



Ewelina Dziurkowska

**Wpływ leków przeciwdepresyjnych
na poziom kortyzolu
w ślinie kobiet z depresją**

Promotor rozprawy: prof. dr hab. Marek Wesółowski

**Praca wykonana w Katedrze i Zakładzie Chemii Analitycznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
i przedstawiona Radzie Wydziału Farmaceutycznego w celu uzyskania
stopnia doktora nauk farmaceutycznych**

Gdańsk 2011

Panu Profesorowi Markowi Wesołowskiemu za umożliwienie przeprowadzenia badań
i cierpliwość oraz cenne uwagi towarzyszące powstawaniu tej rozprawy

Paniom Doktor Danucie Rajzer i Lucynie Koniecznej
oraz Współpracownikom z Katedry i Zakładu Chemii Analitycznej za wsparcie i ważne
wskazówki

Dyrekcji, Lekarzom , Pielęgniarkom, Personelowi Pomocniczemu ze Szpitala dla Nerwowo i
Psychicznie Chorych w Starogardzie Gdańskim, a w szczególności Pani Grażynie Ziętara, za
pomoc w nawiązaniu relacji z pacjentami oraz w uzyskiwaniu materiału badawczego i
prowadzeniu dokumentacji

Rodzicom i Bratu za inspirację

Spis treści

Wykaz używanych skrótów	5
1. Wstęp	7
1.1. Kortyzol i jego działanie na organizm człowieka	7
1.2. Schorzenia wywołane zaburzeniami wydzielania kortyzolu	9
1.3. Kortyzol a depresja	10
1.4. Wpływ leków przeciwdepresyjnych na wydzielanie kortyzolu	11
1.4.1. TLPD a wydzielanie kortyzolu	13
1.4.2. SSRI a wydzielanie kortyzolu	15
1.4.3. SNRI a wydzielanie kortyzolu	18
1.4.4. SSA a wydzielanie kortyzolu	19
1.4.5. NaSSA a wydzielanie kortyzolu	20
1.4.6. SSRE a wydzielanie kortyzolu	21
1.5. Metody oznaczania kortyzolu	22
1.5.1. Zalety śliny jako materiału do badań	23
1.5.2. Metody oznaczania kortyzolu w ślinie	24
1.5.2.1. Metody nieseparacyjne	25
1.5.2.2. Metody separacyjne	27
1.5.3. Zależność między poziomem kortyzolu we krwi a w pozostałych płynach ustrojowych ..	28
1.5.3.1. Zależność między poziomem kortyzolu we krwi i ślinie	29
1.5.3.2. Zależność między poziomem kortyzolu we krwi, moczu i ślinie	31
2. Cel pracy	34
3. Część eksperymentalna	36
3.1. Materiał do badań	36
3.2. Aparatura	37
3.3. Odczynniki	38
3.4. Roztwory	38
3.5. Metody badań	39
3.5.1. Procedura analityczna	39
3.5.2. Warunki analizy chromatograficznej	39
3.5.2.1. Wyznaczanie krzywej kalibracji	40
3.5.2.2. Analiza materiału biologicznego	41
3.5.3. Określenie trwałości kortyzolu	41
3.5.4. Oznaczenie wydajności ekstrakcji	42
3.5.4.1. Analiza próbek „bez ekstrakcji”	42
3.5.4.2. Analiza próbek „po ekstrakcji”	42
3.5.5. Parametry walidacji metody analitycznej	43
3.5.5.1. Selektywność	43

3.5.5.2.	Powtarzalność	43
3.5.5.3.	Odtwarzalność	43
3.5.5.4.	Granica wykrywalności i oznaczalności	44
3.6.	Obliczenia statystyczne.....	44
4.	Wyniki.....	45
4.1.	Optymalizacja metody analitycznej.....	45
4.1.1.	Optymalizacja warunków ekstrakcji.....	46
4.1.2.	Ocena trwałości kortyzolu.....	47
4.1.3.	Ocena wydajności ekstrakcji	48
4.1.4.	Dobór parametrów chromatograficznych.....	49
4.1.5.	Walidacja metody analitycznej.....	49
4.1.5.1.	Selektywność	50
4.1.5.2.	Powtarzalność	50
4.1.5.3.	Odtwarzalność	51
4.1.5.4.	Dokładność	51
4.1.5.5.	Liniiowość	51
4.1.5.6.	Granica wykrywalności i oznaczalności	52
4.2.	Wyniki badań grupy kontrolnej.....	54
4.3.	Wyniki badań próbek śliny pochodzących od pacjentek	54
4.3.1.	Wpływ TLPD na wydzielanie kortyzolu.....	60
4.3.2.	Wpływ SSRI na wydzielanie kortyzolu	68
4.3.3.	Wpływ SNRI na wydzielanie kortyzolu.....	83
4.3.4.	Wpływ SSA na wydzielanie kortyzolu	94
4.3.5.	Wpływ pozostałych leków przeciwdepresyjnych na wydzielanie kortyzolu	100
4.3.6.	Wpływ polipragmazji na wydzielanie kortyzolu	106
4.3.7.	Wpływ pozostałych leków psychotropowych na wydzielanie kortyzolu.....	119
5.	Dyskusja wyników	125
5.1.	Interpretacja chemometryczna uzyskanych danych	139
5.2.	Podsumowanie badań	153
6.	Wnioski	156
7.	Bibliografia	158
8.	Aneks	165
	Streszczenie	168
	Summary.....	173

Wykaz używanych skrótów

5-HT - serotonina

5-htp - 5-hydroktryptofan

ACTH (*Adrenocorticotropic hormone*) - hormon adrenokortykotropowy

CA (*Cluster Analysis*) – analiza skupień

CBG (*Corticosteroid - binding globulin*) - transkortyna

Ck – stężenie końcowe kortyzolu

Cn – najniższe oznaczone stężenie kortyzolu

Cp – stężenie początkowe kortyzolu

CRH (*Corticotropin - releasing hormon*) - kortykoliberyna

Cśr – średnia arytmetyczna stężenia kortyzolu

Cw – najwyższe oznaczone stężenie kortyzolu

DEX - deksametazon

DHEA - dehydroepiandrosteron

EIA (*Enzyme - Immuno Assay*) – test immunoenzymatyczny

GR – receptor dla glikokortykosteroidów

HPA (*Hypothalamic - Pituitary – Adrenocortical*) - oś podwzgórze – przysadka - nadnercza

HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) - wysokosprawna chromatografia cieczowa

Hsp (*Heat shock proteins*) – białka szoku termicznego

Kr – krotność hospitalizacji

LC/MS (*Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*) - chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrem mas

Ld – liczba dni hospitalizacji

LLE (*Liquid - Liquid Extraction*) - ekstrakcja ciecz - ciecz

M – mediana stężeń kortyzolu

MR – receptor dla mineralokortykosteroidów

MS (*Mass Spectrometry*) - spektrometria mas

NaRI (*Noradrenalin Reuptake Inhibitors*) - selektywne inhibitory wtórnego wychwytu noradrenaliny

NaSSA (*Noradrenergic and Selective Serotonergic Antidepressants*) - leki silniej blokujące receptor noradrenergiczny niż serotonergiczny

PCA (*Principal Component Analysis*) – analiza głównych składowych

PTSD (*Post - Traumatic Stress Disorder*) - zespół stresu pourazowego

RIA (*Radio - Immuno Assay*) – test radioimmunologiczny

RIMA (*Reversible Inhibitors of Monoaminoxidase A*) - selektywne, odwracalne inhibitory MAO-A (monoaminooksygenazy A)

SARI (*Serotonin Antagonist and Reuptake Inhibitors*) - inhibitory wychwytu serotoniny i antagoniści receptora serotoninowego 5-HT₂

SNRI (*Serotonin - Noradrenalin Reuptake Inhibitors*) - leki wpływające równie silnie na wtórny wychwyty serotoniny i noradrenaliny

SPE (*Solid Phase Extraction*) - ekstrakcja do fazy stałej

SSA (*Specific Serotonin Antidepressants*) - leki blokujące w równym stopniu receptory serotonergiczne i noradrenergiczne

SSRE (*Selective Serotonin Reuptake Enhancers*) - leki zwiększające wychwyt zwrotny serotoniny

SSRI (*Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*) - selektywne inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny

St-8 – stabilizacja wydzielania kortyzolu na poziomie 8 ng/ml

St-10 - stabilizacja wydzielania kortyzolu na poziomie 10 ng/ml

St-15 - stabilizacja wydzielania kortyzolu na poziomie 15 ng/ml

St30-8 - stabilizacja wydzielania kortyzolu na poziomie 8 ng/ml po 30% hospitalizacji

St30-10 - stabilizacja wydzielania kortyzolu na poziomie 10 ng/ml po 30% hospitalizacji

St30-15 - stabilizacja wydzielania kortyzolu na poziomie 15 ng/ml po 30% hospitalizacji

St60-8 - stabilizacja wydzielania kortyzolu na poziomie 8 ng/ml po 60% hospitalizacji

St60-10 - stabilizacja wydzielania kortyzolu na poziomie 10 ng/ml po 60% hospitalizacji

St60-15 - stabilizacja wydzielania kortyzolu na poziomie 15 ng/ml po 60% hospitalizacji

St90-8 - stabilizacja wydzielania kortyzolu na poziomie 8 ng/ml po 90% hospitalizacji

St90-10 - stabilizacja wydzielania kortyzolu na poziomie 10 ng/ml po 90% hospitalizacji

St90-15 - stabilizacja wydzielania kortyzolu na poziomie 15 ng/ml po 90% hospitalizacji

TLPD - trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne

W – wiek pacjentki

1. Wstęp

1.1. Kortyzol i jego działanie na organizm człowieka

Kortyzol jest jednym z najważniejszych hormonów steroidowych wydzielanych przez korę nadnerczy. Jego uwalnianie kontrolowane jest bezpośrednio przez produkowany w przysadce mózgowej hormon adrenokortykotropowy (*Adrenocorticotropic hormone*, ACTH), a pośrednio przez kortykoliberynę (*Corticotropin - releasing hormon*, CRH), hormon podwzgórza. Wydzielanie kortyzolu podlega rytmowi dobowemu, podobnie jak kontrolującego jego uwalnianie ACTH. Najwyższe stężenie hormonu obserwowane jest w godzinach porannych, około godziny 8. Natomiast późnym wieczorem jego stężenie może ulec obniżeniu nawet o połowę (1, 2).

W organizmie hormon ten syntetyzowany jest z cholesterolu, a we krwi występuje głównie w postaci związanej (około 90%) z α_2 globuliną, zwaną transkortyną (*Corticosteroid-binding globulin*, CBG). Możliwość wiązania z białkiem jest ograniczona, dlatego też w przypadku zwiększonego wydzielania kortyzolu przez korę nadnerczy, transkortyna zostaje wysyciona i stężenie formy wolnej szybko podwyższa się. Okres półtrwania kortyzolu wynosi około 100 minut. Jest on metabolizowany w wątrobie i usuwany z moczem w postaci licznych nieaktywnych metabolitów. Kortyzol działa poprzez własny receptor jądrowy. Hormon związany z białkiem CBG dociera do komórki docelowej, ulega rozłączeniu i jako wolna molekula przenika przez błonę cytoplazmatyczną, a następnie łączy się ze swoistym receptorem stabilizowanym przez białka Hsp (*heat shock proteins*), z których najważniejszą rolę odgrywają dwa białka Hsp 90. Następuje zmiana konformacji receptora, tak, iż białka stabilizujące ulegają odłączeniu, a kompleks receptor-kortyzol zostaje przeniesiony przy użyciu transportu aktywnego do jądra komórkowego, gdzie następuje połączenie z łańcuchem DNA i transkrypcja odpowiednich genów.

Kortyzol wywiera znaczący wpływ na metabolizm organizmu, działanie układu odpornościowego, sercowo-naczyniowego, jak również szkieletowego, pośredniczy także w zmianach ekspresji licznych genów. Przyjmuje się, iż około 10 - 20% wszystkich genów w komórce jest kontrolowanych przez glikokortykosteroidy.

Kortyzol, jako główny hormon glikokortykosteroidowy, wraz z insuliną i glukagonem kontroluje przede wszystkim homeostazę glukozy. Podwyższa jej stężenie we krwi, co stymuluje uwalnianie insuliny. Równocześnie hamuje wychwyty oraz zużycie glukozy przez

mięśni. Poprzez wrażliwą na jego działanie lipazę powoduje lipolizę komórek tłuszczowych. Jednakże uwalniana równocześnie insulina stymuluje lipogenezę i w niewielkim stopniu hamuje lipolizę.

Kortyzol wykazuje również wpływ na gospodarkę białkową. Wywołuje zwiększoną produkcję RNA oraz białek w wątrobie, równocześnie wywiera działanie kataboliczne na tkankę mięśniową. Proteoliza w mięśniach zapewnia produkcję substratów dla procesu glukoneogenezy zachodzącego w wątrobie. Opisane wyżej procesy mają na celu zapewnienie odpowiedniej ilości glukozy, która jest podstawowym źródłem energii bezwzględnie potrzebnej do prawidłowej pracy mózgu.

Kortyzol wykazuje supresję na układ immunologiczny poprzez wpływ na stężenie, migrację i działanie leukocytów, zwiększając ich apoptozę. Hamuje on również wydzielanie mediatorów stanu prozapalnego, takich jak cytokiny i hemokiny, co jest szeroko wykorzystywane w farmakoterapii. Kortyzol ogranicza także rozpad mastocytów i bazofili, co zapobiega uwalnianiu histaminy oraz znacznie zmniejsza przepuszczalność naczyń włosowatych podczas reakcji uczuleniowej. Wpływa również na gospodarkę wodno-elektrolitową, co jest spowodowane bezpośrednim oddziaływaniem na receptor aldosteronowy, który wykazuje podobne powinowactwo zarówno do aldosteronu, jak i kortyzolu (1, 2).

Działanie kortyzolu nie ogranicza się tylko do tkanek obwodowych. Stwierdzono ścisłą zależność między układem hormonalnym a ośrodkowym układem nerwowym, w którym zaobserwowano występowanie dwóch typów receptorów dla kortykosteroidów - typ I (MR, mineralokortykosteroidów) i typ II (GR, glikokortykosteroidów). Receptory typu I rozmieszczone są głównie w hipokampie i korze przedczołowej, natomiast receptory typu II rozmieszczone są równomiernie w całym ośrodkowym układzie nerwowym. Zarówno receptory typu GR jak i MR mają wpływ na aktywność neuronalną, syntezę neuroprzekaźników oraz receptorów. Oba typy receptorów wykazują powinowactwo do glikokortykosteroidów, jednakże w przypadku receptorów MR jest ono prawie dziesięciokrotnie wyższe. Stwierdzono, iż receptory typu MR są wysycane kortyzolem w około 90%, niezależnie od poziomu jego wydzielania w organizmie. Natomiast w sytuacji stresowej, w której następuję znaczne zwiększenie produkcji kortyzolu lub w przypadku maksymalnego stężenia wspomnianego hormonu podczas cyklu dobowego, procent wiązania receptorów GR ulega podwyższeniu z około 10 do nawet 90%. Stwierdzono również, iż

pobudzenie obu typów receptorów może wywołać odmienne działanie neuronów oraz neuroprzekazników (3).

1.2. Schorzenia wywołane zaburzeniami wydzielania kortyzolu

Przyjmuje się, iż u zdrowych osób dorosłych, w sytuacji bezstresowej dzienne wydzielanie kortyzolu wynosi od około 10 do 20 mg. Poziom ten może jednak ulegać znacznym wahaniom, wynikającym zarówno z naturalnego rytmu dobowego hormonu, jak również stresu, na jaki narażony jest współczesny człowiek. Schorzenia wywołane zmianami stężenia kortyzolu mogą być spowodowane zarówno zwiększeniem jak i obniżeniem jego wydzielania.

Chroniczne zmniejszenie wydzielania kortyzolu może być spowodowane uszkodzeniem podwzgórza, przysadki lub nadnerczy. W przypadku niedoboru wydzielania kortyzolu (choroba Addisona), najczęstszą przyczyną jest uszkodzenie nadnerczy spowodowane chorobami autoimmunologicznymi lub niektórymi infekcjami, jak gruźlica czy wirus cytomegalii. Objawiać się to może osłabieniem, przemęczeniem, utratą wagi, obniżeniem ciśnienia, nadmierną pigmentacją skóry oraz trudnością w utrzymaniu prawidłowego poziomu glukozy we krwi podczas głodu. W wyjątkowych przypadkach zmniejszenie wydzielania kortyzolu może być spowodowane zaburzeniami genetycznymi w szlaku biosyntezy steroidów. Najczęściej dotyczy ono enzymu 21-hydroksylazy steroidowej. Przy jego niedoborze następuje m.in. obniżenie wytwarzania kortyzolu, co prowadzi do nadmiernej produkcji ACTH wskutek braku ujemnego sprzężenia zwrotnego, a w efekcie tego do maskulinizacji zewnętrznych narządów płciowych płodów żeńskich lub w przypadku nastolatek - hirsutyzmu lub zaburzeń cyklu menstruacyjnego.

Podwyższony poziom kortyzolu, określany mianem syndromu Cushinga, może być spowodowany schorzeniami podwzgórza, przysadki lub kory nadnerczy, jednakże najczęstszą przyczyną jego wystąpienia jest nadmierne stosowanie egzogennych glikokortykosteroidów. Podwyższone stężenie kortyzolu prowadzi do zmian w rozmieszczeniu tkanki tłuszczowej. Gromadzi się ona przede wszystkim w okolicach twarzy i karku, natomiast jej ilość zmniejsza się w kończynach. Następuje również zanik mięśni szkieletowych i znaczne spowolnienie procesów regeneracyjnych. Dodatkowo nadmierne wydzielanie kortyzolu może przyczynić się do wystąpienia cukrzycy, nadciśnienia oraz zaburzać pracę gonad (2).

1.3. Kortyzol a depresja

Depresja to jedna z najczęściej występujących chorób na świecie. Przyjmuje się, iż dotknięte jest nią nawet 15% populacji. Jest to choroba złożona, wieloczynnikowa, której etiologia nie jest do końca znana. Depresja najczęściej objawia się m.in. obniżeniem nastroju i napędu psychoruchowego. Dodatkowo mogą jej towarzyszyć zaburzenia rytmu okołodobowego, do których należą zaburzenia snu. Ponadto może pojawić się lęk, ból, wahania masy ciała i inne objawy somatyczne. Pacjenci często miewają myśli suicydalne, poczucie winy oraz odznaczają się utratą zainteresowań. Depresja może również towarzyszyć innym schorzeniom, m.in. chorobom układu krążenia, nowotworowym, zaburzeniom hormonalnym, infekcjom wirusowym, czy niedoborom witamin.

