

Die Messung des freien Speichel-Cortisol vor und nach intravenöser Stimulation mit Corticotropin-Releasing Hormon.* Der Einfluß basaler Cortisolspiegel auf die Stimulierbarkeit

Measurement of free Salivary Cortisol before and after Stimulation with Corticotropin-Releasing Hormone. The Influence of basal Cortisol levels on the response to CRH

U. Krause, A. Feichtinger*, M. Nink, H. Lehnert, J. Beyer

III. Medizinische Klinik – Endokrinologie – der Universität Mainz

Zusammenfassung:

Der CRH-Test hat in der Diagnostik von Störungen der Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse zunehmend an Bedeutung gewonnen. In der vorliegenden Arbeit berichten wir über unsere Untersuchungen zur Messung des freien Speichel-Cortisol vor und nach Stimulation mit 100 ug hCRH an 30 gesunden Probanden. Die Stimulationen erfolgten morgens um 8.00 Uhr. 14 Probanden wurden ein zweites Mal um 17.00 Uhr untersucht. Die morgendliche Testung führte zu einem Anstieg der Serum-Cortisolwerte von durchschnittlich $16,9 \pm 4,6$ ug/dl auf $19,7 \pm 4,3$ ug/dl (23% Anstieg). Speichel-Cortisol stieg von $0,49 \pm 0,17$ ug/dl auf $0,75 \pm 0,33$ ug/dl (77% Anstieg). Die abendliche Stimulation führte zu einem Anstieg des Serum-Cortisols von durchschnittlich $9,46 \pm 3,1$ ug/dl auf $19,4 \pm 2,3$ ug/dl (125% Anstieg), während Speichel-Cortisol von $0,19 \pm 0,12$ auf $0,65 \pm 0,14$ ug/dl (378% Anstieg) erhöht wurde. Die abendliche Durchführung des CRH-Tests mit Messung des Speichel-Cortisols ergab somit den höchsten Anstieg der Meßwerte. Die Speichelgewinnung ist einfach und kann auch vom Patienten alleine durchgeführt werden. Organisatorische Schwierigkeiten, wie sie bei der abendlichen Testung auftreten können, werden damit umgangen.

Schlüsselwörter:

CRH-Tests – Serum-Cortisol – Speichel-Cortisol – freies Hormon

Summary:

The CRH-stimulation test has gained increasing importance in the diagnosis of disturbances of the pituitary-adrenal axis. In our present paper we report on our studies on the measurement of free salivary cortisol before and after stimulation with 100 ug hCRH in 30 healthy volunteers. The stimulations were carried out at 8.00 in the morning. 14 volunteers were studied on a second occasion at 17.00 h. The morning tests led to a mean increase of serum cortisol from 16.9 ± 4.6 ug/dl to 19.7 ± 4.3 ug/dl (23% increase). Salivary cortisol rose from 0.49 ± 0.17 ug/dl to 0.75 ± 0.33 ug/dl (77% increase). The evening tests resulted in a mean elevation of serum cortisol from 9.46 ± 3.1 ug/dl to 19.4 ± 2.3 ug/dl (125% increase) whereas salivary cortisol levels were raised from 0.19 ± 0.12 to 0.65 ± 0.14 ug/dl (378% increase). Performing CRH-tests in the evening and measuring salivary cortisol levels thus resulted in the highest increases of measured cortisol values. Sampling of saliva is simple and can be carried out by the patient himself. Organizational problems that may arise when conducting tests in the evening can thus be solved.

Keywords:

