan Riesenberg. Er hat mich durch die Promotion begleitet und stand mir mit fachlicher Kompetenz und persönlicher Unterstützung stets zur Seite.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen Schwangeren und Kindern der LIFE CHILD Studie bedanken, sie haben mein Projekt erst möglich gemacht.

In Dankbarkeit.

Friederike Scharlau

Leipzig 2018