Znanych jest kilka hipotez dotyczących etiologii depresji, które powstały w wyniku obserwacji mechanizmów działania substancji stosowanych podczas leczenia choroby. Najwcześniejszą z nich jest teoria monoaminergiczna, która została sformułowana na podstawie mechanizmu działania dwóch historycznie pierwszych leków przeciwdepresyjnych grupy trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych (TLPD) - imipraminy i iproniazydu. Zaobserwowano, iż podczas stosowania tych leków dochodzi do zmian adaptacyjnych w gęstości oraz reaktywności receptorów adrenergicznych, serotoninowych i dopaminergicznych. Również większość leków stosowanych współcześnie w leczeniu depresji wykazuje wpływ na określone neuroprzekazniki (3).

Coraz większą rolę w patogenezie depresji przypisuje się także innym czynnikom, takim jak czynniki genetyczne czy zaburzenia regulacji aktywności układu odpornościowego. W przypadku zmian w działaniu układu immunologicznego, obserwuje się podwyższoną sekrecję niektórych cytokin prozapalnych oraz białek, które najczęściej towarzyszą ostrej fazie stanu zapalnego. Zaburzeniom układu odpornościowego towarzyszy najczęściej zwiększona aktywność osi podwzgórze – przysadka - nadnercza (*hypothalamic – pituitary – adrenocortical*, HPA), objawiająca się podwyższonym stężeniem CRH, a w konsekwencji również kortyzolu (4).

Liczne badania potwierdziły istotny wpływ podwyższonego poziomu kortyzolu w patogenezie depresji. Stwierdzono, iż zwiększone wydzielanie tego hormonu wynika z osłabienia mechanizmu hamującego sprzężenie zwrotne. Ponadto długotrwały wpływ kortyzolu na struktury mózgowe może prowadzić do niedoboru serotoniny (5-HT), w wyniku zmniejszenia dostępności tryptofanu będącego substratem do produkcji 5-HT. Ulega również

obniżeniu gęstość oraz reaktywność receptorów serotoniny. Badania wykazały także, iż podwyższony poziom kortyzolu towarzyszący stresowi, może powodować zmiany o charakterze neurodegeneracyjnym w niektórych strukturach mózgu, przede wszystkim w hipokampie. Ponadto występują również zaburzenia plastyczności neuronalnej (3). Przypuszcza się, iż stosowane leki przeciwdepresyjne wpływają nie tylko na neuroprzekazniki, ale również normalizują aktywność osi HPA, obniżając stężenie CRH, a w konsekwencji również ACTH oraz kortyzolu.

1.4. Wpływ leków przeciwdepresyjnych na wydzielanie kortyzolu

Leki przeciwdepresyjne należą do grupy substancji psychotropowych, działających na ośrodkowy układ nerwowy. Charakteryzują się dużym zróżnicowaniem zarówno pod względem budowy chemicznej, jak i mechanizmu działania. Najstarszą grupą wśród nich są trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne (TLPD), do których należą m.in. amitrypylina i klomipramina. Działają one niewybiórczo na większość receptorów ośrodkowego układu nerwowego, m.in. na receptory adrenergiczne, cholinergiczne, dopaminergiczne czy histaminowe. Ze względu na małą selektywność wykazują liczne działania niepożądane.

Podział pozostałych leków przeciwdepresyjnych opracowano na podstawie ich mechanizmu działania. Wykazują one selektywne oddziaływanie na określone receptory, w związku z tym wyróżnia się:

- selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI, *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*),
- selektywne inhibitory wtórnego wychwytu noradrenaliny (NaRI, *Noradrenalin Reuptake Inhibitors*),
- leki wpływające równie silnie na wtórny wychwyt serotoniny i noradrenaliny (SNRI, *Serotonin - Noradrenalin Reuptake Inhibitors*),
- selektywne, odwracalne inhibitory MAO-A (RIMA, *Reversible Inhibitors of Monoaminoxidase A*),
- leki blokujące w równym stopniu receptory serotonergiczne i noradrenergiczne (SSA, *Specific Serotonin Antidepressants*),
- leki silniej blokujące receptor noradrenergiczny niż serotonergiczny (NaSSA, *Noradrenergic and Selective Serotonergic Antidepressants*),

- inhibitory wychwyty serotoniny i antagoniści receptora serotoninowego 5-HT₂ (SARI, *Serotonin Antagonist and Reuptake Inhibitors*),
- leki zwiększające wychwyt zwrotny serotoniny (SSRE, *Selective Serotonin Reuptake Enhancers*) (3, 62).

Ze względu na złożony mechanizm działania, leki przeciwdepresyjne w różny sposób wpływają na poziom kortyzolu, zarówno podwyższając go, jak i obniżając. Stabilizujący wpływ leków przeciwdepresyjnych na oś HPA może wynikać z bezpośredniego działania na receptory CRH, co powoduje hamowanie wydzielania kortykoliberyny, a w konsekwencji obniżenie wydzielania ACTH i kortyzolu. Niektóre z nich, jak np.: TPLP wpływają na biosyntezę receptorów GR poprzez podnoszenie stężenia mRNA GR. W ten sposób pobudzają osłabiony w trakcie depresji mechanizm hamującego sprzężenia zwrotnego. Jednak wiele leków przeciwdepresyjnych, jak np. moklobemid (RIMA) czy trazodon (SARI), nie ma dobrze udokumentowanego wpływu na działanie osi HPA.

Zróznicowanie wpływu tych leków na poziom kortyzolu dotyczy również ochotników biorących udział w badaniu. Wielokrotnie podkreślano, iż niektóre leki przeciwdepresyjne mogą podwyższać poziom kortyzolu u zdrowych ochotników (np. citalopram), natomiast u chorych na depresję znacznie go obniżać.

W celu uwydatnienia ich działania na oś HPA stosuje się zwykle oznaczanie poziomu kortyzolu poprzedzone testem z użyciem egzogennych kortykosteroidów. Najczęściej podawany jest doustnie deksametazon, który silnie hamuje wydzielanie endogennej kortykoliberyny. Wykorzystywany jest w celu określenia występowania nadczynności tarczycy lub kory nadnerczy. Zahamowanie wydzielania CRH prowadzi do obniżenia poziomu ACTH, a rezultacie również kortyzolu. Znalazł on zastosowanie podczas diagnozowania zespołu Cushinga oraz depresji.

Możliwe jest również zastosowanie modyfikowanego testu DEX/CRH, podczas którego po kilku godzinach od podania deksametazonu (DEX) doustnie i pobraniu próbek do analizy, aplikuje się podskórnie ludzką kortykoliberynę w celu stymulacji wydzielania ACTH, a w konsekwencji kortyzolu. Test ten jest stosowany podczas diagnozowania depresji (1).

Prawidłowa praca kory nadnerczy może być również potwierdzona testem z użyciem egzogennego ACTH, podawanego dożylnie lub domięśniowo. Test ten stosuje się w celu stwierdzenia występowania hypoadrenalizmu. W przypadku osób zdrowych po podaniu hormonu następuje szybki wzrost poziomu kortyzolu, natomiast u chorych z uszkodzoną korą nadnerczy podwyższenie nie jest obserwowane (2).

Często podczas określania wpływu leków przeciwdepresyjnych na wydzielanie kortyzolu stosuje się również specyficzne substancje, które bezpośrednio działają na określone receptory. Pozwala to na wykluczenie lub potwierdzenie wpływu badanych leków na oś HPA poprzez te receptory.

1.4.1. TLPD a wydzielanie kortyzolu

Do najczęściej stosowanych trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych (TLPD) należą amitryptylina i klomipramina. Jak już wspomniano, ich wpływ na wydzielanie kortyzolu związany jest ze zwiększeniem biosyntezy receptorów glukokortykosteroidowych typu II.

Badania potwierdzające taki właśnie mechanizm działania wykonali Okugawa i wsp. (5) na zwierzęcych kulturach komórkowych. Określając wpływ krótko i długotrwałej ekspozycji komórek hipokampa na niektóre leki z grupy TLPD (amitryptylinę, desipraminę) oraz inne leki przeciwdepresyjne o odmiennym mechanizmie działania wykazali, iż po czternastodniowej ekspozycji na działanie amitryptyliny poziom mRNA GR wzrósł o 108%. W rezultacie spowodowało to zwiększenie się liczby receptorów GR o 60%. W przypadku desipraminy wzrost był bardziej znaczący. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż w każdym z badanych przypadków, zarówno po krótko- jak i długotrwałej ekspozycji następował wzrost liczby receptorów. Natomiast wpływ ten był zróżnicowany w zależności od stosowanej grupy leków przeciwdepresyjnych.

Zmiany aktywności osi HPA u osób cierpiących z powodu depresji obserwowali Rota i wsp. (6). Autorzy badali zmiany poziomu kortyzolu we krwi zachodzące podczas stosowania amitryptyliny oraz fluwoksaminy oznaczając stężenie hormonu w pierwszym, czternastym i czterdziestym drugim dniu terapii. Każdego z pacjentów poddano terapii obydwoima lekami. Zaobserwowano, iż rytm dobowy wydzielania kortyzolu został rozregulowany u większości probantów. Stwierdzono, iż po czternastym dniu leczenia następowała poprawa stanu pacjenta. Ponadto stężenie kortyzolu ulegało obniżeniu, tak, iż po okresie czterdziestu dwóch dni jego poziom był zbliżony do poziomu u osób zdrowych. Badania te potwierdziły tezę, iż zarówno leki z grupy TLPD, jak i SSRI obniżają poziom kortyzolu u osób chorych na depresję.

Podobnie, wpływ leków z grupy TLPD oraz SSRI na poziom kortyzolu u osób z depresją badali Weber-Hamann i wsp. (7). Oznaczyli stężenie hormonu w ślinie w trakcie pierwszego i

piątego tygodnia terapii amitryptyliną i paroksetyną oraz określili zależność pomiędzy stężeniem kortyzolu a opornością insulinową. W efekcie przeprowadzonych badań stwierdzono, iż poziom kortyzolu w trzydziestym piątym dniu terapii uległ obniżeniu tylko u pacjentów leczonych amitryptyliną, podczas gdy u pacjentów stosujących paroksetynę, jego stężenie pozostało bez zmian. Ponadto wykazano częsty spadek insulinooporności u pacjentów, u których nastąpiła normalizacja funkcji osi HPA.

Aihara i wsp. (8) określili, który z regionów mózgu jest powiązany z dysfunkcją osi HPA. Badaniom poddano pacjentów z depresją nieleczonych farmakologicznie oraz probantów po dwudniowej terapii lekami z grupy TLPD (amitryptylina), SSRI (fluwoksamina) oraz SSA (mianseryna). W celu kontroli funkcji mózgu zastosowano metodę emisji pozytronowej. Oznaczono również poziom kortyzolu oraz ACTH we krwi przed i po farmakoterapii poprzedzając pomiar użyciem testu DEX/CRH. Wykazano, iż w przypadku osób chorych na depresję następują zmiany metaboliczne w mózgu, w szczególności w korze przedczołowej, obszarze limbicznym i paralimbicznym. Po udanej terapii prawie wszystkie anomalie ustąpiły, z wyjątkiem tych w korze przedczołowej. Zaobserwowano również, iż poziom obu oznaczanych hormonów uległ znacznemu obniżeniu, niezależnie od zastosowanej terapii.

Wpływ farmakoterapii na poziom kortyzolu oraz ACTH u pacjentów chorych na depresję wykazujących oporność lekową, badali Künzel i wsp. (9). Porównali terapię trimipraminą (należącą do grupy TLPD) z wynikami leczenia amitryptyliną (TLPD) w połączeniu z haloperidolem, pochodną butyrofenonu, lekiem należącym do neuroleptyków. Określono poziom kortyzolu we krwi w pierwszym i czterdziestym drugim dniu terapii poprzedzając oznaczenie zastosowaniem testu DEX/CRH. Zaobserwowano, iż siła odpowiedzi hormonalnej ulegała obniżeniu, w wyniku czego stężenie kortyzolu zmniejszyło się. Jednakże czas, po którym to nastąpiło nie zależał od zastosowanej terapii. Ponadto stwierdzono ścisłą zależność pomiędzy obniżeniem poziomu kortyzolu a poprawą stanu pacjenta.

Wpływem kolejnego leku przeciwdepresyjnego, należącego również do TLPD, na wydzielanie kortyzolu zajmowali się Sargent i wsp. (10). Autorzy badali zmiany poziomu hormonu pod wpływem prekursora serotoniny, 5-hydroksytryptofanu, przed oraz po ośmiotygodniowej terapii klomipraminą pacjentów z depresją. Zastosowanie 5-HTP powoduje podwyższenie poziomu ACTH we krwi, a w dalszej konsekwencji również kortyzolu w wyniku aktywacji postsynaptycznych receptorów serotoninowych. Podobny, tak znaczny wzrost wydzielania kortyzolu obserwowano u pacjentów z depresją przyjmujących

leki z grupy SSRI. Stwierdzono, iż po przeprowadzonej terapii i ponownej stymulacji receptorów 5-HT prekursorem serotoniny, poziom hormonu uległ znacznemu podwyższeniu pomimo, że stosowany lek należy do TLPD. Wykazuje on jednak silny wpływ na wtórny wychwytywanie serotoniny, co świadczy o modyfikacji receptorów serotoninowych podczas stosowania klomipraminy.

Wpływ farmakoterapii klomipraminą na wydzielanie kortyzolu u mężczyzn z depresją oraz odpowiedź kory nadnerczy na terapię seria elektrowstrząsów badali Markianos i wsp. (11). Badania te potwierdziły, iż klomipramina modyfikuje receptory serotoninowe, powodując podwyższenie poziomu kortyzolu. Podobny wpływ na wydzielanie hormonu wywołuje również terapia elektrowstrząsami, uwrażliwiając receptory 5-HT na działanie neuroprzekaźnika.

W celu potwierdzenia wpływu klomipraminy na receptory serotoninowe, Porter i wsp. (12) badali poziom kortyzolu po terapii tym lekiem. Wyniki porównali z otrzymanymi po farmakoterapii desipraminą, lekiem również należącym do TLPD. Dodatkowo przed oznaczeniem poziomu kortyzolu podano fenfluraminę, substancję należącą do środków psychostymulujących, zwiększających uwalnianie m.in. serotoniny, która poprzez oddziaływanie na postsynaptyczne receptory 5-HT wywołuje wzrost poziomu ACTH, a w konsekwencji również kortyzolu. Jednakże przeprowadzone badania nie potwierdziły wcześniejszych doniesień o podwyższonym poziomie hormonu, co mogło być spowodowane faktem, iż w badaniu wzięli udział pacjenci cierpiący na depresję lekooporną.

Wśród często obserwowanych objawów depresji, obok obniżonego nastroju pojawiają się również zaburzenia snu. Kundermann i wsp. (13) badali wpływ przerywania snu na poziom kortyzolu u pacjentów z depresją. W celu stymulacji wydzielania hormonu, zastosowano dożylnie niewielką dawkę klomipraminy, podając ją przed oraz po zakończeniu eksperymentu. Stwierdzono, iż u pacjentów, u których nie stosowano przerywania snu, poziom kortyzolu uległ obniżeniu. Ponadto po zastosowaniu stymulacji klomipraminą zaobserwowano znaczne jego podwyższenie. Przeprowadzone badania świadczą o istotnym wpływie leczenia zaburzeń snu na poprawę funkcjonowania układu serotonergicznego.

1.4.2. SSRI a wydzielanie kortyzolu

Selektywne inhibitory wychwytywania zwrotnego serotoniny w odmienny sposób wpływają na poziom kortyzolu u osób zdrowych i chorych. Dlatego też prowadzone są liczne badania

mające na celu ustalenie mechanizmu ich oddziaływania na receptory 5-HT oraz aktywność osi HPA, w zależności od stanu zdrowia ochotników.

Wpływ wielkości dawki citalopramu na poziom kortyzolu u zdrowych ochotników badali Attenburrow i wsp. (14). Lek w dawce 5 i 10 mg podawano trzykrotnie, w postaci półgodzinnej infuzji, oznaczając poziom kortyzolu we krwi po 150 min od zakończenia aplikacji leku. Potwierdzono, iż citalopram u zdrowych ochotników powoduje zwiększone wydzielanie hormonu, a wzrost jego stężenia ściśle zależy od zastosowanej dawki. Wykazano jednak, że odpowiedź endokrynologiczna na działanie citalopramu jest spowodowana wpływem leku na kilka podtypów receptorów 5-HT, a nie jak wcześniej sądzono tylko na receptor 5-HT_{2A}.

Wpływ citalopramu na poziom kortyzolu u zdrowych ochotników badali również Harmer i wsp. (15). Celem eksperymentu było określenie, jaki wpływ na poziom hormonu wywiera sześciodniowa aplikacja 20 mg citalopramu lub 8 mg reboksetyny (NaRI). Poziom kortyzolu oznaczano w ślinie po zakończeniu aplikacji leku, pobierając pierwszą próbkę zaraz po przebudzeniu, następne zaś po kilku godzinach, w tym samym dniu. Stwierdzono, iż badane leki wykazują odmienny wpływ na aktywność osi HPA i stężenie kortyzolu zaraz po przebudzeniu. Reboksetyna nie wpływa na poziom hormonu, natomiast citalopram znacząco zwiększył jego wydzielanie. Wykazano ponadto, że oba leki działające na wychwyty dwóch różnych neuroprzekaźników mogą odmiennie wpływać na aktywność osi HPA i wydzielanie kortyzolu u zdrowych ochotników.

Aktywność układu serotonergicznego ulega zmianie nie tylko w przypadku depresji, ale również w zaburzeniach łaknienia. Dlatego też leki przeciwdepresyjne wpływające na ten układ są stosowane w celu sprawdzenia prawidłowej funkcji układu 5-HT. Badania w tym kierunku prowadzili Mondelli i wsp. (16), którzy określili zmiany poziomu kortyzolu, prolaktyny i ACTH u kobiet ze stwierdzoną anoreksją oraz zdrowych ochotniczek, wywołane podaniem citalopramu w postaci infuzji. Stwierdzono, iż poziom ACTH i prolaktyny podczas aplikacji leku uległ podwyższeniu zarówno u zdrowych ochotniczek, jak i kobiet z anoreksją. Jednakże stężenie kortyzolu w trakcie infuzji u anorektyczek nie uległo zmianie. Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, iż citalopram wykazuje odmienny wpływ na poziom kortyzolu u zdrowych kobiet i chorych na anoreksję, co może świadczyć o osłabieniu aktywności osi HPA u chorych na anoreksję.