CRH-tests – serum cortisol – salivary cortisol – free hormone

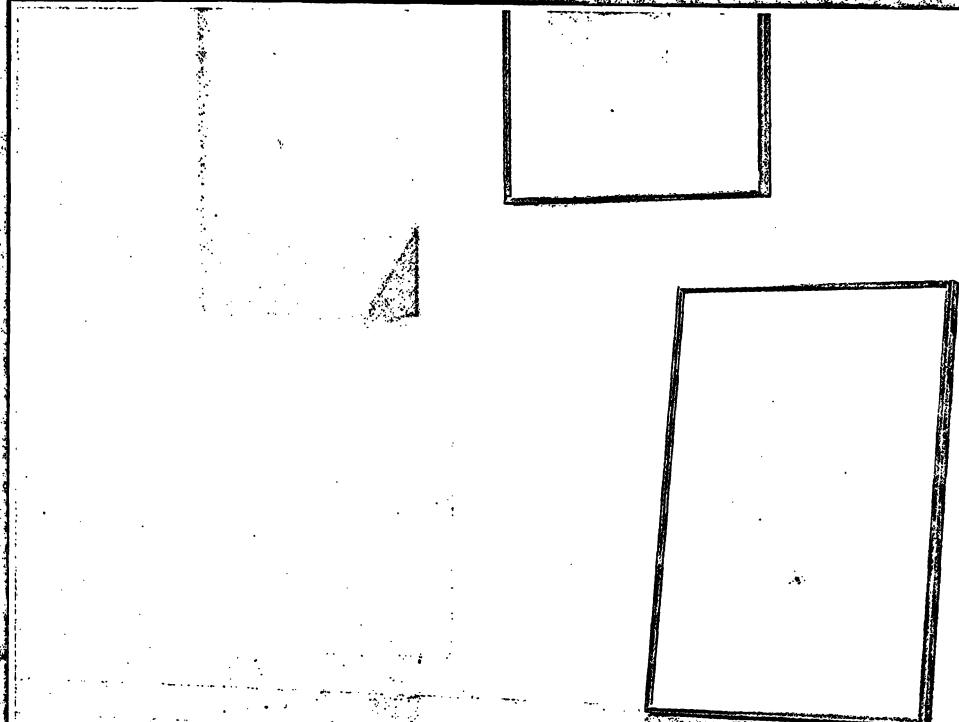
Einführung

Die Existenz eines hypothalamischen Faktors, der die Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse stimuliert, wurde bereits 1948 von Harris et al. (1) postuliert. Vale et al. (2) gelang 1981 die Extraktion, Reindarstellung und Strukturaufklärung von ovinem Corticotropin-Releasing-Hormon (oCRH). Es handelt sich dabei um ein Peptid-Hormon mit einer Kettenlänge von 41 Aminosäuren. Shibahara et al. (3) konnten 1983 aus clonierter DNA die Struktur des menschlichen CRH (hCRH) herleiten. Sie unterscheidet

sich von der des oCRH durch den Austausch von sieben Aminosäuren. Die intravenöse Applikation von synthetischem CRH beider Spezies führt zu einer Stimulation der Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (4, 5, 6). Es kommt dabei zu einer dosisabhängigen Stimulation von ACTH, β -Endorphin und Cortisol (7). Es konnte gezeigt werden, daß eine einmalige intravenöse Gabe von 100 ug CRH genügt, um beim Gesunden die Cortisolsekretion nahezu maximal anzuregen. In dieser Dosierung werden nur geringe Nebenwirkungen beobachtet. Bei einem Teil der Probanden läßt sich ein Flush beobachten (5, 6), der sich thermographisch bei allen Untersuchten nachweisen läßt (8). Alle Probanden zeigen eine vertiefte Atmung (9),

* Teil einer Dissertation von A. F., Mainz 1991

SEROZYME. GALERIE MODERNER PERFEKTION.



Serono Galerie: fotografiert im MUSEUM IN DER NEUEN KUNSTSZ Freiburg

enzym-

Immunoassays von Serono Diagnostika.

Sterilitäts- diagnostik

SH SEROZYME
H SEROZYME
estradiol SEROZYME
Progesteron SEROZYME
Laktin SEROZYME

Schwangerschafts- überwachung

AFP SEROZYME
f-Estriol SEROZYME
HCG SEROZYME

Schilddrüsendiagnostik

T1 SEROZYME
T3 SEROZYME
T4 SEROZYME
T4 SEROZYME
T3-Uptake SEROZYME
TSH SEROZYME

Stoffwechsel/ Verschiedenes

Cortisol SEROZYME
Digitoxin SEROZYME
Digoxin SEROZYME
Ferritin SEROZYME
Gesamt IgE SEROZYME

Tumordiagnostik/ Tumornachsorge

AFP SEROZYME
CEA SEROZYME
HCG SEROZYME

Deutschland:
Serono Diagnostika GmbH
Erzhauser Str. 134 D-7800 Freiburg
Zentrale (0761) 4 01 670



Erfahrung schafft Fortschritt®

Österreich:
Serono Diagnostika GmbH
Informationsbüro Wien
Kärntnerstrasse 13/A-1140 Wien
Telefon (0222) 894 6118

Ich bitte um Informationen zu:

Name

Institut

Lassen Sie es nicht zum **Finanzchaos** kommen!