Wpływ citalopramu oraz sertraliny, leków należących do SSRI na poziom kortyzolu, analizowali Tucker i wsp. (17). W badaniu wzięły udział osoby zdrowe oraz cierpiące na stres

pourazowy, u których mierzono m.in. poziom kortyzolu w ślinie, przed przystąpieniem do eksperymentu oraz po jego zakończeniu. Stwierdzono, iż u osób chorych przyjmujących citalopram poziom kortyzolu po ukończonej terapii obniżył się tak, iż jego wartości odpowiadały wynikom otrzymanym w grupie kontrolnej. Jednakże sertralina, mimo iż należy do tej samej grupy leków spowodowała podwyższenie stężenia hormonu. Ponadto stwierdzono, że w obu przypadkach terapii, zarówno sertralina, jak i citalopramem nie wykryto zależności pomiędzy poziomem wydzielanego kortyzolu a samopoczuciem chorych.

Wielokrotnie podczas eksperymentów obserwowano odmienny wpływ citalopramu oraz jego aktywnego enancjomeru S-citalopramu (escitalopramu) na wydzielanie kortyzolu u osób zdrowych i cierpiących na depresję. Dlatego też prowadzi się liczne badania potwierdzające normalizujący wpływ citalopramu na oś HPA u osób z depresją. Jedno z takich doświadczeń prowadzili Nikish i wsp. (18), którzy analizowali wpływ tego leku na wydzielanie kortyzolu oraz ACTH. Badanie odpowiedzi hormonalnej poprzedzono zastosowaniem testu DEX/CRH. Dodatkowo, oprócz oznaczenia stężenia obu hormonów, określono poziom citalopramu we krwi oraz płynie mózgowo - rdzeniowym. Badania potwierdziły, iż citalopram obniża poziom oznaczanych hormonów. Ponadto obniżone wydzielanie kortyzolu jest ściśle uzależnione od stężenia citalopramu we krwi oraz płynie mózgowo-rdzeniowym. Dlatego też uzasadnione jest określenie jego normalizującego wpływu na działanie osi HPA na podstawie stężenia substancji w materiale biologicznym, a nie wyłącznie na podstawie zastosowanej dawki.

Podobne wyniki otrzymali Navinés i wsp. (19), którzy analizowali wpływ citalopramu na wydzielanie ACTH, kortyzolu oraz prolaktyny. Badania przeprowadzono na chorych obu płci z depresją, których poddano terapii citalopramem. Poziom hormonów oznaczano we krwi, a przed jej pobraniem pacjenci otrzymywali buspiron, lek z grupy częściowych agonistów receptorów serotoninowych 5-HT_{1A}. Jego zastosowanie umożliwiło obserwację zmian adaptacyjnych (desensytyzacja receptorów), jakie nastąpiły po terapii citalopramem. Przeprowadzone badania potwierdziły, iż zastosowany lek przeciwdepresyjny wpływa na normalizację pracy osi HPA poprzez wpływ na układ serotoninowy. Nastąpiło znaczne obniżenie poziomu kortyzolu i ACTH we krwi, natomiast stężenie prolaktyny uległo zwiększeniu. Ponadto wykryto ścisłą zależność pomiędzy efektem terapeutycznym citalopramu a obniżonym wydzielaniem hormonów.

Również Papakostas i wsp. (20) zastosowali buspiron w celu określenia wpływu s-citalopramu na liczbę i wrażliwość receptorów serotoninowych 5-HT_{1A}. W badaniach wzięły udział osoby cierpiące na depresję, które poddano ośmiotygodniowej terapii lekiem (SSRI).

Oddziaływanie escitalopramu na receptory określono oznaczając poziom kortyzolu w ślinie. W wyniku przeprowadzonych badań nie wykryto wpływu escitalopramu na stężenie hormonu, mimo iż zaobserwowano poprawę stanu zdrowia pacjentów. Uzyskane dane nie potwierdzają wcześniejszych doniesień, co może spowodowane niewielką grupą probantów biorących udział w badaniach (n=17).

Kolejnym lekiem z grupy SSRI, którego wpływ na poziom kortyzolu badano, jest paroksetyna. Strachan i wsp. (21) określili zmianę stężenia kortyzolu oraz prolaktyny pod wpływem wysiłku fizycznego, który poprzedzono podaniem paroksetyny lub placebo. W badaniach uczestniczyli zdrowi ochotnicy. Stwierdzono, iż podczas wysiłku fizycznego następuje podwyższenie poziomu obu hormonów, przy czym paroksetyna nie wywiera wpływu na stężenie kortyzolu u osób zdrowych podczas wykonywania ćwiczeń fizycznych.

1.4.3. SNRI a wydzielanie kortyzolu

Wenlafaksyna należy do leków wpływających na wtórny wychwyty zarówno serotoniny, jak i noradrenaliny. Niższe dawki leku działają przede wszystkim na receptory serotoninowe, natomiast wyższe działają zarówno na receptory 5-HT jak i noradrenergiczne. Wpływ wenlafaksyny na oś HPA wynika z oddziaływania na receptory serotoninowe. Badania potwierdzające tę teorię przeprowadzili m.in. Daffner-Bugia i wsp. (22), oznaczając poziom kortyzolu we krwi zdrowych mężczyzn, w zależności od podanej dawki leku. Stwierdzono, iż wenlafaksyna zwiększa wydzielanie hormonu, a wzrost był tym bardziej znaczący, im wyższa była dawka leku.

Wpływ wenlafaksyny na poziom kortyzolu u osób zdrowych badali Hallam i wsp. (23), oznaczając w ślinie stężenie hormonu w nocy, co pół godziny. Stwierdzono, iż badany lek zwiększa wydzielanie kortyzolu, lecz tylko w początkowym okresie pomiaru. Następnie poziom hormonu ulega znacznemu obniżeniu do wartości referencyjnych.

Wenlafaksyna, podobnie jak leki z grupy SSRI, wykazuje odmienny wpływ na wydzielanie kortyzolu w zależności od stanu zdrowia ochotników. Araya i wsp. (24) zajmowali się wpływem wenlafaksyny na oś HPA u osób z depresją, które zostały poddane sześciotygodniowej terapii. W trakcie jej trwania porównywano stan zdrowia pacjentów z wynikami badań endokrynologicznych. Wykazano, iż czasookres trwania terapii pozwolił na zmniejszenie objawów depresji do około 25% stanu wyjściowego u wszystkich badanych, czego odzwierciedleniem było ustabilizowanie się rytmu dobowego wydzielania kortyzolu i

znaczne zmniejszenie jego wydzielania. Stężenie hormonu odpowiadało poziomowi, który występuje u osób zdrowych. Jednakże stwierdzono, iż poziom hormonu nadrzędnego (ACTH) zależy od szybkości ustępowania objawów depresji. W przypadku osób dużej chorujących, stężenie ACTH było nadal podwyższone. Świadczy to o tym, że kliniczna odpowiedź na działanie wenlafaksyny jest ściśle uzależniona od parametrów endokrynologicznych pacjenta.

Wyższy poziom kortyzolu towarzyszący depresji może być również spowodowany obniżeniem aktywności enzymów odpowiedzialnych za rozkład hormonu. Do takich wniosków doszli Römer i wsp. (25), po przeprowadzeniu badań nad metabolizmem kortyzolu, oznaczając hormon oraz produkty jego przemiany. Określono, iż poziom dwóch enzymów, 5α -reduktazy oraz 11β -hydroksysteroidowej dehydrogenazy typu 2, uległ obniżeniu, co manifestowało się znaczącym obniżeniem stężenia produktów ich reakcji enzymatycznych. Stan ten uległ zmianie podczas trwania terapii wenlafaksyną lub mirtazapiną (NaSSA). W obu przypadkach po dwudziestoosmiodniowej terapii aktywność enzymów wróciła do normy, tak, iż odpowiadała aktywności u osób zdrowych.

1.4.4. SSA a wydzielanie kortyzolu

Mianseryna jest jedynym lekiem z grupy SSA stosowanym w Polsce. Jej działanie przeciwdepresyjne wynika z blokowania receptorów adrenergicznych oraz serotoninowych, powodując wzrost wydzielania zarówno serotoniny, jak i noradrenaliny. Wpływ mianseryny na wydzielanie kortyzolu u osób z depresją nie jest dobrze poznany. Badania, które prowadzono nie dotyczyły bezpośrednio jej wpływu na pracę osi HPA, a jedynie działań ubocznych (26).

Nieliczne eksperymenty, podczas których określono wpływ m.in. mianseryny na wydzielanie kortyzolu prowadzili Ostroumova i wsp. (27). Oznaczano wówczas poziom kortyzolu we krwi 220 pacjentów poddanych terapii dziesięcioma lekami psychotropowymi. Badanie poziomu hormonu poprzedzono wykonaniem testu DEX. Stwierdzono, iż mianseryna normalizując pracę osi HPA, co jest związane z mechanizmem jej działania.

Wpływ terapii łączonej, mianseryną i biperidonem (cholinolitykiem, stosowanym w parkinsonizmie, hamującym receptory muskarynowe M1), na stan zdrowia pacjentów z depresją określili Fritze i wsp. (28). Farmakoterapię podzielono na dwie części. Podczas pierwszej z nich stosowanym lekiem była tylko mianseryna. W drugiej części do terapii włączono biperidon lub placebo. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, iż

kortyzol oznaczony we krwi podczas terapii łączonej mianseryną z biperidonem był wyższy w porównaniu z jego poziom określonym po podaniu mianseryny i placebo. Potwierdza to fakt, iż ten lek przeciwdepresyjny działa normalizująco na oś HPA.

Zastosowanie mianseryny nie ogranicza się tylko do depresji. Podawana jest również podczas leczenia zaburzeń żołądkowo-jelitowych na tle nerwicowym. Terapii tym lekiem poddano osoby cierpiące na zespół jelita drażliwego lub dyspepsję, u których następnie określono poziom kortyzolu oraz prolaktyny (29). Dodatkowo w celu zwiększenia odpowiedzi wydzielania tych hormonów, przed badaniem podano fenfluraminę (substancję psychostymulującą, stosowaną w leczeniu otyłości, powodującą wzrost stężenia serotoniny w mózgu). Stwierdzono, iż mianseryna po siedmiodniowej terapii znacznie zmniejszyła odczucie bólu oraz dysfunkcji związanych z przebiegiem chorób gastrycznych. Zaobserwowano również, że podanie fenfluraminy w trakcie farmakoterapii znacznie podwyższyło stężenie kortyzolu i prolaktyny we krwi w stosunku do osób, u którym zaaplikowano placebo.

1.4.5. NaSSA a wydzielanie kortyzolu

Mirtazapina, podobnie jak wspomniana już mianseryna, działa przeciwdepresyjnie poprzez receptory adrenergiczne oraz serotoninowe. Blokują one jednak silniej receptory adrenergiczne niż 5-HT, wywołując wzrost stężenia zarówno noradrenaliny jak i serotoniny.

Lek ten stosowany u osób zdrowych hamuje działanie osi HPA i zmniejsza wydzielanie kortyzolu. U chorych z depresją mirtazapina w początkowym okresie terapii również wywołuje obniżenie poziomu ACTH oraz kortyzolu. Jednakże po dłuższym czasie stosowania poziom hormonów ulega nieznacznemu podwyższeniu. Obserwacje takie zostały dokonane przez Schüle i wsp. (30), prowadzących badania nad wpływem mirtazapiny oraz reboksetyny (NaRI) na wydzielanie kortyzolu podczas kilkutygodniowej terapii. Pomiar stężenia hormonu poprzedzono wykonaniem testu DEX/CRH. Zaobserwowano, iż mirtazapina obniżyła poziom hormonów już po pierwszym tygodniu terapii, by ponownie nieznacznie podnieść go po około piątym tygodniu. Reboksetyna natomiast obniżała stężenie wydzielanego kortyzolu wolniej, ale systematycznie, tak, iż dopiero w piątym tygodniu terapii poziom hormonu odpowiadał wartości u osób zdrowych.

Do podobnych wniosków doszli Horstmann i wsp. (31), którzy zajmowali się wpływem mirtazapiny na wydzielanie kortyzolu i ACTH. Podczas eksperymentu określono stężenie

hormonów we krwi, a badanie poprzedzono testem DEX/CRH. Pacjenci po przeprowadzonej kuracji prawidłowo zareagowali na zastosowany test i po podaniu CRH nastąpił wzrost poziomu kortyzolu, podobnie jak u grupy kontrolnej. Podwyższenie poziomu hormonu było tym większe, im dłużej trwała terapia, tak, iż po siedmiu dniach wyniki testu DEX/CRH były identyczne z otrzymanymi u osób zdrowych. Poczynione obserwacje były szczególnie widoczne u kobiet.

Bezpośredni wpływ mirtazapiny na poziom kortyzolu oraz DHEA u osób z depresją badali Schüle i wsp. (32). Pacjentów poddano pięcioletniej terapii, podczas której raz w tygodniu oznaczano w ich krwi stężenie obu hormonów. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, iż terapia mirtazapiną obniżyła poziom zarówno kortyzolu, jak i DHEA. Ponadto występowała ścisła relacja pomiędzy poziomem obu hormonów.

Porównanie wpływu mirtazapiny i wenlafaksyny na poziom kortyzolu u osób z depresją przeprowadzili Scharnholz i wsp. (33). Oznaczyli stężenie hormonu w ślinie na tydzień przed rozpoczęciem terapii, a następnie raz w każdym tygodniu jej trwania. Ponadto w celu określenia zmian poziomu hormonu w ciągu dnia, badania prowadzono rano oraz wieczorem. Stwierdzono, iż mirtazapina obniża poziom kortyzolu zarówno oznaczanego rano, jak i po południu. Jednakże stężenie hormonu oznaczane po południu zmniejszało się w każdym tygodniu, natomiast poranne tylko do trzeciego tygodnia terapii. W przypadku wenlafaksyny poziom hormonu nie uległ zmianie w trakcie farmakoterapii w porównaniu z osobami zdrowymi. Jednakże po zestawieniu wyników otrzymanych od pacjentów reagujących na terapię i lekoopornych, stwierdzono, że poziom kortyzolu obniżył się w godzinach popołudniowych. Efekt przeprowadzonych badań świadczy o odmiennym wpływie mirtazapiny i wenlafaksyny na oś HPA.

1.4.6. SSRE a wydzielanie kortyzolu

Tianeptyna jest jedynym lekiem z grupy SSRE zarejestrowanym w Polsce. Jej przeciwdepresyjny mechanizm działania wynika z hamowania osi HPA, co zwiększa plastyczność neuronów. Ponadto, w przeciwieństwie do pozostałych leków przeciwdepresyjnych, zwiększa wychwyt zwrotny serotoniny.

Wpływ tianeptyny i paroksetyny (SSRI) na poziom kortyzolu, prolaktyny oraz stężenia płytkowej i surowiczej serotoniny badali Mück-Šeler i wsp. (34). Zaobserwowali, iż przed rozpoczęciem farmakoterapii chorzy na depresję wykazują podwyższone stężenie kortyzolu

oraz surowiczej 5-HT. Po czterotygodniowej terapii wybranym lekiem przeciwdepresyjnym stwierdzono, że tianeptyna tylko w nieznacznym stopniu powoduje obniżenie poziomu kortyzolu, natomiast pozostałe oznaczane związki (prolaktyna oraz stężenie płytkowej i surowiczej serotoniny) pozostały bez zmian. Ponadto były to pierwsze badania, które nie wykazały normalizującego wpływu tianeptyny na wydzielanie kortyzolu. Paroksetyna zaś znacząco obniża stężenie płytkowej serotoniny, natomiast nie wpływa na stężenie kortyzolu. Dodatkowo żaden z badanych leków nie wpływa na stężenie surowiczej 5-HT, jak również prolaktyny, co może świadczyć o tym, iż zarówno inhibicja, jak i stymulacja wychwytu serotoniny wywiera ten sam efekt na wydzielanie prolaktyny.

Badano również wpływ serotoniny na poziom kortyzolu u zdrowych ochotników, stosowano wówczas tianeptynę oraz lek z grupy SSRI, citalopram (35). Dodatkowo probantów poddano sytuacji stresowej poprzez wywołanie hipoglikemii. Potwierdzono, iż citalopram u osób zdrowych powoduje wzrost wydzielania ACTH oraz kortyzolu. Podobnie na poziom hormonów wpływa tianeptyna, mimo iż jak już wspomniano wywiera ona przeciwny wpływ na wychwyt serotoniny przez receptory w mózgu.

Terapię tianeptyną i sertralina (SSRI) zastosowali Kochetkov i wsp. (36) w celu określenia, czy odmienny wpływ tych leków na serotoninę w mózgu będzie odzwierciedlony poprzez zmianę poziomu kortyzolu w trakcie farmakoterapii. Przed przystąpieniem do eksperymentu oznaczono poziom hormonu we krwi pacjentów, a następnie określono go ponownie po zakończeniu czterotygodniowej terapii wybranym lekiem. Wyniki badań potwierdziły podwyższone stężenie kortyzolu przed rozpoczęciem leczenia. Ponadto po jego zakończeniu stwierdzono, iż oba leki obniżyły poziom hormonu, jednakże nie stwierdzono znaczących różnic.

1.5. Metody oznaczania kortyzolu

Na ogół poziom kortyzolu oznaczany jest we krwi, zarówno w osoczu jak i w surowicy, co prowadzi do oszacowania całkowitego stężenia. Możliwe jest również określenie poziomu kortyzolu w innym materiale biologicznym, jak mocz, ślina czy włosy. W takim przypadku wynik analizy ogranicza się tylko do frakcji wolnej, nie związanej z białkami. Ponadto badanie stężenia kortyzolu poprzedzone jest wspomnianymi już testami hamującymi lub aktywującymi oś HPA.

Najczęściej stosowanymi metodami analitycznymi pozwalającymi na ilościowe oznaczenie poziomu kortyzolu w organizmie są metody immunochemiczne, m.in. immunoenzymatyczne (*Enzyme-Immuno Assay*, EIA), z wykorzystaniem przeciwciał zwierzęcych oraz radioimmunologiczne (*Radio-Immuno Assay*, RIA) z użyciem przeciwciał znakowanych radioaktywnie. W metodach immunologicznych do związanego z podłożem antygeny dodawany jest materiał biologiczny. Podczas inkubacji oznaczany hormon (przeciwciało) tworzy kompleks antygen – przeciwciało. Następnie do układu dodawany jest kolejny antygen, w przypadku metody EIA może być on związany z biotyną lub znakowany fluorescencyjnie. Po zakończeniu reakcji kompleks ponownie poddawany jest inkubacji w roztworze streptowidyny związanej z enzymem, co umożliwia ilościowe oznaczenie hormonu poprzez określenie produktów rozpadu reakcji enzymatycznych. W przypadku metody RIA drugi z dodawanych antygenów jest znakowany radioaktywnym pierwiastkiem, najczęściej jodem ^{125}I . Po zakończonej reakcji następuje wytrącenie kompleksu i określenie jego radioaktywności.

Powyższe metody są czułe i pozwalają na ilościowe oznaczenie hormonu na poziomie nano, a nawet pikogramów w 1 ml materiału biologicznego. Jednakże podczas ich stosowania może dochodzić do tak zwanej reakcji krzyżowej, która polega na niespecyficznym wiązaniu hormonów steroidowych o podobnej budowie z antygenami, w wyniku czego następuje zawiązanie wyników (37).

W praktyce klinicznej do oznaczania poziomu kortyzolu wykorzystuje się również metody separacyjne. Najważniejszą rolę odgrywa wysokosprawna chromatografia cieczowa (*High Pressure Liquid Chromatography*, HPLC) w połączeniu z różnymi typami detektorów, wśród nich najczęściej stosowany jest detektor UV, a coraz większego znaczenie nabiera spektrometria mas.

1.5.1. Zalety śliny jako materiału do badań

Oznaczanie poziomu kortyzolu w organizmie jest niezwykle ważne z punktu widzenia diagnostyki medycznej. Jego analiza pomaga stwierdzić występowanie choroby lub ją wykluczyć. Przez wiele lat podstawowym materiałem do badań była krew. Jak już wspomniano pozwala ona oznaczyć poziom całkowitego kortyzolu, zarówno części związanej z białkami, jak i frakcji wolnej. Wiadomo jednak, iż tylko część niezwiązana jest formą aktywną i jako taka wywiera wpływ na funkcjonowanie organizmu. Stąd też tak liczne

badania dotyczące oznaczania poziomu kortyzolu również w innych tkankach i płynach ustrojowych.

Do niedawna największe znaczenie odgrywał mocz, który standardowo stosuje się w badaniach przesiewowych podczas diagnozowania syndromu Cushinga. Jednakże w celu oznaczenia poziomu kortyzolu w moczu, potrzebna jest jego całodobowa zbiórka. W przypadku tego materiału, jak również śliny możliwe jest oznaczenie wyłącznie stężenia formy wolnej hormonu, jednakże liczne badania dowiodły, iż wystarcza ona do postawienia prawidłowej diagnozy.

Od kilku lat w tym celu, jako materiał badawczy stosuje się również ślinę. Wielokrotnie w przytoczonych publikacjach podkreślano wysoki stopień korelacji pomiędzy zmianami stężenia kortyzolu we krwi oraz ślinie. Dowiedziono, iż ślina może stanowić dogodną alternatywę, jako materiał badawczy nie tylko dla moczu, ale również dla krwi, która jest najczęściej stosowana.

Wybór śliny jako materiału do badań ma wiele zalet. Przede wszystkim pobieranie go nie jest czynnikiem stresogennym, przez co nie wpływa na zafałszowanie wyników badania. Dodatkowo ochotnik może samodzielnie gromadzić próbki w domu, podobnie jak ma to miejsce w przypadku moczu, jednakże ilość śliny potrzebnej do oznaczenia stężenia kortyzolu jest niewielka i w tym przypadku pobór może być jednorazowy. O przewadze śliny jako alternatywnego materiału do badań diagnostycznych świadczyć może fakt, iż większość obecnie prowadzonych badań dotyczących stopnia korelacji poziomu kortyzolu we krwi i pozostałych płynach ustrojowych dotyczy właśnie śliny.

1.5.2. Metody oznaczania kortyzolu w ślinie

Oznaczanie poziomu kortyzolu w ślinie, podobnie jak we krwi, prowadzone jest najczęściej metodami immunochemicznymi, zarówno EIA jak i RIA. Techniki te wykorzystuje się szczególnie w diagnostyce medycznej, podczas badań przesiewowych schorzeń kory nadnerczy. Pozwalają one na szybki i bezstresowy pomiar stężenia hormonu, jednakże również w tym przypadku istnieje możliwość wystąpienia reakcji krzyżowej.

Z metod separacyjnych HPLC ma największe znaczenie w przypadku oznaczania kortyzolu w ślinie. Oznaczenie ilościowe hormonu musi być jednak poprzedzone ekstrakcją hormonu z materiału biologicznego oraz jego deproteinizacją. Stosowana jest zarówno ekstrakcja ciecz-ciecz (*Liquid-Liquid Extraction*, LLE), jak i nowszy typ, ekstrakcja do fazy

stałej (*Solid Phase Extraction*, SPE). Natomiast w celu odbiałczania śliny stosuje się niewielką ilość acetonitrylu lub zakwaszenie próbki, czy też jej wymrożenie i wirowanie.

Jak już wspomniano, poziom kortyzolu oznacza się najczęściej w badaniach przesiewowych schorzeń kory nadnerczy. Ostatnio jednak monitorowanie zmian stężenia kortyzolu obserwowano również w przebiegu innych chorób, niezwiązanych bezpośrednio z korą nadnerczy, ale wpływających na jego wydzielanie.

1.5.2.1. Metody nieseparacyjne

Metody nieseparacyjne należą do najczęściej stosowanych technik oznaczania poziomu kortyzolu we wszystkich materiałach biologicznych, w tym również w przypadku śliny. Jednakże w tym przypadku ze względu na bogatą matrycę biologiczną analizę poprzedza się ekstrakcją kortyzolu oraz deproteinizacją próbki.

Wśród nieseparacyjnych metod używanych do oznaczania stężenia kortyzolu w ślinie znajduje się też metoda EIA, którą zastosowali Hucklebridge i wsp. (38) do badania zmian rytmu dobowego wydzielania tego hormonu oraz DHEA, hormonu produkowanego również przez korę nadnerczy. Oznaczenia prowadzono w ślinie zdrowych ochotników, a pobór materiału do badań odbywał się zaraz po przebudzeniu probanta oraz kilkakrotnie w ciągu dnia, bezpośrednio do plastikowych probówek. Stwierdzono, iż poziom kortyzolu w porównaniu z DHEA wykazuje większe wahania dobowe. Dodatkowo potwierdzono, iż wydzielanie kortyzolu charakteryzuje się znaczną wrażliwością i jego stężenie ulega zmianie nawet w przypadku, gdy badania prowadzono w krótkim okresie czasu (dwa dni), a ochotnik nie był narażony na duży stres. W przypadku DHEA nie obserwowano tak znaczących zmian stężenia.

Metodę EIA zastosowali również Masharani i wsp. (39) do oznaczenia poziomu kortyzolu w ślinie u osób dorosłych chorych na astmę. Badano stężenie hormonu u pacjentów stosujących różne formy podania egzogennych steroidów, a następnie porównano poziom endogennego kortyzolu z wynikami otrzymanymi od osób zdrowych. Podobnie, jak poprzednio pobór materiału do badań prowadzono kilka razy dziennie. Stwierdzono występowanie znacznych różnic w poziomie kortyzolu w zależności od sposobu podania oraz dawki stosowanych leków. Jednakże pojawiły się one tylko w przypadku oznaczenia stężenia hormonu zaraz po przebudzeniu. Natomiast w próbkach, których pobór przebiegał około dwunastu godzin później nie wykazano już znaczących rozbieżności.

Kolejną nieseparacyjną metodą używaną podczas badania poziomu kortyzolu w ślinie jest technika RIA, którą zastosowali m.in. Gröschl i wsp. (40). Autorzy oznaczali rytm dobowy wydzielania kortyzolu w ślinie zdrowych dzieci, w zależności od ich wieku. Wykazali, iż tylko niemowlęta do pierwszego miesiąca życia nie wykazują zmian dobowych w wydzielaniu kortyzolu. Rytm ten kształtuje się pomiędzy pierwszym a dwunastym miesiącem życia.

Metodą RIA posłużyli się też Ouellet-Morin i wsp. (41) do badania wpływu czynników genetycznych oraz środowiskowych (m.in. młody wiek matki, jej niski poziom edukacji, problemy materialne czy wpływ nikotyny), na poziom wydzielanego kortyzolu u bliźniąt jedno- i dwujajowych. Przez pierwszy tydzień trwania eksperymentu próbki śliny pobierano zaraz po przebudzeniu w domu, w drugim tygodniu materiał do badań gromadzono po przyjeździe dzieci do laboratorium. Stwierdzono, iż na zwiększone wydzielanie kortyzolu największy wpływ wywierają czynniki środowiskowe, wówczas dodatkowo obserwowano wpływ czynników genetycznych. Było to widoczne w szczególności podczas pierwszego tygodnia badań, kiedy to próbki pobierano w domu. Duży wpływ czynników środowiskowych na poziom kortyzolu potwierdzono w drugim tygodniu badań, gdy próbki śliny pobierano tylko w laboratorium. Nie obserwowano wówczas wpływu czynników genetycznych na wydzielanie hormonu.

Bandelow i wsp. (42) posłużyli się również metodą RIA podczas oznaczania poziomu kortyzolu u osób dorosłych, cierpiących na ataki paniki. Badania prowadzono podczas trwania ataku, a następnie wyniki porównywano z danymi otrzymanymi 24 h po ustaniu objawów. Stwierdzono, iż w trakcie napadu poziom kortyzolu ulega znacznemu podwyższeniu w porównaniu z jego stężeniem po dobie od ustania ataku, co jest niezależne od samooceny pacjentów.

Poziom kortyzolu u kobiet wykorzystywanych seksualnie lub psychicznie, wśród których część cierpiała na zespół stresu pourazowego (*Post-Traumatic Stress Disorder*, PTSD) badali Elzinga i wsp. (43), stosując również metodę z użyciem przeciwciał znakowanych radioaktywnym jodem. Eksperyment obejmował porównanie stężenia kortyzolu u pacjentek z PTSD z grupą kontrolną kobiet nie wykazujących zespołu stresu pourazowego. Niektóre z ochotniczek stosowały farmakoterapię. Podczas badania kobiety przedstawiały swoje wspomnienia z dzieciństwa związane z seksualnym lub psychicznym wykorzystywaniem lub też sytuacje, w których czuły się osamotnione, które następnie były spisywane, a potem odczytywane. Ostatnim etapem badania był pomiar poziomu kortyzolu po

trzech dniach od zakończenia eksperymentu. Potwierdzono, iż osoby cierpiące na zespół stresu pourazowego wykazują podwyższoną aktywność osi HPA. Stężenie kortyzolu podczas pierwszego etapu badań w obu grupach kobiet ulegało podwyższeniu, jednak u pacjentek z PTSD był on o około 100% wyższy niż w przypadku grupy kontrolnej. Poziom kortyzolu u kobiet z PTSD ulegał również szybkiemu obniżeniu w krótkim czasie po zakończeniu pierwszego etapu badań. Należy jednak zauważyć, iż przez cały czas trwania eksperymentu poziom kortyzolu był wyższy niż u kobiet z grupy kontrolnej. Wśród kobiet stosujących farmakoterapię nie zanotowano tak dużych wahań stężenia badanego hormonu.

1.5.2.2. Metody separacyjne

Oznaczenie poziomu kortyzolu w ślinie za pomocą metod separacyjnych prowadzone jest najczęściej przy użyciu chromatografii ciekowej. Wśród detektorów stosowanych współcześnie największe znaczenie ma spektroskopia masowa (MS).

Okumara i wsp. (44) użyli wysokosprawną chromatografię ciekową do oznaczenia poziomu kortyzolu w ślinie zdrowych ochotników. Podczas deproteinizacji materiał biologiczny oczyszczono przy pomocy ekstrakcji SPE. Kolumnienki sprzężono bezpośrednio z układem chromatograficznym, co umożliwiło automatyzację procesu i znaczne skrócenie czasu trwania oznaczenia. Rozdział chromatograficzny prowadzono w układzie odwróconym, przy pomocy gradientu stężeń. Poziom kortyzolu oznaczono przy użyciu detektora fluorescencyjnego ze wzbudzeniem laserowym. Opracowana metoda analityczna pozwoliła na oznaczenie poziomu hormonu w bardzo niewielkiej, 0,1 ml objętości śliny. Granica wykrywalności kortyzolu wynosi 8 fmol, co pozwala na zastosowanie metody do rutynowych analiz.

Ekstrakcję SPE użyli także Kataoka i wsp. (45) podczas oznaczania stężenia kortyzolu w ślinie zdrowych ochotników. Rozdział chromatograficzny wykonano przy pomocy chromatografii ciekowej sprzężonej ze spektrometrem mas (LC/MS). Objętość śliny użyta do badania wynosiła 0,2 ml. W celu deproteinizacji, oprócz mikroekstrakcji próbki śliny były również ogrzewane. Opracowana metoda umożliwia wykrycie kortyzolu w ślinie w stężeniu 5 pg/ml, co pozwala na użycie jej do monitorowania zmian poziomu hormonu w sytuacji stresowej.

Chromatografię ciekową sprzężoną ze spektrometrem mas zastosowali też Jönsson i wsp. (46) w celu oznaczenia poziomu kortyzolu w ślinie zdrowych ochotników. Analizę

chromatograficzną wykonano w gradiencie po uprzednim odbiałczeniu śliny przy pomocy acetonitrylu. W celu weryfikacji wyników uzyskanych techniką LC/MS/MS, porównano je z danymi otrzymanymi podczas oznaczania poziomu kortyzolu metodą RIA. Stwierdzono, iż stężenie hormonu było ponad dwukrotnie większe w przypadku metody immunologicznej. Rozbieżności te mogą być spowodowane reakcją krzyżową z innymi hormonami sterydowymi.

Kolejną technikę separacyjną do oznaczania kortyzolu w ślinie zastosowali Tanaka i wsp. (47), którzy badali poziom kortyzolu przy pomocy mikrocząpowej elektroforezy kapilarnej z użyciem detekcji fluorescencyjnej. W celu przeprowadzenia rozdziału elektroforetycznego, do fazy ruchomej dodano mieszaniny β -cyklodekstryny i metylocelulozy. Podczas eksperymentu badano wpływ materiału, z którego został wykonany mikrocząp oraz skład fazy ruchomej. Stwierdzono, iż tworzywo, z którego wykonany jest cząp, nie wpływa w znaczący sposób na wynik analizy. Należy jednak zwrócić uwagę na odpowiednie przygotowanie próbki.

1.5.3. Zależność między poziomem kortyzolu we krwi a w pozostałych płynach ustrojowych

Oznaczenie poziomu kortyzolu we krwi pozwala na określenie jego całkowitego stężenia w organizmie. Jednakże badanie to wiąże się z wieloma niedogodnościami, przede wszystkim dla pacjenta. Pobór krwi związany jest zawsze z ryzykiem zakażenia. Dodatkowo jest to sytuacja stresogenna, a badając kortyzol, który nazywany jest hormonem stresu można otrzymać wyniki zawyżone. Dlatego też prowadzone są liczne badania mające na celu oznaczenie poziomu kortyzolu w innym materiale biologicznym oraz wyznaczenie zależności pomiędzy jego stężeniem we krwi i w innych materiałach biologicznych, zarówno u osób zdrowych, jak i cierpiących na różnego rodzaju schorzenia. Najczęściej poziom kortyzolu oznacza się w ślinie lub moczu, gdzie możliwe jest oznaczenie tylko frakcji wolnej. Stwierdzono jednak, że istnieje ścisła korelacja między zmianami poziomu kortyzolu we krwi oraz w ślinie i moczu. Jednym z ważniejszych aspektów tych prac jest sprawdzenie, w jakim stopniu możliwe jest zastąpienie krwi, jako podstawowego materiału biologicznego służącego do diagnozowania różnego typu schorzeń, innymi łatwiej dostępnymi płynami ustrojowymi, takimi jak mocz, czy ślina.

1.5.3.1. Zależność między poziomem kortyzolu we krwi i ślinie

Porównania poziomu hormonu w osoczu i ślinie u osób zdrowych z prawidłową masą ciała, u otyłych oraz chorych na anoreksję, dokonali Putignano i wsp. (48). Kortyzol oznaczano przy pomocy metody RIA. Wykazano ścisłą korelację pomiędzy zmianami stężenia kortyzolu we krwi i ślinie. Jednakże w przypadku, gdy stężenie kortyzolu przekroczyło wartości 500 nmol/l, współczynnik korelacji przyjmował mniejsze wartości. Stężenie 500 nmol/l odpowiada punktowi wysycenia białka CBG. Wyniki te potwierdzają teorię, iż w przypadku dużego wzrostu poziomu kortyzolu we krwi i związanego z nim wysyceniem białka transportującego, następuje znaczące podwyższenie poziomu wolnego kortyzolu we krwi, co skutkuje lawinowym zwiększeniem się jego poziomu w ślinie.

Zależność pomiędzy stężeniem kortyzolu w surowicy i ślinie oznaczali również Baghai i wsp. (49). Badaniami objęto pacjentów obu płci, hospitalizowanych z powodu depresji lub ze stwierdzoną chorobą afektywną dwubiegunową. Oznaczanie kortyzolu poprzedzono zastosowaniem kombinowanego testu DEX/CRH, a do ilościowego oznaczenia hormonu w ślinie użyto metody EIA z wykorzystaniem mysich przeciwciał monoklonalnych znakowanych europem. W surowicy natomiast jego poziom oznaczono przy pomocy metody RIA. Badania potwierdziły wysoką korelację pomiędzy stężeniem kortyzolu we krwi oraz ślinie, zarówno w przypadku osób, u których zastosowano deksametazon, jak również tych, którym nie był on podany. Stwierdzono także, iż farmakoterapia osób z depresją prowadzi do obniżenia wydzielania kortyzolu.

Bhagwagar i wsp. (50) wyznaczali relację pomiędzy zmianami stężenia kortyzolu w osoczu i ślinie stosując do oznaczeń metodę RIA. Określili poziom hormonu u zdrowych ochotników po podaniu dożylnym citalopramu i stwierdzili, iż podany lek powoduje podwyższenie stężenia kortyzolu zarówno we krwi jak i ślinie, a stopień jego wzrostu w obu materiałach biologicznych jest ze sobą ściśle powiązany. Badania wykazały również znaczącą, dodatnią korelację pomiędzy poziomem kortyzolu w osoczu i ślinie, co potwierdza wysoka wartość współczynnika korelacji.