Hand auf's Herz: Viele Ärzte haben ihre Finanzen nicht im Griff — kein Wunder bei der knappen Zeit und den sich ständig verschärfenden Rahmenbedingungen. Überschuldung, Liquiditätsengpässe, unangemessene Investitionen, fehlende Personalplanung, Anlageflops usw.



Was passiert, wenn die Bank Ihnen den Hahn zudreht?!

Nicht auszudenken...

Deshalb, bevor es zu spät ist: Sichern Sie Ihre Zukunft mit **CombiPlan**, der Finanzprophylaxe des Arztes.

Endlich Klarheit über: Liquidität, Umsätze, Kosten, Gewinne, Fallzahlen, Fallwerte, Personal, Investitionen, Steuern.

Das System:

edles Vollrindleder, bordeaux, handliches Taschenformat (15 cm x 11 cm), Einstechfach mit Solar-Taschenrechner im Scheckkartenformat, übersichtliches Brevier, Finanzplan, gefaltet nicht größer als ein Taschenkalender.

Die Leistung:

Totalinformation über jedes Quartal, Jahresübersicht 1991, 1992 und 1993,

Transparenz für jeweils drei Jahre, geringer Zeitaufwand.

Auf kleinstem Raum und in logischer Reihenfolge wird dem Arzt ein Informationssystem geboten, das zu transparentem Zahlenmaterial führt und in idealer Weise die Informationen des Steuerberaters oder sogar der eigenen EDV ergänzt.



Verlag Kirchheim + Co GmbH,
Kaiserstraße 11, 6500 Mainz 1

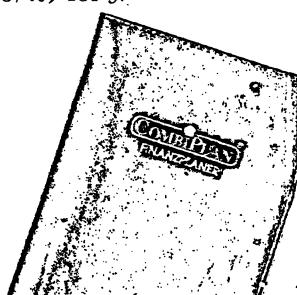
Bitte senden Sie mir Finanzplaner **CombiPlan** von G. Frielingsdorf im eleganten Lederetui, mit Solar-Taschenrechner und Brevier, für die Vergleichsjahre 1991, 1992 und 1993, zum Preis von 148,- DM, ISBN 3-87409-181-3.

NAME:

STRASSE:

PLZ/ORT:

DATUM/UNTERSCHRIFT:



die von einigen subjektiv als „Atemnot“ empfunden wird (6). In Dosierungen über 200 µg wurden vereinzelt Blutdruckabfälle beschrieben (10). Insgesamt ist CRH jedoch gut verträglich (11). Es wurde daher von verschiedenen Autoren vorgeschlagen, die Substanz als Diagnostikum bei unterschiedlichen Störungen der Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse zu benutzen (12, 13, 14, 15). Sie hat in der Folge den mit erheblichen unangenehmen Nebenwirkungen behafteten Lysin-Vasopressin-Test ersetzen können (16). Darüber hinaus ist der CRH-Test heute in der klinischen Diagnostik von Störungen der Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse eine sinnvolle Ergänzung zum Insulin-Hypoglykämie-Test und zum Dexamethason-Test geworden.

Als wichtigster Meßparameter wird heute im allgemeinen der Anstieg des Serum-Cortisols zur Beurteilung des Testausfalles herangezogen. Cortisol ist im Serum unter nicht stimulierten Bedingungen überwiegend an Transcortin gebunden (17). Die Bindungskapazität des Transcortins ist jedoch beschränkt. Nach Stimulation der Cortisolsekretion wird die Bindungskapazität des Transportproteins leicht überschritten. Ein erhöhter Anteil von freiem, nicht an Transcortin gebundenem Cortisol ist dann die Folge (18). Nach Stimulation ist daher ein stärkerer Anstieg des freien Cortisols als des Gesamt-Cortisols zu erwarten. Daher, und weil nur das freie Cortisol biologisch aktiv ist, wäre die Messung des freien Serum-Cortisols der des Gesamt-Cortisols vorzuziehen. Methodische Probleme und hoher Arbeitsaufwand stehen bisher jedoch einer breiten Anwendung der Messung des freien Cortisols im Serum entgegen.