Metodę RIA wykorzystał też Nadeem i wsp. (51) do oznaczania stężenia kortyzolu w ślinie i osoczu zdrowych ochotników. Badali wpływ doustnego podania citalopramu oraz escitalopramu na wydzielanie kortyzolu oraz drugiego z hormonów, prolaktyny. Badania potwierdziły występowanie ścisłej zależności pomiędzy poziomem kortyzolu we krwi oraz ślinie. W obu przypadkach pod wpływem zastosowanych leków następował wzrost wydzielania

hormonu, czego odzwierciedleniem był podwyższony poziom kortyzolu w obu analizowanych materiałach biologicznych.

Odpowiedź osi HPA na testy z użyciem deksametazonu oraz kortykotropiny określili Gozansky i wsp. (52). Celem tych badań było stwierdzenie, czy ślina może służyć jako wygodny materiał biologiczny do oznaczania kortyzolu oraz w jakim stopniu zmiany poziomu tego hormonu w ślinie odzwierciedlają wahania jego stężenia we krwi. W tym celu zdrowym ochotnikom podawano doustnie deksametazon lub dożylnie hormon kortykotropowy. W obu przypadkach poziom kortyzolu mierzono przed i po wysiłku fizycznym. Oznaczenie ilościowe hormonu we krwi wykonano metodą RIA, natomiast w ślinie techniką EIA. Stwierdzono występowanie ścisłej zależności pomiędzy zmianami stężenia kortyzolu we krwi i ślinie w każdym z przeprowadzonych testów. Badania potwierdziły tezę, iż oznaczenie kortyzolu w ślinie stanowi dogodny sposób monitorowania zmian poziomu hormonu w organizmie.

Marcus-Perlman i wsp. (53) określili natomiast relację pomiędzy poziomem kortyzolu w surowicy i ślinie trzech grup kobiet – zdrowych, ze stwierdzoną hiperestrogenemią, a także hypoadrenią. Badania miały na celu określenie wpływu niewielkich dawek egzogennej ACTH na wydzielanie kortyzolu u wyżej wymienionych grup chorych i porównanie otrzymanych wyników z tymi otrzymanymi od osób zdrowych. Analizowano ponadto, jak zmiany stężenia kortyzolu w ślinie będą odzwierciedlać zmiany tego hormonu zachodzące we krwi. Oznaczanie stężenia hormonu w ślinie wykonano przy użyciu metody radioimmunologicznej, natomiast we krwi kortyzol oznaczono metodą enzymatyczną przy użyciu przeciwciał znakowanych kolorymetrycznie. Potwierdzono występowanie zależności pomiędzy stężeniem hormonu we krwi oraz w ślinie. Wykazano, iż oznaczenie poziomu kortyzolu w ślinie może być szczególnie użyteczne w przypadku, gdy dochodzi do zaburzeń związanych poziomem białka CBG, co ma miejsce w przypadku hiperestrogenizmu. Zauważono ponadto, iż podanie dożylnie ACTH spowodowało podwyższenie poziomu kortyzolu u osób zdrowych, natomiast nie obserwowano tego zjawiska u chorych z hypoadrenią.

Wiadomo, iż poziom kortyzolu w organizmie wykazuje rytm dobowy. Ahn i wsp. (54) badali zmiany stężenia tego hormonu w zależności od pory dnia, jak również próbowali ustalić, czy poziom jego wydzielania będzie zależał od wieku ochotników. Oznaczali ponadto stężenie drugiego hormonu, DHEA. Badania przeprowadzili na zdrowych ochotnikach, u których oznaczyli metodą RIA stężenie obu hormonów w ślinie oraz w surowicy. Następnie określili zależność pomiędzy zmianami stężenia hormonów w obu materiałach biologicznych. Stwierdzili, iż wydzielanie analizowanych hormonów ulega obniżeniu około 40. roku życia, a

ponieważ poziom kortyzolu oraz DHEA w ślinie odzwierciedla zmiany ich wydzielania, dlatego też może stanowić dogodny sposób monitorowania stężenia obu związków w organizmie, jak również prawidłowej funkcji nadnerczy.

Zależność pomiędzy stężeniem kortyzolu w ślinie i surowicy badali również Restituto i wsp. (55), oznaczając poziom hormonu w różnych porach dnia, u osób z syndromem Cushinga, pseudo-Cushinga oraz chorobą Addisona. Próbę kontrolną stanowili zdrowi ochotnicy. Oznaczenia ilościowe hormonu wykonane metodą enzymatyczną EIA wykazały, iż zarówno kortyzol oznaczany we krwi, jak i w ślinie może być użyteczny do wykrywania nieprawidłowej pracy kory nadnerczy. Ponadto określili, iż pomiar hormonu w godzinach porannych pozwala jednoznacznie stwierdzić występowanie choroby Addisona, natomiast w godzinach wieczornych syndromu Cushinga. Przeprowadzone badania nie tylko potwierdziły występowanie ścisłej zależności pomiędzy wahaniami poziomu kortyzolu w obu materiałach biologicznych, ale również dostarczyły dowodu, iż oznaczanie hormonu w ślinie pozwala w dogodny sposób monitorować przebieg terapii obu schorzeń. Interesującym wydaje się fakt, iż w przypadku diagnozowania syndromu Cushinga metoda oznaczania kortyzolu w ślinie odznaczała się większą czułością, a tym samym zapewniła większą wykrywalność schorzenia.

Poll i wsp. (56) badali wpływ sposobu pobierania śliny na wynik oznaczenia kortyzolu. Próbkę materiału biologicznego pozyskiwano dwoma sposobami. Pierwszy z nich polegał na gromadzeniu śliny w wyniku żucia bawełnianych wacików (Salivette), co miało na celu zwiększenie jej produkcji. Drugi ze sposobów polegał na bezpośrednim przeniesieniu śliny z ust do probówki, bez wcześniejszej stymulacji jej wydzielania. Oba typy próbek pochodziły od zdrowych ochotników. Oznaczenie ilościowe kortyzolu w surowicy, jak również w ślinie wykonano przy pomocy metody enzymatycznej, a w efekcie przeprowadzonych badań wykazano, że nieznacznie wyższy współczynnik korelacji pomiędzy stężeniem kortyzolu w surowicy i ślinie osiągnięto w przypadku stymulacji produkcji śliny poprzez żucie bawełnianych wacików.

1.5.3.2. Zależność między poziomem kortyzolu we krwi, moczu i ślinie

Materiałem biologicznym, w którym oznaczano poziom kortyzolu, a następnie badano jego relację w stosunku do stężenia tego hormonu w osoczu, był również moc. Kartsova i wsp. (57) oznaczyli poziom kortyzolu we krwi i moczu przy użyciu elektroforezy micelarnej z detekcją UV. W ten sposób określili przydatność tej metody do oznaczania kortykosteroidów u osób z

różnymi zaburzeniami endokrynologicznymi. Oprócz kortyzolu oznaczano również kortyzon, kortykosteron i ich metabolity. W celu zwiększenia czułości metody, do fazy ruchomej dodano surfaktantu oraz zastosowano zatężanie prób. Stwierdzono, iż dopiero w tych warunkach analiza wybranych kortykosteroidów pozwala na otrzymanie zadawalających wyników, porównywalnych z uzyskanymi metodą HPLC.

Oznaczenie wolnego kortyzolu w moczu i ślinie posłużyło Yaneva i wsp. (58) do zdiagnozowania syndromu Cushinga oraz określenia relacji pomiędzy poziomem kortyzolu w ślinie i moczu u osób zdrowych oraz u chorych ze zdiagnozowanym syndromem Cushinga. Opierając się na wcześniejszych doniesieniach, określono poziom wolnego, czyli aktywnego hormonu w moczu i ślinie. Stężenie kortyzolu w obu materiałach oznaczono przy pomocy metody RIA. Stwierdzono występowanie zależności pomiędzy wyznaczonymi stężeniami kortyzolu w obu analizowanych płynach ustrojowych. Poziom kortyzolu w ślinie zmierzony około północy odzwierciedla stężenie hormonu w dobowej zbiorce moczu i pozwala na jednoznaczne zdiagnozowanie syndromu Cushinga. Potwierdza to hipotezę, iż ślina stanowi najdogodniejszy sposób szybkiego i bezbolesnego wykrywania licznych schorzeń endokrynologicznych wynikających z zaburzeń wydzielania kortyzolu.

Dla potwierdzenia zależności pomiędzy stężeniem kortyzolu w różnych materiałach biologicznych często prowadzono również badania, podczas których oznaczano stężenie hormonu we krwi, a następnie w moczu oraz ślinie. Oznaczenie takie wykonali van Cruijssen i wsp. (59), określając poziom kortyzolu oraz katecholamin u osób z chorobą Ménière'a, a następnie porównując otrzymane wyniki z uzyskanymi od osób zdrowych. Hormon oznaczano przy pomocy metody RIA. Stwierdzono, iż u osób chorych stężenie kortyzolu zarówno w osoczu, jak i ślinie było wyższe niż u osób zdrowych. Świadczy to o podwyższonej aktywności osi HPA w przebiegu schorzenia, będącej prawdopodobnie jej skutkiem, a nie przyczyną. Wniosek taki wysunięto porównując poziom kortyzolu u pacjentów różniących się istotnie czasem trwania choroby. Stężenie hormonu u osób przewlekle chorych było wyższe, niż w przypadku tych, u których schorzenie zdiagnozowano niedawno.

Porównanie poziomu kortyzolu w surowicy, ślinie oraz moczu wykonali Viardot i wsp. (60) w celu stwierdzenia występowania syndromu Cushinga. Do badań posłużyła ślina zbierana w godzinach wieczornych oraz krew pobierana rano, po supresji deksametazonem. Kortyzol oznaczono również w moczu pochodzącym z całodobowej zbiórki. Hormon w moczu oraz surowicy oznaczono przy użyciu metody enzymatycznej ELISA, natomiast w ślinie metodą RIA, stosując jako materiał odniesienia próbki otrzymane od osób zdrowych. Badania

potwierdziły hipotezę, iż ślina może być dogodnym materiałem biologicznym służącym do oznaczania poziomu kortyzolu. Stanowi ona dobrą alternatywę dla krwi i moczu podczas diagnozowania syndromu Cushinga. Aktualnie, analiza moczu jest standardową procedurą stosowaną podczas badań przesiewowych przy wykrywaniu tego schorzenia.

Podobnie Putignano i wsp. (61) zastosowali pomiar zawartości kortyzolu w ślinie podczas badań przesiewowych przy diagnozowaniu syndromu Cushinga. Następnie porównali otrzymane wyniki z poziomem tego hormonu w surowicy oraz moczu. W celu zmniejszenia wpływu stresu związanego z pobieraniem krwi na poziom kortyzolu, próbki śliny gromadzono przed pobraniem krwi. Mocz natomiast zbierano dobowo. Do ilościowego oznaczenia kortyzolu w zebranych materiałach biologicznych użyto metody RIA. Stwierdzono, iż we wszystkich analizowanych przypadkach występuje zależność pomiędzy stężeniem hormonu we krwi oraz ślinie. Zaobserwowano również wysoki stopień korelacji kortyzolu w moczu oraz w surowicy. Potwierdzono tym sposobem przydatność śliny jako materiału biologicznego użytecznego w trakcie badań przesiewowych w teście podczas diagnozowania syndromu Cushinga.

2. Cel pracy

Z przedstawionego we Wstępie przeglądu literatury wynika, iż większość leków przeciwdepresyjnych obniża poziom kortyzolu u chorych na depresję. Jednakże przytoczone badania nie dają jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, czy preparaty należące do tej samej grupy leków i posiadające ten sam mechanizm działania będą obniżały stężenie kortyzolu po tym samym okresie terapii. Opisane w literaturze wyniki badań często wzajemnie się wykluczają, wynika z nich m.in. iż ta sama substancja chemiczna w różny sposób wpływa na stężenie kortyzolu. Dotyczy to zwłaszcza leków należących do grupy SSRI.

W przytoczonej literaturze pomiar poziomu kortyzolu dokonywany był jedynie przed i po przeprowadzonej terapii. Nieliczne eksperymenty traktowały również o stężeniu hormonu oznaczanym podczas leczenia, jednakże dokonywano oznaczenia jednorazowo, w określonym dniu i nie uwzględniano przy tym cech osobniczych pacjentów oraz ich stanu zdrowia. Aktualnie dąży się do indywidualizacji terapii, dlatego też interesującym wydaje się być zbadanie, po jakim czasie od rozpoczęcia farmakoterapii nastąpi obniżenie poziomu kortyzolu u określonej pacjentki oraz czy ta sama substancja chemiczna wywoła podobną odpowiedź organizmu u kilku probantek. Należy również zadać pytanie, jak szybko po zmniejszeniu się wydzielania hormonu nastąpi poprawa stanu pacjentki i będzie ona mogła zakończyć hospitalizację. Codzienna analiza poziomu kortyzolu u osób z depresją pomoże również określić, czy stężenie hormonu ulega stabilizacji a także, czy zmiany te są trwałe.

Z dostępnej literatury wynika, iż zajmowano się wpływem niektórych preparatów należących do TLPD oraz SSRI na poziom kortyzolu, jednakże część stosowanych w Polsce leków przeciwdepresyjnych, m.in. tianeptyna, moklobemid, które są rzadziej podawane, czy trazodon, stosowany najczęściej w polipragmazji, nie ma dostatecznie udokumentowanego wpływu na wydzielanie kortyzolu zarówno u osób zdrowych, jak i cierpiących z powodu depresji. Nieliczne publikacje na ten temat nie dają jednoznacznej odpowiedzi, czy wyżej wspomniane substancje lecznicze obniżają stężenie hormonu w trakcie farmakoterapii. Biorąc powyższe pod uwagę oraz fakt, iż współzależność depresji i podwyższonego poziomu kortyzolu podczas trwania choroby jest dobrze udokumentowana, celowym wydaje się być zbadanie wpływu leków przeciwdepresyjnych na stężenie kortyzolu u osób z depresją.

Z przytoczonego przeglądu literatury wynika, iż oznaczanie kortyzolu prowadzone jest najczęściej metodami immunologicznymi. Mając jednak na uwadze niskie stężenie tego hormonu w ślinie oraz możliwość wystąpienia reakcji krzyżowej podczas stosowania reakcji

immunologicznych, a w efekcie zawyżenia wyników, za konieczne uznano opracowanie separacyjnej metody analitycznej pozwalającej oznaczyć ilościowo kortyzol w ślinie.

Biorąc powyższe pod uwagę zasadniczym celem niniejszej pracy było określenie, czy występuje zależność pomiędzy stosowanymi lekami przeciwdepresyjnymi a poziomem wydzielanego kortyzolu oznaczanego w ślinie pacjentek hospitalizowanych z powodu depresji.

Główne założenia pracy realizowano poprzez cele cząstkowe:

- wybór śliny jako najwygodniejszego materiału biologicznego do badań,
- opracowanie i walidacja metody analitycznej, pozwalającej na ilościowe oznaczenie poziomu kortyzolu w ślinie,
- wyznaczenie zależności pomiędzy stężeniem oznaczanego hormonu a wybranymi lekami przeciwdepresyjnymi należącymi do tej samej grupy,
- wyznaczenie zależności pomiędzy stężeniem oznaczanego hormonu a lekami reprezentującymi różne generacje i grupy leków przeciwdepresyjnych,
- wyznaczenie zależności pomiędzy zmianą poziomu hormonu a czasem trwania hospitalizacji,
- określenie czy częstość pobytu pacjentki w szpitalu wpływa na początkowy poziom kortyzolu w ślinie,
- stwierdzenie czy obserwowane zmiany stężenia hormonu są trwałe.

3. Część eksperymentalna

3.1. Materiał do badań

Materiał do badań stanowiły 2653. próbki śliny pobranej za zgodą Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy GUMed od 97. pacjentek Szpitala dla Nerwowo i Psychicznie Chorych w Starogardzie Gdańskim. Średni wiek probantek wyniósł 48 lat (± 10), a średni okres hospitalizacji 42 dni (± 24). W trakcie hospitalizacji pacjentki otrzymywały leki przeciwdepresyjne należące do różnych grup, takich jak: TLPD, SSRI, SNRI, SSA, NaSSA, SARI oraz RIMA. Szczegółowe zestawienie przyjmowanych leków należących do poszczególnych grup oraz liczbę pacjentek stosujących dany preparat w monoterapii oraz w terapii łączonej przedstawia Tabela 1. Materiał biologiczny gromadzono i analizowano w latach 2008 – 2010.

Pacjentkę przystępującą do badań informowano o celu eksperymentu, następnie podpisywała ona zgodę na uczestnictwo oraz upublicznienie danych otrzymanych z analizy próbek śliny. Ponadto w trakcie trwania eksperymentu pielęgniarka oddziałowa wypełniała ankietę dotyczącą typu zaburzeń depresyjnych stwierdzonych u pacjentki, wieku probantki, okresu hospitalizacja oraz jej krotności, a także informację o aktualnie podawanych lekach.

Ślinę pobierano każdego dnia podczas całego okresu pobytu pacjentki w szpitalu. Pobór materiału odbywał się o stałej porze, około godziny 10, kiedy stężenie hormonu w organizmie jest najwyższe. Próbki śliny od momentu pobrania do czasu transportu do Katedry i Zakładu Chemii Analitycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, gdzie były analizowane, przechowywano w lodówce w temp. 4°C, a po przewiezieniu ich do GUMed, zamrażano do czasu przeprowadzenia analizy. Dodatkowo niska temperatura sprzyjała usunięciu części balastu pochodzenia białkowego.

Próbę kontrolną stanowiły próbki śliny pobrane około godziny dziesiątej od zdrowych ochotniczek (n=10). Oznaczono w nich poziom kortyzolu, a następnie określono jego średnie stężenie.

Do wyznaczenia krzywej kalibracji oraz walidacji metody wykorzystano ślinę pobraną bez stymulacji, od zdrowych ochotników obu płci (n=10), około godziny dwudziestej. Próbki bezpośrednio po pobraniu do plastikowych pojemników były zamrażane.

Tabela 1. Zestawienie leków stosowanych przez badane pacjentki.