Umfangreiche Untersuchungen anderer Autoren haben gezeigt, daß im Speichel gemessenes Cortisol eine gute Korrelation mit dem freien Serum-Cortisol zeigt (18, 19, 20, 21, 22). Es konnte ferner gezeigt werden, daß Cortisol durch Diffusion aus dem Serum in den Speichel gelangt und daß die Speichelflußrate keinen Einfluß auf die Konzentration von Cortisol im Speichel ausübt (23). Anders als im Serum ist Cortisol im Speichel an keine Transportproteine gebunden. Speichelcortisol erscheint deshalb als ein guter Parameter für die Cortisolsekretion. Wir untersuchten deshalb in der vorliegenden Studie, ob Speichel-Cortisol als Meßparameter für die Beurteilung eines CRH-Testes geeignet ist oder Vorteile gegenüber der Messung von Serum-Cortisol bietet. Da die Cortisolsekretion einer circadianen Rhythmus unterliegt, sollte auch die ta-

geszeitliche Abhängigkeit der Meßwerte berücksichtigt werden.

Probanden und Methodik

Wir untersuchten 30 gesunde Versuchspersonen (20 männlich, 10 weiblich) im Alter von $26,2 \pm 6,1$ Jahren. Die Probanden waren $176,3 \pm 11,4$ cm groß und wogen durchschnittlich $72,7 \pm 13,7$ kg. Alle Probanden waren zur Zeit der Studie frei von offensichtlichen Erkrankungen und nahmen keine Medikamente ein. Nach umfassender Aufklärung über den experimentellen Charakter der Studie und über mögliche Nebenwirkungen und Risiken einer CRH-Applikation erklärten alle ihr Einverständnis zur Teilnahme.

Die Tests begannen morgens um 8.00 Uhr. 14 Probanden (5 weiblich, 9 männlich) wurden ein zweites Mal um 17.00 Uhr untersucht. Für die Dauer des Versuchs wurden die Probanden auf einer Liege gelagert. Eine präkubitale Vene wurde kanüliert und die Kanüle mit einer minimalen Infusion mit 0,9%iger Kochsalzlösung offen gehalten. Nach einer 30minütigen Ruhepause wurde Blut für die Bestimmung von Serum-Cortisol und Speichel für Speichel-Cortisol abgenommen. Die Speichelgewinnung erfolgt mit Hilfe von Salivetten®. Dazu entnimmt der Proband der Salivette den mit Zitronensäure präparierten Wattetampon und kaut ihn so lange, bis reger Speichelfluß eintritt. Dabei saugt sich der Tampon mit Speichel voll. Der gefüllte Tampon wird zurück in das Eihängegefäß der Salivette verbracht und für 10 Minuten zentrifugiert. Der im Übergefäß befindliche klare Speichel kann nun bis zur Messung des Cortisols eingefroren werden.

Nach Abnahme der Basalwerte erhielten die Patienten jeweils 100 µg hCRH, gelöst in 1,0 ml 0,9% NaCl mit 0,02% HCl intravenös als Bolus gespritzt. In Abständen von 15 Minuten wurde bis zur 90. Minute nach hCRH-Applikation weiteres Serum und Speichel zur Cortisolbestimmung gewonnen. Die Salivetten waren von Sarstedt (Nürnberg-Rommelsdorf). hCRH (Corticobiss®) wurde von Fa. Bissendorf Peptide, Hannover, bezogen. Die Messung des Speichel-Cortisols erfolgte mit einem RIA-Kit der Diagnostic Products Corporation (Fa. H. Biermann, Bad Nauheim). Zur Messung des Serum-Cortisol wurde ein Kit (Cortisol Bridge) der Fa. Serono, Freiburg, eingesetzt. Die Intraassay-Varianz war jeweils kleiner als 5% ($9,9 \pm 0,46$ µg/dl, $n = 15$), die Interassay-Varianz war kleiner als 11% ($3,8 \pm 0,36$; $10,9 \pm 0,77$; $25,1 \pm 2,5$; $n = 10$).

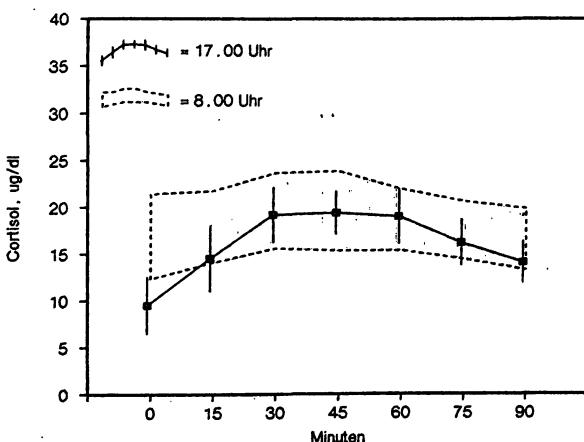


Abb. 1: Anstieg des Serum-Cortisols nach intravenöser Injektion von 100 µg hCRH zu unterschiedlichen Tageszeiten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

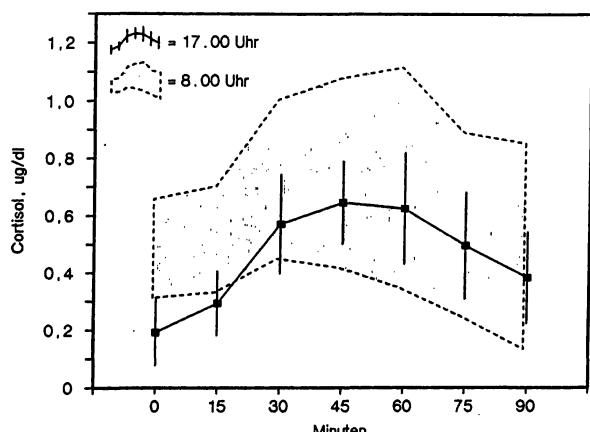


Abb. 2: Anstieg des Speichel-Cortisols nach intravenöser Injektion von 100 µg hCRH zu unterschiedlichen Tageszeiten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

Ergebnisse

7 von 30 Probanden zeigten bei morgendlichem Testbeginn um 8.00 Uhr einen Anstieg des Serum-Cortisol um mehr als 50% über den Ausgangswert. Wurde Speichel-Cortisol gemessen, zeigten zur gleichen Zeit 18 Probanden einen mehr als 50%igen Anstieg der Cortisolspiegel über den Ausgangswert. Die Serum-Cortisol-Werte stiegen von durchschnittlich $16,9 \pm 4,6$ ug/dl auf $19,7 \pm 4,3$ ug/dl ($p < 0,005$). Die unstimulierten Cortisol-Konzentrationen im Speichel betrugen durchschnittlich weniger als 3% der gleichzeitig im Serum gemessenen Konzentrationen. Speichel-Cortisol stieg bei morgendlicher Testdurchführung von $0,487 \pm 0,173$ ug/dl auf $0,749 \pm 0,329$ ug/dl ($p < 0,001$). Maximale Cortisol-Spiegel wurden im Serum und im Speichel jeweils 45 Minuten nach Stimulation gemessen (Abb. 1).

Von 14 Probanden, die zusätzlich abends um 17.00 Uhr getestet wurden, zeigten 13 einen Cortisol-Anstieg im Serum, der den Ausgangswert um mehr als 50% überstieg. Ebenfalls 13 von 14 Probanden zeigten einen Anstieg der Cortisolwerte im Speichel um mehr als 50%. Während die Serum-Cortisol-Spiegel nach abendlicher Stimulation mit CRH von $9,46 \pm 3,1$ ug/dl auf $19,4 \pm 2,3$ ug/dl anstiegen ($p < 0,0001$), zeigte sich zur gleichen Zeit im Speichel ein Anstieg von $0,193 \pm 0,117$ ug/dl auf $0,646 \pm 0,142$ ug/dl ($p < 0,0001$). Maximale Cortisolspiegel im Serum und im Speichel wurden auch bei abendlicher Stimulation jeweils 45 Minuten nach CRH-Injektion erreicht (Abb. 2). Die unstimulierten Cortisol-Konzentrationen im Speichel betrugen abends 2% der gleichzeitig im Serum gemessenen Konzentrationen.

Zwischen der Höhe der Cortisol-Ausgangswerte und deren Stimulierbarkeit durch hCRH bestand ein negativ exponentieller Zusammenhang: Je höher der Ausgangswert war, desto geringer war der prozentuale Anstieg der Cortisol-Spiegel, gemessen 45 Minuten nach CRH-Stimu-

lation. Dieser Zusammenhang war bei abendlicher Testung besonders ausgeprägt. Für Serum-Cortisol ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,86$, für Speichel-Cortisol war $r = 0,83$. Bei morgendlicher Testung ergab sich ein weniger enger Zusammenhang. Bei Serum-Cortisol war der Korrelationskoeffizient $r = 0,51$, für Speichel-Cortisol war $r = 0,45$ (Abb. 3 u. Abb. 4).

Diskussion

Unsere Untersuchungen zeigen, daß die freien Cortisol-Spiegel im Speichel nach CRH-Stimulation stärker ansteigen als die Serum-Cortisol-Spiegel. Allolio et al. fanden ähnliches nach Stimulation mit Synacthen® (18). Dieser Effekt ist bei abendlicher Stimulation stärker ausgeprägt als morgens. Freies Cortisol zeigte eine stärkere interindividuelle Varianz als Serum-Cortisol. Bei intraindividueller Betrachtung wurde die Signifikanz der Anstiege nach Stimulation jedoch nicht beeinträchtigt.