Grupa leków przeciwdepresyjnych	Substancja czynna	Liczba pacjentek	
		Monoterapia	Polipragmazja
TLPD	Amitryptylina	7	-
	Klomipramina	3	1
	Opipramol	1	-
	Doksepina	1	1
Łącznie		12	2
SSRI	Sertralina	10	4
	Citalopram	7	3
	Escitalopram	5	4
	Fluwoksamina	3	-
	Fluoksetyna	1	-
	Paroksetyna	2	-
Łącznie		28	11
SNRI	Wenlafaksyna	14	5
SSA	Mianseryna	7	5
NaSSA	Mirtazapina	1	1
SARI	Trazodon	3	8
SSRE	Tianeptyna	3	-
RIMA	Moklobemid	1	-
Inne leki psychotropowe		10	1

3.2. Aparatura

- Zestaw do HPLC firmy Knauer (Berlin, Niemcy) w skład którego wchodzi:
 - pompa Mini-Star K-500
 - detektor UV K-2500
 - integrator
 - system akwizycji danych EUROCHROM 2000
 - komputer
- Zestaw do HPLC firmy Merck Hitachi (Darmstadt, Niemcy) w skład którego wchodzi:
 - pompa L-7100
 - autosampler L-7200
 - piec L-7360
 - detektor UV/VIS La Chrom L-7420 (Tokio, Japonia)
 - integrator L-7000
 - system akwizycji danych HSM

- komputer
- Kolumna chromatograficzna C-18 z prekolumną (Nucleosil 100-5, 125 x 4 mm i.d., Knauer, Berlin, Niemcy)
- Wyrząsarka laboratoryjna (358S, Elpan, Polska)
- Wirówka laboratoryjna (MPW-250, MPW-211, MPW, Polska)
- Wirówka laboratoryjna (EBA20S, Hettich, Niemcy)
- Wirówka punktowa typu vortex (MX-S, DragonLab, Chiny)
- Łaźnia wodna termostatowana (Dittman, LW-12, Cabrolab Elektronik, Polska)
- Pipety automatyczne z wymiennymi końcówkami, probówki szklane, probówki wirówkowe polipropylenowe, kolbki miarowe o poj. 10 ml, probówki typu Eppendorf o poj. 500 µl, inserty szklane o poj. 200 µl, fiołki chromatograficzne z nakrętkami, pojemniki analityczne o poj. 25 ml do pobierania materiału biologicznego

3.3. Odczynniki

- Kortyzol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Karbamazepina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Dichlorometan cz.d.a. (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- Dichlorometan cz.d.a. (POCh, Gliwice, Polska)
- Acetonitryl do HPLC (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- Acetonitryl do HPLC (POCh, Gliwice, Polska)
- Woda redestylowana (aparat do podwójnej destylacji wody, typ 2104, GFL, Burgwedel, Niemcy)
- Woda redestylowana (aparat do podwójnej destylacji wody, Destamat, Maintal, Niemcy)

3.4. Roztwory

Roztwór podstawowy kortyzolu o stężeniu 1 mg/ml sporządzono rozpuszczając 10 mg substancji w 10 ml acetonitrylu. Roztwór przygotowano w kolbce miarowej o poj. 10 ml i przechowywano w lodówce w temp. 4°C. W celu otrzymania pożądanego stężenia roztwór podstawowy rozcieńczano acetonitrylem.

Roztwór podstawowy karbamazepiny o stężeniu 1 mg/ml sporządzono poprzez rozpuszczenie 10 mg substancji w acetonitrylu w kolbce miarowej o poj. 10 ml i przechowywano w lodówce w temp. 4°C. Roztwór podstawowy rozcieńczano acetonitrylem w kolbkach miarowych o poj. 10 ml w celu otrzymania pożądanego stężenia.

Fazę ruchomą o składzie acetonitryl : woda sporządzono poprzez zmieszanie obu rozpuszczalników w stosunku objętościowym 30 : 70. Następnie fazę odgazowano przy pomocy ultradźwięków.

3.5. Metody badań

3.5.1. Procedura analityczna

Próbki śliny po rozmrożeniu wirowano przez 5 min przy 7500 obr/min, po odwirowaniu pobierano 1 ml supernatantu i dodawano 100 µl roztworu karbamazepiny o stężeniu 1 µg/ml (wzorzec wewnętrzny). Następnie próbki mieszano przy użyciu wirówki punktowej typu vortex, dodawano 3 ml dichlorometanu i wytrząsano przez 20 min. Po tym czasie analizowane mieszaniny wirowano przez 3 min przy 5500 obr/min, po czym fazę organiczną (dichlorometanową) przenoszono do szklanych probówek. Następnie próbki odparowywano na łaźni wodnej w temp. 60°C, a suchą pozostałość rozpuszczano w 100 µl acetonitrylu. Z tak przygotowanych roztworów pobierano 60 µl, filtrowano i przenoszono do szklanych insertów, które następnie umieszczano w szklanych fiolkach chromatograficznych. Tak przygotowane próbki poddawano analizie chromatograficznej.

3.5.2. Warunki analizy chromatograficznej

Analizę chromatograficzną przeprowadzono w układzie faz odwróconych, w którym fazę ruchomą stanowił układ binarny acetonitryl : woda (30 : 70, v : v) o przepływie 1 ml/min. Objętość nastrzyku wynosiła 20 µl, a analiza chromatograficzna trwała 20 min. Detekcję przeprowadzono przy długości fali 240 nm. W opisanych warunkach czas retencji kortyzolu wyniósł 3,9 min, natomiast karbamazepiny 6,9 min.

3.5.2.1. Wyznaczanie krzywej kalibracji

W celu przygotowania 6 serii pomiarowych, próbki śliny wirowano 5 min przy 7500 obr/min, następnie pobierano po 1 ml materiału biologicznego, do wszystkich próbek, z wyjątkiem próby zerowej, dodawano 100 µl roztworu karbamazepiny (1 µg/ml, wzorzec wewnętrzny) i odpowiednią objętość roztworu kortyzolu o stężeniu 100 ng/ml, 1 µg/ml lub 10 µg/ml w celu otrzymania pożądanego stężenia (5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 ng/ml). Następnie postępowano według procedury opisanej w drugiej części punktu 3.5.1.

Przeprowadzone oznaczenia pozwoliły na wyznaczenie krzywej kalibracji dla kortyzolu w zakresie stężeń 5 – 200 ng/ml. Wartości stosunku wysokości pików analitu (H) do wysokości pików wzorca wewnętrznego (H_w) zestawiono w Tabeli 2, natomiast wykres krzywej kalibracji, sporządzonej na podstawie uśrednionych wartości stosunków H/H_w przedstawia Rys. 1.

Tabela 2. Wyniki analizy 6 serii pomiarowych krzywych kalibracji kortyzolu w ślinie w zakresie stężeń 5 – 200 ng/ml

Substancja	Kortyzol	Karbamazepina		Nr serii						Średnia	SD	CV (%)
				1	2	3	4	5	6			
Stężenie nominalne (ng/ml)	5	100	H/H_w	0,045	0,038	0,036	0,045	0,044	0,038	0,041	0,0041	10,00
	10	100		0,081	0,076	0,079	0,080	0,075	0,066	0,076	0,0055	7,24
	15	100		0,110	0,130	0,120	0,110	0,120	0,130	0,120	0,0089	7,42
	20	100		0,150	0,160	0,150	0,160	0,170	0,170	0,160	0,0089	5,56
	25	100		0,230	0,200	0,210	0,220	0,240	0,220	0,220	0,0141	6,36
	50	100		0,390	0,410	0,430	0,440	0,450	0,410	0,420	0,0223	5,31
	75	100		0,620	0,560	0,600	0,620	0,640	0,620	0,610	0,0276	4,52
	100	100		0,840	0,790	0,800	0,770	0,800	0,740	0,790	0,0335	4,24
	125	100		1,070	1,080	0,990	1,070	1,020	0,990	1,040	0,0418	4,02
	150	100		1,240	1,280	1,200	1,300	1,210	1,260	1,250	0,0392	3,14
	175	100		1,460	1,430	1,460	1,420	1,450	1,480	1,450	0,0219	1,31
200	100	1,650	1,660	1,640	1,650	1,600	1,620	1,640	0,0225	1,37		



Rys. 1 Średnia krzywa kalibracji koryzolu w ślinie w zakresie stężeń 5 - 200 ng/ml

$$H/H_w = 0,008 (0,00005) c - 0,002 (0,006)$$

$$n = 6 \quad SD = 0,014 \quad r = 0,9997$$

3.5.2.2. Analiza materiału biologicznego

Po rozmrożeniu zamrożonych próbek śliny przenoszono je do polipropylenowych probówek wirówkowych i wirowano przez 5 min przy prędkości 7500 obr/min. Następnie pobierano 1 ml śliny, do której dodawano 100 µl wzorca wewnętrznego (karbamazepiny o stężeniu 1 µg/ml) i postępowano dalej według procedury opisanej w punkcie 3.5.1.

3.5.3. Określenie trwałości koryzolu

Trwałość koryzolu określono przeprowadzając test zamrażania i rozmrażania próbek śliny o następujących stężeniach koryzolu: 15, 75, 125 ng/ml. W tym celu odwirowane próbki śliny o obj. 4 ml obciążono roztworem koryzolu o stężeniu 1 µg/ml w ilości 60, 300 i 500 µl. Z każdej próbki pobrano 1 ml, dodano 100 µl roztworu wzorca wewnętrznego o stężeniu 1 µg/ml i analizowano według procedury opisanej w podrozdziale 3.5.1. Pozostałą

ślinę zamrożono. Po upływie tygodnia próbki śliny rozmrożono, odwirowano i pobrano 1 ml do analizy, postępując zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.5.1. W sumie wykonano 4 cykle zamrażania i rozmrażania próbek.

3.5.4. Oznaczenie wydajności ekstrakcji

Wydajność procesu ekstrakcji przeprowadzono na dwunastu seriach pomiarowych, dla dwóch stężeń analitu (15 i 125 ng/ml).

3.5.4.1. Analiza próbek „bez ekstrakcji”

Przygotowano 12 serii pomiarowych zawierających po 1 ml odwirowanej śliny, do której dodano 3 ml dichlorometanu. Następnie postępowano według procedury opisanej w rozdziale 3.5.1. Po otrzymaniu suchej pozostałości, do sześciu próbek dodano po 150 µl roztworu kortyzolu o stężeniu 100 ng/ml, otrzymując stężenie 15 ng/ml oraz 100 µl karbamazepiny (1 µg/ml). Do kolejnych 6 odparowanych próbek dodano 125 µl analitu o stężeniu 1 µg/ml, otrzymując stężenie 125 ng/ml oraz 100 µl wzorca wewnętrznego (1 µg/ml). Próbkę ponownie odparowano na łaźni wodnej, a następnie suchą pozostałość rozpuszczono w 100 µl acetonitrylu, filtrowano, przeniesiono do szklanych insertów i poddano analizie chromatograficznej, której warunki opisano w punkcie 3.5.2.

3.5.4.2. Analiza próbek „po ekstrakcji”

Przygotowano 12 serii pomiarowych zawierających po 1 ml odwirowanej śliny. Do 6 próbek dodano 150 µl roztworu kortyzolu o stężeniu 100 ng/ml i 100 µl karbamazepiny (1 µg/ml). Do 6 kolejnych próbek dodano 125 µl analitu o stężeniu 1 µg/ml oraz 100 µl wzorca wewnętrznego (1 µg/ml). Następnie próbki poddano procedurze ekstrakcji opisanej w punkcie 3.5.1. i analizie chromatograficznej, której warunki opisano w punkcie 3.5.2.

3.5.5. Parametry walidacji metody analitycznej

3.5.5.1. Selektowność

Selektowność metody badano na roztworach wzorców i ekstraktach śliny. W celu otrzymania obciążonych kortyzolem ekstraktów śliny zastosowano procedurę ekstrakcyjną opisaną w podrozdziale 3.5.1., a uzyskane próbki poddano analizie chromatograficznej, zgodnie z warunkami przedstawionymi w punkcie 3.5.2. Otrzymane chromatogramy ekstraktu śliny porównano z chromatogramem roztworu kortyzolu i karbamazepiny (wzorca wewnętrznego).

3.5.5.2. Powtarzalność

Powtarzalność metody ustalono na podstawie 6 serii pomiarowych. Do 1 ml odwirowanej śliny dodano 100 µl roztworu karbamazepiny (1 µg/ml, wzorec wewnętrzny) i odpowiednią objętość roztworu kortyzolu o stężeniu 100 ng/ml, 1 µg/ml lub 10 µg/ml w celu otrzymania następujących stężeń (5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 ng/ml). Następnie próbki śliny poddano procesom opisanym w rozdziale 3.5.1. i analizowano chromatograficznie w warunkach wskazanych w punkcie 3.5.2. przy użyciu zestawu do HPLC firmy Knauer.

3.5.5.3. Odtwarzalność

Odtwarzalność metody ustalono na podstawie czterech serii pomiarowych. Do 1 ml odwirowanej śliny dodano 100 µl roztworu karbamazepiny (1 µg/ml, wzorec wewnętrzny) i odpowiednią ilość roztworu kortyzolu o stężeniu 1 µg/ml w celu otrzymania stężeń 15 ng/ml, 75 ng/ml i 125 ng/ml. Następnie próbki poddano procedurze opisaną w podrozdziale 3.5.1. oraz analizowano chromatograficznie przy użyciu zestawu na HPLC firmy MERCK.

3.5.5.4. Granica wykrywalności i oznaczalności

Granice wykrywalności i oznaczalności oszacowano na podstawie sześciokrotnej analizy ślepej próby, wyznaczając wartość średniej i obliczając odchylenie standardowe. Wykrywalności i oznaczalność metody obliczono na podstawie wzoru:

$$\text{LOD} = x_{\text{sr}} + 3 \cdot \text{SD}$$

$$\text{LOQ} = x_{\text{sr}} + 10 \cdot \text{SD}$$

gdzie: x_{sr} – wartość średnia ślepej próby

SD – odchylenie standardowe

3.6. Obliczenia statystyczne

Obliczenia matematyczne oraz analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu arkuszy kalkulacyjnych programu Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, Warszawa, Polska) oraz programu Statistica wersja 7.1 (StatSoft Inc., Kraków, Polska).

4. Wyniki

4.1. Optymalizacja metody analitycznej

W trakcie prowadzonych badań wstępnych należało określić czas poboru oraz objętość pobieranego materiału biologicznego. Z danych literaturowych wynika, iż kortyzol wykazuje najwyższe stężenie w godzinach porannych, pomiędzy 8 a 10. Natomiast najniższy poziom w organizmie osiąga około godziny 20. Dlatego też należało rozgraniczyć czas poboru próbek przeznaczonych do wyznaczenia krzywej kalibracji od czasu zbierania śliny pochodzącej od pacjentek i grupy kontrolnej.

Materiał biologiczny przeznaczony do wyznaczenia krzywej kalibracji gromadzono około godziny dwudziestej, przy czym zdrowi ochotnicy byli zobligowani do powstrzymania się od spożywania posiłków i przyjmowania napojów na około 30 min przed rozpoczęciem gromadzenia próbki.

Materiał biologiczny pobierany od hospitalizowanych pacjentek, który posłużył do określenia poziomu endogennego kortyzolu, gromadzono około godziny dziesiątej, kiedy poziom hormonu jest najwyższy. Podobnie postępowano w przypadku zbierania próbek śliny pochodzących od zdrowych ochotników stanowiących próbę kontrolną.

Następnym krokiem optymalizacji procedury analitycznej był dobór odpowiedniej objętości śliny do badań. Początkowo analizowano próbki materiału biologicznego o obj. 0,5 ml, jednakże analiza chromatograficzna nie dała satysfakcjonujących wyników. Badana objętość śliny nie pozwoliłaby na oznaczenie niższych stężeń endogennego kortyzolu u osób z depresją wykazujących tylko nieznaczne podwyższenie poziomu hormonu.

Jednym z ważniejszych elementów związanych z opracowaniem metody analitycznej jest dobór odpowiedniego wzorca wewnętrznego. Podczas jego doboru zwracano uwagę, aby substancja ta charakteryzowała się podobnymi właściwościami do kortyzolu, dlatego też jako wzorzec wewnętrzny zastosowano karbamazepinę, absorbującą promieniowanie UV przy długości fali 240 nm, podobnie jak ma to miejsce w przypadku analitu. Dodatkowo, jako lek przeciwpadaczkowy, karbamazepina wykazuje właściwości lipofilowe i z łatwością przechodzi do fazy organicznej podczas procesu ekstrakcji.

W trakcie optymalizacji metody badano również wpływ rozpuszczalnika użytego do sporządzenia roztworów podstawowych analitu oraz wzorca wewnętrznego. W pierwszym etapie zastosowano metanol, jednak analiza chromatograficzna ujawniła, iż pik kortyzolu uległ rozdwojeniu, dlatego też ostatecznie do rozpuszczenia wzorców użyto acetonitrylu.

4.1.1. Optymalizacja warunków ekstrakcji

W celu usunięcia zanieczyszczeń pochodzących z matrycy biologicznej optymalizowano warunki ekstrakcji. Opracowując procedurę analityczną wykorzystano zarówno ekstrakcję w układzie ciecz-ciecz (LLE, *liquid-liquid extraction*) jak i ekstrakcję do ciała stałego (SPE, *solid phase extraction*). W przypadku ekstrakcji SPE zastosowano kolumnienki ze złożem C-18, odpowiednio aktywowane, na które nanoszono próbki śliny z dodatkiem wzorca wewnętrznego. Kolumnienki przemywano wodą i osuszano. Zaadsorbowaną pozostałość eluowano za pomocą metanolu, następnie odparowywano, a suchą pozostałość rozpuszczano w fazie ruchomej i poddawano analizie chromatograficznej w warunkach opisanych w podrozdziale 3.5.2.

W przypadku ekstrakcji typu LLE, określono dodatkowo wpływ krotności ekstrakcji na jej wydajność. Analizowano próbki śliny obciążone kortyzolem, poddano je jednokrotnej ekstrakcji używając 3 ml dichlorometanu oraz trzykrotnej ekstrakcji stosując za każdym razem 1 ml tego samego rozpuszczalnika. Stwierdzono, iż sposób prowadzenia ekstrakcji typu LLE nie wpływa na poziom oznaczanego analitu, dlatego też zdecydowano się zastosować jednokrotną ekstrakcję z użyciem 3 ml dichlorometanu.

Opracowane krzywe kalibracji dla obu typów ekstrakcji poddano walidacji. Na podstawie testu F-Snedecora stwierdzono, iż oba typy ekstrakcji charakteryzuje podobna precyzja, zaś test t-Studenta wykazał, że otrzymane wyniki należą do tej samej zbiorowości generalnej. Uzyskane wyniki zestawiono w Tabeli 3.