Im Serum findet sich bei morgendlicher Durchführung des Tests nur eine durchschnittliche Stimulation der Cortisol-Spiegel auf 123% vom Ausgangswert (= 100%). Im Speichel werden die Cortisol-Spiegel auf 177% des Basalwertes angehoben. Während abends die Serum-Cortisol-Werte auf 226% vom Ausgangswert steigen, wird beim Speichel-Cortisol durchschnittlich ein Anstieg auf 478% beobachtet.

Die Konzentrationen der jeweils im Serum und im Speichel erreichten Maximalwerte sind morgens und abends ähnlich. Der abendlich prozentual höhere Anstieg der Cortisol-Werte im Speichel wie im Serum ist deshalb durch die zu diesem Zeitpunkt niedrigeren Ausgangswerte bedingt. Die abendliche Durchführung des Tests bringt bei Gesunden in jedem Fall die bessere Stimulation durch CRH. Dies fanden auch verschiedene andere Autoren (24, 25), während Tsukada et al. (26) und Watabe et al. (27) keinen Unterschied zwischen den Testergebnis-

% Stimulation über basal

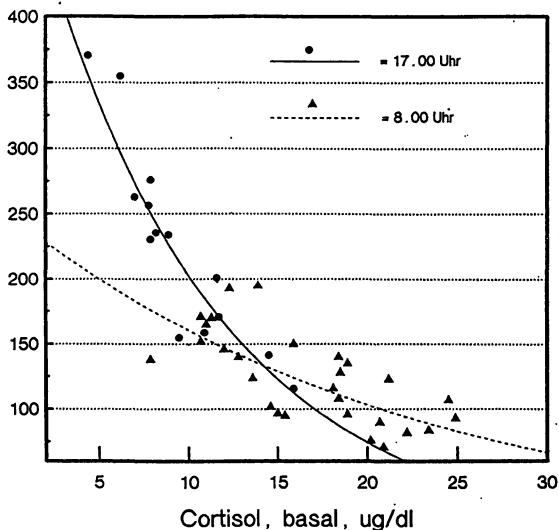


Abb. 3: Abhängigkeit der Stimulierbarkeit des Serum-Cortisol von der Höhe der Basalwerte. Die gestrichelte Kurve und die Dreiecke zeigen die Abhängigkeit um 8.00 Uhr, die durchgezogene Kurve und die Punkte repräsentieren die Verhältnisse um 17.00 Uhr.

% Stimulation über basal

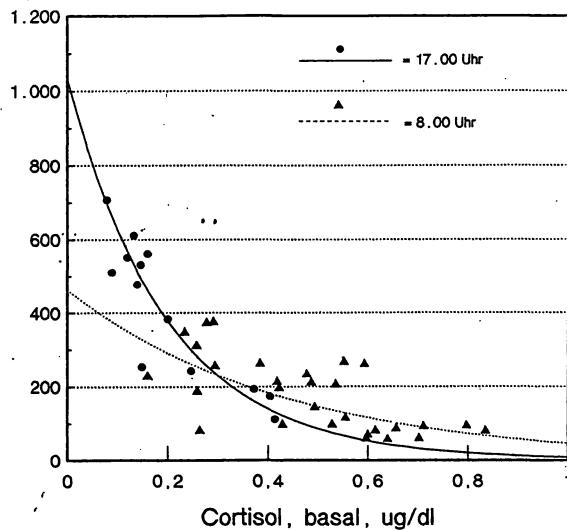


Abb. 4: Die Abhängigkeit der Stimulierbarkeit des Speichelcortisol von der Höhe der Ausgangswerte. Die gestrichelte Kurve und die Dreiecke zeigen die Verhältnisse um 8.00 Uhr, die durchgezogene Kurve und die Punkte jene um 17.00 Uhr.