Pomimo, iż wyniki uzyskane za pomocą obu metod ekstrakcji nie różniły się istotnie statystycznie, do dalszych badań wybrano ekstrakcję typu LLE. Umożliwia ona lepsze oczyszczenie próbki z zanieczyszczeń pochodzących z matrycy biologicznej, jak również charakteryzuje ją lepsza precyzja (wartości współczynnika zmienności, CV), w szczególności w przypadku niskich stężeń analitu. Dodatkowo przeprowadzenie ekstrakcji LLE pochłaniało mniej czasu, niż ekstrakcja SPE. Ma to szczególne znaczenie podczas analizy wielu próbek. Potwierdzają to wyniki analizy endogennego kortyzolu w ślinie osób zdrowych oraz z depresją zestawione w Tabeli 4.

Tabela 3. Ocena statystyczna procesu ekstrakcji typu LLE i SPE

Kortyzol (ng/ml)	F	$F_{\alpha} (\alpha=0,05; f=5)$	t	$t_{\alpha,f} (\alpha=0,05; f=10)$
5	1,28	5,05	0,897	2,228
15	1,56		3,377	
125	1,67		2,081	
200	1,28		2,182	

Tabela 4. Wpływ typu ekstrakcji na zawartość endogenego kortyzolu w ślinie

Sposób ekstrakcji	Endogenny kortyzol (ng/ml)			
	Osoba zdrowa		Osoba z depresją	
	$\bar{x} \pm SD$	CV (%)	$\bar{x} \pm SD$	CV (%)
LLE	10,8±0,35	3,24	146,3±0,68	0,46
SPE	9,2±0,46	5,00	146,3±1,37	0,93

4.1.2. Ocena trwałości kortyzolu

Trwałość kortyzolu oznaczono na podstawie testu „zamrażania i rozmrażania”. Stwierdzono, iż analit nie ulega rozkładowi w niskich temperaturach i może być zamrażany, co jest istotne ze względu na konieczność transportu oraz przechowywania do czasu analizy próbek śliny pobranych od pacjentek. Wyniki testu trwałości zilustrowano w Tabeli 5.

Tabela 5. Wyniki testu „zamrażania i rozmrażania” próbek śliny

Cykl	Stężenie nominalne kortyzolu (ng/ml)		
	15	75	125
	Stężenie oznaczone (ng/ml)		
1	14,9	74,0	128,3
2	14,2	66,7	125,6
3	14,0	70,0	125,0
4	13,8	70,0	125,0
średnia	14,23	70,17	125,98
SD	0,68	2,98	1,16
CV (%)	4,78	4,26	0,92
Odzysk (%)	94,87	93,56	100,78

4.1.3. Ocena wydajności ekstrakcji

Wydajność ekstrakcji (W) oszacowano na podstawie porównania wysokości pików kortyzolu otrzymanych po przeprowadzeniu analizy zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.5.4.1. i wysokości pików analitu otrzymanych w wyniku postępowania z próbką przedstawionego w rozdziale 3.5.4.2. Wyniki przeprowadzonych analiz przedstawiono w Tabelach 6 i 7. Korzystając z zależności $W = \frac{\text{"stężenie analitu po ekstrakcji"}}{\text{"stężenie analitu bez ekstrakcji"}} \times 100 \%$ dokonano oceny wydajności ekstrakcji, a wyniki oznaczeń zestawiono w Tabeli 8.

Tabela 6. Wydajność ekstrakcji kortyzolu o stężeniu 15 ng/ml w ślinie

Próbki „bez ekstrakcji”			Próbki „po ekstrakcji”		
C (ng/ml)	H/Hw	C ozn.	C (ng/ml)	H/Hw	C ozn.
15	0,15	18,75	15	0,13	16,25
15	0,14	17,50	15	0,13	16,25
15	0,14	17,50	15	0,15	18,75
15	0,13	16,25	15	0,14	17,50
15	0,16	20,00	15	0,15	18,75
15	0,16	20,00	15	0,13	16,25
Średnia	0,146667	18,33333	Średnia	0,138333	17,29167
SD	0,012111	1,513825	SD	0,009832	1,22899
CV (%)	8,16	8,20	CV (%)	7,10	7,10

Tabela 7. Wydajność ekstrakcji kortyzolu o stężeniu 125 ng/ml w ślinie

Próbki „bez ekstrakcji”			Próbki „po ekstrakcji”		
C (ng/ml)	H/Hw	C ozn.	C (ng/ml)	H/Hw	C ozn.
125	1,01	126,25	125	1,07	133,75
125	1,03	128,75	125	1,02	127,50
125	1,09	136,25	125	1,04	130,00
125	1,03	128,75	125	1,09	136,25
125	1,07	133,75	125	1,03	128,75
125	1	125,00	125	1,09	133,75
Średnia	1,038333	129,7917	Średnia	1,056667	131,6667
SD	0,034881	4,360094	SD	0,030768	3,41565
CV (%)	3,37	3,36	CV (%)	2,80	2,58

Tabela 8. Ocena wydajności ekstrakcji

Stężenie kortyzolu w próbce C (ng/ml)	Wydajność ekstrakcji (%)
15	94,33
125	101,45

4.1.4. Dobór parametrów chromatograficznych

W trakcie doboru parametrów analizy chromatograficznej ważne było, aby piki kortyzolu i karbamazepiny nie interferowały ze sobą oraz z zanieczyszczeniami pochodzącymi z matrycy biologicznej. Istotnym czynnikiem był również czas retencji, zarówno kortyzolu jak i karbamazepiny. Wskazane było, aby parametr ten w obu przypadkach nie przekroczył 10 min.

Dobór składu fazy ruchomej rozpoczęto od określenia rodzaju i objętości dodanego modyfikatora. Metanol nie dawał satysfakcjonujących wyników i uzyskane na chromatogramie piki były znacząco niższe od tych otrzymanych przy użyciu dodatku acetonitrylu. Dlatego też zdecydowano się na wykorzystanie drugiego z rozpuszczalników. W pierwszej kolejności zastosowano fazę ruchomą zawierającą 45% acetonitrylu, jednakże czas retencji pików pochodzącego od analitu mieścił się w granicach dwóch minut. Następnie użyto fazy zawierającej 35% dodatku tego modyfikatora, jednak najlepsza do przeprowadzenia efektywnej analizy okazała się faza ruchoma o składzie acetonitryl : woda w stosunku 30 : 70 (v : v).

Analizowano również wpływ temperatury na rozdział oraz wysokość pików kortyzolu i karbamazepiny. Stwierdzono, iż wyższa temperatura nie wpływa na wysokość pików analizowanych związków, a także na czas ich retencji. Również niewielka zmiana pH pozostaje bez wpływu na wynik analizy chromatograficznej.

4.1.5. Walidacja metody analitycznej

W celu przeprowadzenia walidacji opracowanej metody analitycznej wyznaczono następujące parametry:

- selektywność
- powtarzalność
- odtwarzalność
- dokładność
- liniowość
- granicę wykrywalności i oznaczalności
- czułość

4.1.5.1. Selektowność

Selektowność metody określono na podstawie procedury opisanej w podrozdziale 3.5.1. Stwierdzono, iż na chromatogramie w miejscach odpowiadających czasom retencji kortyzolu i karbamazepiny nie występują interferencje spowodowane obecnością innych substancji pochodzących z matrycy biologicznej. Rys. 2 przedstawia chromatogram (A) ekstraktu nieobciążonej śliny ludzkiej, a chromatogram (B) próbki śliny zawierającej dodatek kortyzolu o stężeniu 15 ng/ml (1) i 100 ng/ml karbamazepiny (wzorca wewnętrznego) (2).

4.1.5.2. Powtarzalność

Na podstawie analizy wyników oznaczeń precyzji serii jednoczesnej – powtarzalności metody, stwierdzono, iż współczynnik zmienności opracowanej metody mieści się w granicy pomiędzy 1,12 a 9,94%. Współczynnik zmienności nie przekraczający 10% pozwala wnioskować o powtarzalności opracowanej metody. Uzyskane współczynniki zmienności zestawiono w Tabeli 9. Stężenie kortyzolu obliczono w oparciu o równanie regresji opisane w punkcie 3.5.2.1.

Tabela 9. Wyniki badań powtarzalności metody (precyzja serii jednoczesnej)

Substancja	Kortyzol	Karbamazepina	Nr serii						Średnia	SD	CV (%)	Odzysk (%)	
			1	2	3	4	5	6					
Stężenie nominalne (ng/ml)	5	100	Stężenie oznaczone (ng/ml)	5,6	4,8	4,5	5,6	5,5	4,8	5,13	0,51	9,94	102,60
	10	100		10,1	9,5	9,9	10,3	9,4	8,2	9,56	0,75	7,85	95,60
	15	100		13,9	15,9	14,8	13,7	15,8	15,9	15,00	1,02	6,80	100,00
	20	100		18,6	20,0	18,7	20,0	21,2	21,8	20,00	1,30	6,50	100,00
	25	100		28,3	24,9	26,9	27,6	29,8	27,7	27,50	1,60	5,82	110,00
	50	100		48,7	50,9	53,7	54,5	56,2	51,2	52,50	2,75	5,23	105,00
	75	100		77,8	69,6	75,5	77,5	79,9	77,2	76,25	3,55	4,66	101,67
	100	100		104,9	98,7	100,0	96,1	100,2	92,6	98,75	4,16	4,20	104,90
	125	100		134,3	135,3	124,6	134,3	126,9	124,7	130,00	5,14	3,95	104,00
	150	100		155,5	160,0	150,5	162,5	151,3	157,7	156,25	4,76	3,00	104,17
	175	100		182,9	178,8	182,3	177,5	181,2	184,8	181,25	2,70	1,49	103,57
	200	100		206,5	207,0	205,2	207,0	201,8	202,5	205,00	2,30	1,12	102,50

4.1.5.3. Odtwarzalność

Oceny odtwarzalności metody dokonano na podstawie wartości współczynnika zmienności, który mieści się w granicach od 1,60 do 6,79%. Niska wartość współczynnika zmienności pozwala wnioskować o odtwarzalności opracowanej metody. Zestawienie wyników otrzymanych podczas badania odtwarzalności przedstawia Tabela 10.

Tabela 10. Wyniki oszacowania odtwarzalności metody

Dzień	Parametry regresji				Stężenie kortyzolu (ng/ml)		
	a	b	r	SD	15	75	125
A	0,005 ($\pm 0,0005$)	0,006 ($\pm 0,022$)	0,9976	0,020	15,0	74,0	130,0
B	0,006 ($\pm 0,0006$)	-0,025 ($\pm 0,052$)	0,9951	0,047	14,2	66,7	128,3
C	0,006 ($\pm 0,0002$)	-0,014 ($\pm 0,024$)	0,9979	0,020	14,0	70,0	125,0
D	0,006 ($\pm 0,0003$)	-0,028 ($\pm 0,032$)	0,9983	0,028	12,7	70,0	128,3
Średnia					13,98	70,17	127,9
SD					0,95	2,98	2,09
CV (%)					6,79	4,26	1,60
Odzysk (%)					93,20	93,56	102,32

4.1.5.4. Dokładność

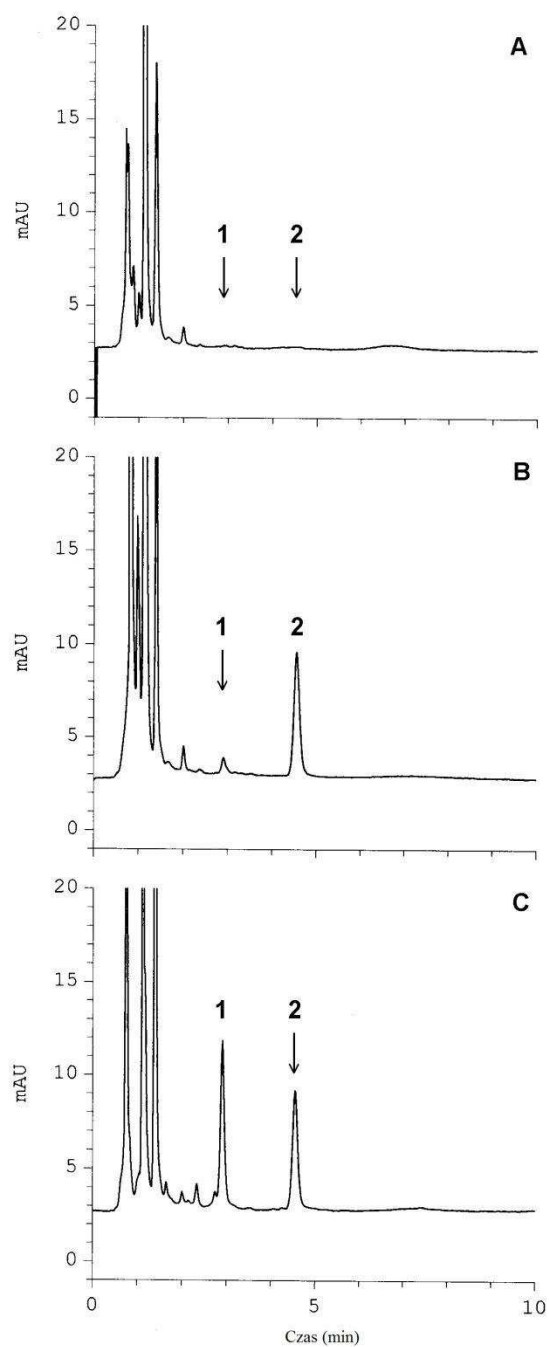
Dokładność metody określono na podstawie odzysku analitu, który obliczono w oparciu o wyniki pomiarów uzyskanych podczas oceny powtarzalności i odtwarzalności opracowanej metody analitycznej. Odzysk obliczony na podstawie wyników precyzji serii jednoczesnej mieścił się w zakresie od 95,6 do 110%, zaś w przypadku odtwarzalności metody, znajdował się w zakresie od 93,20 do 102,32%. Szczegółowe zestawienie informacji o wartości odzysku dla poszczególnych stężeń kortyzolu przedstawiono Tabelach 9 i 10.

4.1.5.5. Liniowość

Liniowość metody potwierdzono w zakresie stężeń 5 – 200 ng/ml. Wybrany zakres stężeń w pełni pokrywa się z oznaczanym w ślinie poziomem hormonu, zarówno u osób zdrowych jak i z depresją.

4.1.5.6. Granica wykrywalności i oznaczalności

Granica wykrywalności metody obliczona na podstawie wzoru wskazanego w podrozdziale 3.5.5.4. wyniosła 2,54 ng/ml, natomiast granica oznaczalności - 5,67 ng/ml, dlatego też stężenie 5 ng/ml stanowi jednocześnie pierwszy punkt krzywej kalibracji.



Rys. 2 Chromatogram ekstraktu śliny zdrowego człowieka (A)

Chromatogram ekstraktu śliny z dodatkiem 15 ng/ml kortyzolu i 100 ng/ml karbamazepiny (B)

Chromatogram ekstraktu śliny z dodatkiem 150 ng/ml kortyzolu i 100 ng/ml karbamazepiny (C)

1 – kortyzol

2 – karbamazepina

4.2. Wyniki badań grupy kontrolnej

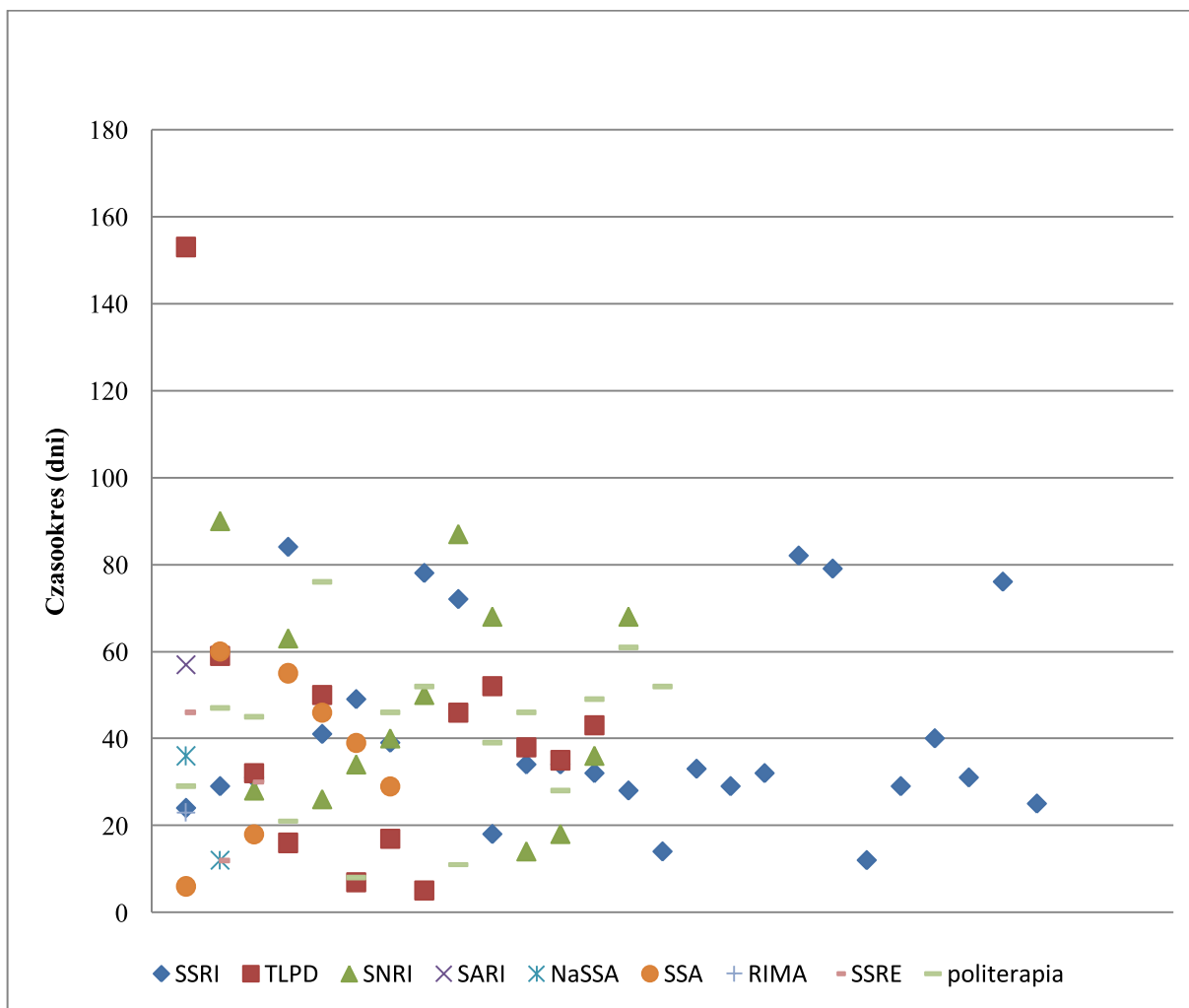
Grupę kontrolną stanowiły zdrowe ochotniczki (n=10), od których około godziny dziesiątej pobrano próbki śliny. Materiał do badań przygotowano do analizy zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.5.1., a następnie poddano analizie chromatograficznej, której warunki przedstawiono w punkcie 3.5.2. Celem eksperymentu było określenie, jakie stężenie osiągnie wydzielany kortyzol u osób nieobciążonych depresją. Wyniki badań zestawiono w Tabeli 11.