sen morgens und abends fanden. Wir fanden eine negativ exponentielle Abhängigkeit der Stimulierbarkeit der Cortisol-Sekretion von der Höhe der Ausgangsspiegel. Der Kurvenverlauf war dabei jeweils um 17.00 Uhr steiler als um 8.00 Uhr (Abb. 3 u. Abb. 4). Wenn für die Stimulierbarkeit nur die Höhe der Cortisol-Ausgangswerte ausschlaggebend wäre, sollte man nahezu deckungsgleiche Regressionskurven erwarten. Unsere Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß über die Cortisol-Basalwerte hinaus auch die Tageszeit die Reagibilität des Systems steuert. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, den CRH-Test unter streßfrei standardisierten Ruhebedingungen abends durchzuführen, wenn die Cortisol-Ausgangsspiegel im circadianen Rhythmus abgesunken sind und die Reagibilität der Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse angehoben ist. Dieser Forderung stehen häufig organisatorische Schwierigkeiten entgegen. Diese können durch die Messung des Cortisols im Speichel vermieden werden. Die Gewinnung der jeweiligen Speichelproben kann von einer Hilfskraft oder auch vom Patienten selbst vorgenommen werden. Dies ist besonders in der Pädiatrie von Bedeutung, wo belastende Blutentnahmen gerne vermieden werden.

Danksagung

Die Autoren danken Frau Christina Spurzem für ihre technische Mitarbeit.

Schriftum:

- HARRIS, G. W.: Neural control of the pituitary gland. *Physiol. Rev.* **28**, 139–173 (1948).
- VALE, W., SPIESS, J., RIVIER, C., RIVIER, J.: Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphine. *Science* **213**, 1394–1397 (1981).
- SHIBAHARA, S., MORIMOTO, Y., FURUTANI, Y., NOTAKE, M., TAKAHASHI, H., SHIMIZU, S., HORIKAWA, S., NUMA, S.: Isolation and sequence analysis of the human corticotropin-releasing factor precursor gene. *EMBO J.* **2**, 775–779 (1983).

Anschrift für die Autoren:

Priv.-Doz. Dr. U. Krause
Uni-Klinik Bau 303
Langenbeckstraße 1
6500 Mainz



DIFCO und andere Nährböden der Weltliteratur sowie Testmedien für Vitamin- und Aminosäurebestimmungen sowie Antibiotika- und Sterilitätsmedien nach USP APHA, Differenzierungsscheibchen, virologische Präparate.

Seltene Chemikalien für Forschungszwecke, immunol. Präparate

ISMUNIT: Virus-Antigene und Sera, Agglutinoteste.

Auf Wunsch Listen und Spezial-Literatur.

OTTO NORDWALD KG, Heinrichstraße 5, 2000 Hamburg 50

Import bakt. serol. Präparate, Telefon (0 40) 43 28 27

Fax (0 40) 43 28 30

Spezialimporteur seit über 30 Jahren

- GROSSMANN, A., NIEUWENHUYZEN-KRUSEMANN, A. C., PERRY, L., TOMLIN, S., SHALLY, A. V., COY, D. H., REES, L. H., COMARY-SHALLY, A. M., BESSER, G. M.: New hypothalamic hormone corticotropin-releasing factor specifically stimulates the release of adrenocorticotrophic hormone and cortisol in man. *Lancet* **1**, 921–922 (1982).
- SCHÜRMAYER, T. H., AVGERINOS, P. C., GOLD, P. W., GALUCCI, W. T., TOMAI, T. P., CUTLER, G. B., LORIAUX, D. L., CHROUSOS, G. P.: Human corticotropin-releasing factor in man: Pharmacokinetic properties and dose-response of plasma adrenocorticotropin and cortisol. *J. Clin. Invest.* **71**, 587–595 (1983).
- RIVIER, C., BROWNSTEIN, M., SPIESS, J., RIVIER, J., VALE, W.: In vivo corticotropin-releasing factor-induced secretion of adrenocorticotropin, beta-endorphin, and corticosterone. *Endocrinology* **110**, 272–278 (1982).
- KRAUSE, U., NINK, M., BRAUER, A., HUBER, I., VELTEN, A., LEHNERT, H., BEYER, J.: Studies on the involvement of serotonin in the respiratory stimulation through hCRH. submitted for publication.
- NINK, M., HUBER, I., OPPERMANN, D., KRAUSE, U., SCHULZ, V.: Corticotropin-releasing factor – a respiratory stimulant (abstract). *Eur. J. Respir. Dis.* **69**, (Suppl. 146), A118 (1986).
- HERMUS, A., PIETERS, G., PESMANN, G. J., BENRAD, Th. J., SMALS, A. G. H., KLOPPENBURG, P. W. C.: Serious reaction to corticotropin-releasing factor. *Lancet* **I**, 776 (1983).
- CHROUSOS, G. P., SCHÜRMAYER, T. H., DOPPMANN, J., OLDFIELD, E. H., SCHULTE, H. M., GOLD, P. W., LORIAUX, D. L.: Clinical application of corticotropin-releasing factor. *Ann. Intern. Med.* **102**, 344–358 (1985).
- SCHULTE, H. M., SCHÜRMAYER, Th. H.: Corticotropin-Releasing-Faktor: Praktische Anwendung in der Klinik. *Dtsch. med. Wschr.* **111**, 28–31 (1986).
- CHROUSOS, G. P., SCHULTE, H. M., OLDFIELD, E. H., GOLD, P. W., CUTLER jun., G. B., LORIAUX, D. L.: The corticotropin-releasing factor stimulation test: an aid in the differential diagnosis of patients with Cushing's syndrome. *New Engl. J. Med.* **310**, 622 (1984).
- MÜLLER, O. A., DÖRR, H. G., HAGEN, B., STALLA, G. K., V. WERDER, K.: Corticotropin-releasing factor(CRF)-stimulation test in normals and patients with disturbances of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Klin. Wochenschr.* **60**, 1485–1491 (1982).
- SCHULTE, H. M., CHROUSOS, G. P., OLDFIELD, E. H., GOLD, P. W., CUTLER jun., G. B., LORIAUX, D. L.: Ovine corticotropin-releasing factor administration in normal man. *Hormone Res.* **21**, 69–74 (1985).
- BROSTOFF, J., JAMES, R. H. T., LANDON, J.: Plasma corticosteroid and growth hormone response to lysine-vasopressin in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **28**, 511–518 (1968).
- KLEY, H. K., BÄRTMANN, E., KRÜSKEMPER, H. L.: A simple and rapid method to measure non-protein-bound fractions of cortisol, testosterone and oestradiol by equilibrium dialysis: comparison with centrifugal filtration. *Acta Endocrinol.* **85**, 209–219 (1977).
- ALLOLIO, B., FELTES, G., DEUSS, U., KAULEN, D., WINCKELMANN, W.: Direkter Radioimmunoassay von freiem Cortisol im Speichel. *Lab.med.* **9**, 281–284 (1985).
- HIRAMAJITSU, R.: Direct assay of cortisol in human saliva by solid phase radioimmunoassay and its clinical applications. *Clin. Chim. Acta* **117**, 239–249 (1981).
- AL ANSARI, A. A. K., PERRY, L. A., SMITH, D. S., LANDON, J.: Salivary cortisol determination: adaption of a commercial serum cortisol kit. *Ann. Clin. Biochem.* **19**, 163–166 (1982).
- PETERS, J. R., WALKER, R. F., RIAD-FAHMY, D., HALL, R.: Salivary cortisol assays for assessing pituitary-adrenal reserve. *Clin. Endocrinol.* **17**, 583–592 (1982).
- KAHN, J. P., RUBINOW, D. R., DAVIS, C. L., KLING, M., POST, M.: Salivary cortisol, a practical method for evaluation of adrenal function. *Biol. Psychiatry* **23**, 335–349 (1988).
- VINIG, R. F., MCGINLEY, R. A., SYMONS, R. G.: Hormons in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. *Clin. Chem.* **29**, 1752 (1983).
- HERMUS, A. R. M. M., PIETERS, G. F. M., SMALS, A. G. H., BENRAAD, Th. J., KLOPPENBURG, P. W. C.: Plasma adrenocorticotropin, cortisol, and aldosterone responses to corticotropin-releasing factor: Modulatory effect of basal cortisol levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **58**, 187–191 (1984).
- DeCHERNEY, G. S., DEBOLD, C. R., JACKSON, R. V., SHELDON, W. R., ISLAND, D. P., ORTH, D. N.: Diurnal variation in the response of plasma adrenocorticotropin and cortisol to intravenous ovine corticotropin-releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **61**, 273–270 (1985).
- TSUKADA, T., NAKAI, Y., KOH, T., TSUJII, S., IMURA, H.: Plasma disappearance of ovine corticotropin-releasing factor in man. *Clin. Endocrinol.* **20**, 111–117 (1984).
- WATABE, T., TANAKA, K., HASEGAWA, M., MIYABE, S., SHIMIZU, N.: Responses of plasma adrenocorticotropin and cortisol to intravenous injection of synthetic ovine corticotropin-releasing factor in the morning and early evening in normal human subjects. *Endocrinol. Japon.* **32**, 771–779 (1985).