Tabela 11. Stężenie kortyzolu w ślinie osób zdrowych

Stężenie oznaczone (ng/ml)										Średnia	SD	CV (%)
3,875	3,125	7,500	5,625	6,500	4,000	6,125	4,375	3,500	5,250	4,9875	1,439	28,85

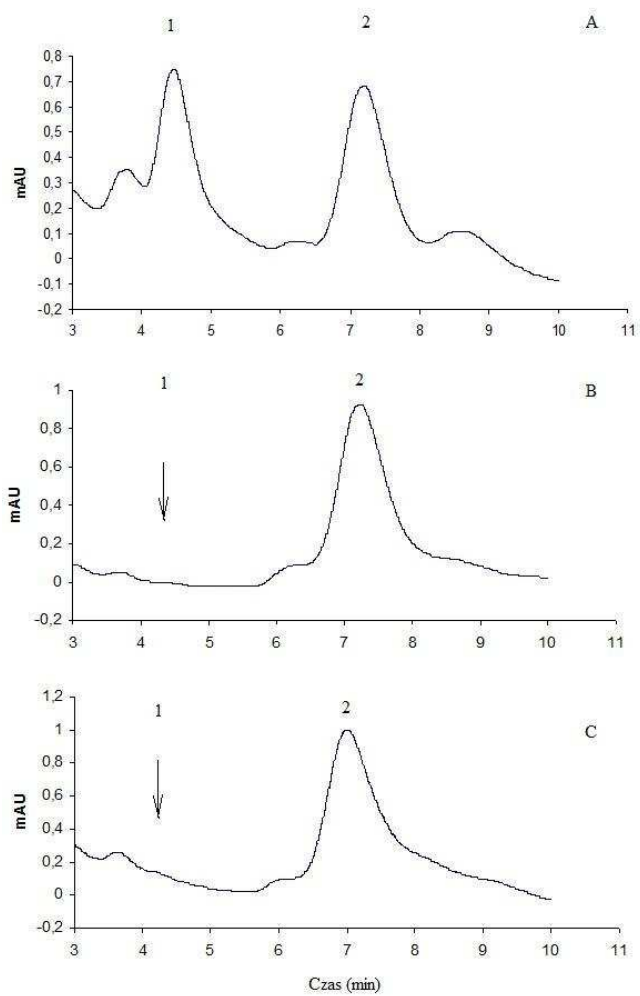
4.3. Wyniki badań próbek śliny pochodzących od pacjentek

W toku badań analizowano 2653. próbki śliny pochodzące od 97. pacjentek hospitalizowanych z powodu depresji. Materiał do badań pobierano każdego dnia w trakcie całego okresu leczenia w szpitalu, jednakże w niektórych przypadkach część pacjentek nie była w stanie oddać próbki śliny do analizy ze względu na bardzo złe samopoczucie w danym dniu. Zgromadzony materiał biologiczny wykorzystano do badania wpływu otrzymywanych przez probantki leków przeciwdepresyjnych na poziom wydzielanego kortyzolu. Dodatkowo na podstawie wypełnionej podczas przyjęcia pacjentki na oddział ankiety, dostarczającej informacji o czasie trwania hospitalizacji oraz podawanych substancjach sprawdzono, czy grupa stosowanych leków przeciwdepresyjnych może w jakikolwiek sposób determinować czasookres pobytu w szpitalu. Na Rys. 3 przedstawiono diagram obrazujący zależność pomiędzy czasem trwania hospitalizacji a podawanymi lekami przeciwdepresyjnymi. Stwierdzono, iż nie można określić relacji pomiędzy stosowaną terapią a czasem pobytu pacjentki w szpitalu.

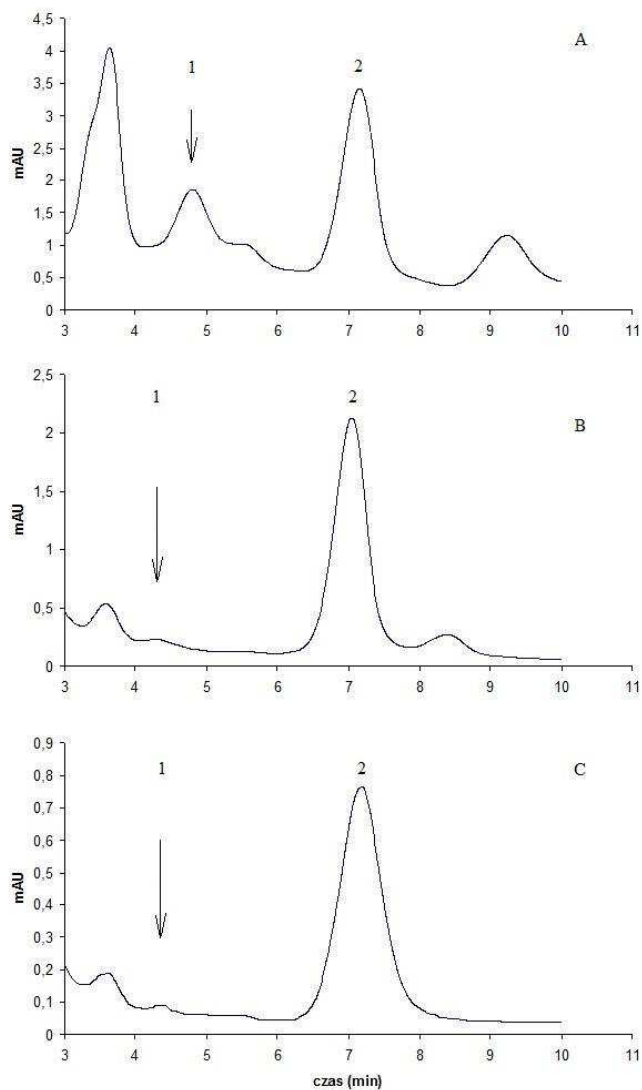


Rys. 3 Zależność czasookresu pobytu pacjentki w szpitalu od stosowanej grupy leków przeciwdepresyjnych

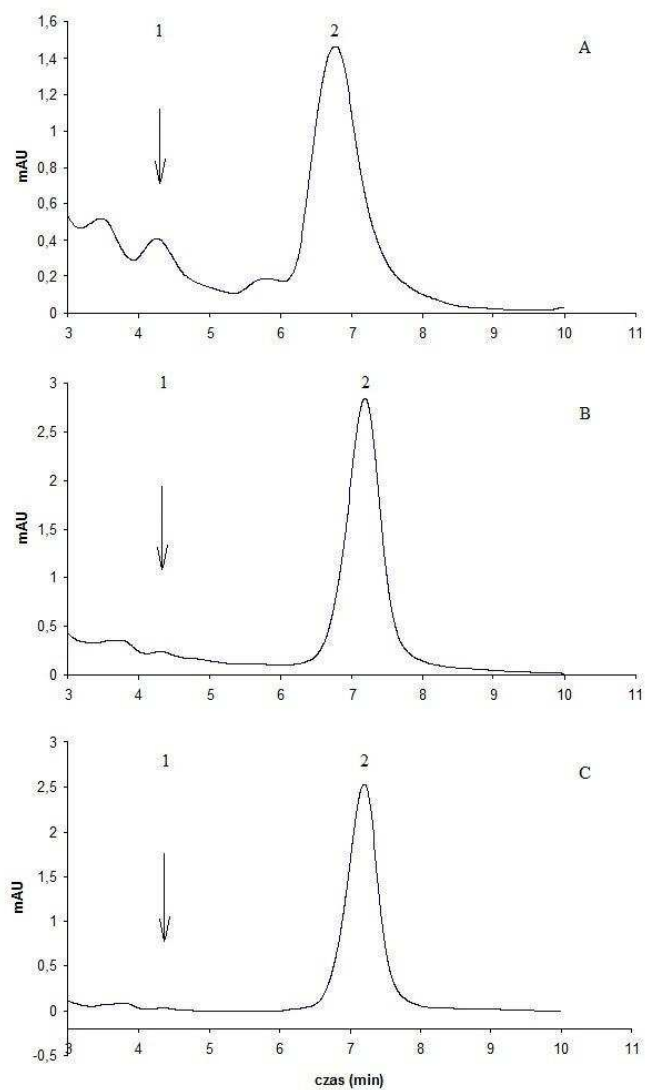
Opracowana metoda analityczna, której tok postępowania oraz parametry rozdziału chromatograficznego opisano w rozdziale 3, pozwoliła na ekstrakcję oraz ilościowe oznaczenie kortyzolu w badanych próbkach śliny, pochodzących od pacjentek hospitalizowanych z powodu depresji w Szpitalu dla Nerwowo i Psychiczenie Chorych w Starogardzie Gdańskim. Analizę przeprowadzono przy użyciu techniki HPLC z detekcją UV, a przykładowe chromatogramy przedstawiono na Rys. 4 – 7. Obrazują one wygląd pików kortyzolu oraz wzorca wewnętrznego – karbamazepiny. Zestawienie trzech fragmentów chromatogramów otrzymanych w trakcie analizy próbek śliny pochodzących od tej samej pacjentki w kolejnych dniach terapii, ilustruje wpływ stosowanego leku na poziom hormonu.



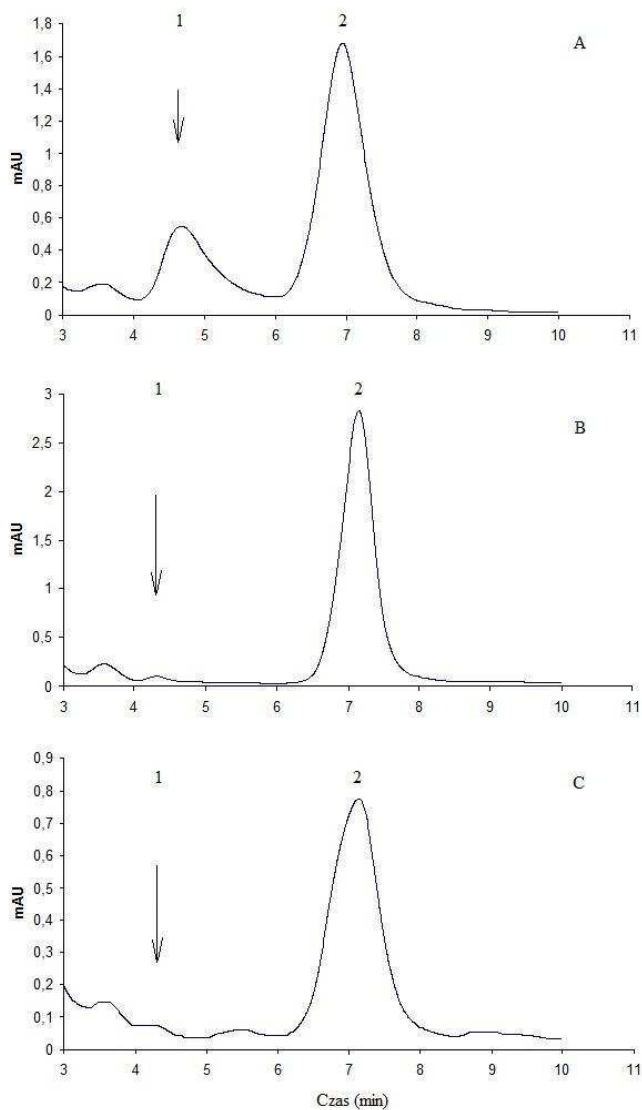
Rys. 4 Chromatogram ekstraktów śliny z dodatkiem karbamazepiny (100 ng/ml) pochodzących od pacjentki leczonej doksepiną w kolejnych dniach terapii
 (A) kortyzol – 86,25 ng/ml
 (B) kortyzol – 10,625 ng/ml
 (C) kortyzol – 7,50 ng/ml



Rys. 5 Chromatogram ekstraktów śliny z dodatkiem karbamazepiny (100 ng/ml) pochodzących od pacjentki leczonej sertralina w kolejnych dniach terapii
 (A) kortyzol – 67,50 ng/ml
 (B) kortyzol – 13,75 ng/ml
 (C) kortyzol – 12,50 ng/ml



Rys. 6 Chromatogram ekstraktów śliny z dodatkiem karbamazepiny (100 ng/ml) pochodzących od pacjentki leczonej wenlafaksyną w kolejnych dniach terapii
 (A) kortyzol – 13,625 ng/ml
 (B) kortyzol – 3,625 ng/ml
 (C) kortyzol – 2,065 ng/ml



Rys. 7 Chromatogram ekstraktów śliny z dodatkiem karbamazepiny (100 ng/ml) pochodzących od pacjentki leczonej klomipraminą i citalopramem w kolejnych dniach terapii

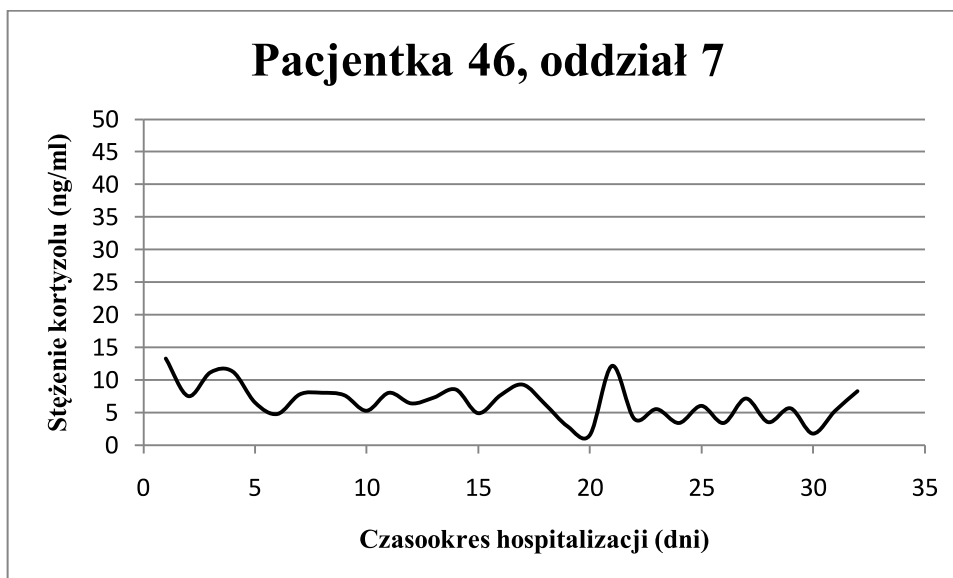
(A) kortyzol – 41,25 ng/ml

(B) kortyzol – 11,375 ng/ml

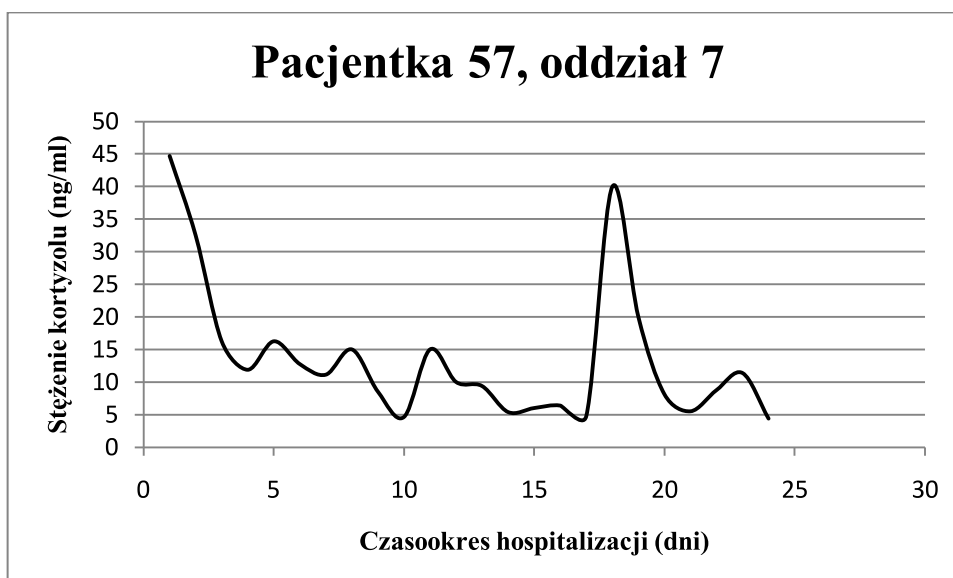
(C) kortyzol – 6,25 ng/ml

4.3.1. Wpływ TLPD na wydzielanie kortyzolu

Amitryptylina, doksepina, klomipramina i opipramol należą do najczęściej podawanych leków przeciwdepresyjnych z grupy TLPD. Czas hospitalizacji pacjentek stosujących amitryptylinę wahał się pomiędzy 7. a 59. dniami, dla pozostałych substancji wynosi od 8. do 52. dni. Jedynie okres leczenia opipramolem trwał 153 dni. Nie stwierdzono, aby krotność pobytu pacjentki w szpitalu wpływała na czas trwania leczenia. Również w przypadku pozostałych leków z tej grupy nie zaobserwowano relacji pomiędzy krotnością pobytu chorej w szpitalu, a czasem trwania hospitalizacji. W większości przypadków poziom kortyzolu oznaczony w ślinie pacjentek w pierwszym okresie hospitalizacji (kilka dni) był podwyższony. Zaobserwowano jednak, iż wydzielanie hormonu szybko ulegało obniżeniu, a jego spadek był proporcjonalny do czasu trwania terapii. Wyniki oznaczeń poziomu kortyzolu w ślinie pacjentek leczonych lekami z grupy TLPD wraz z datami pobrania próbek zebrano w Tabelach 12 – 14. Wynika z nich, iż najczęściej spadek stężenia kortyzolu do wartości referencyjnych zajmował około 30% całego okresu pobytu w szpitalu. W tym czasie poziom hormonu ulegał nieznacznym wahaniom, jednak nadal w niewielkim stopniu przekraczał stężenie oznaczane w ślinie osób z grupy kontrolnej. Przykładem pacjentki o takim profilu zmian stężenia kortyzolu jest probantka oznaczona symbolem 57. Ponadto zaobserwowano, iż w przypadku pacjentek, których hospitalizacja trwała ponad 30 dni, po tym okresie następowało ponowne podwyższenie poziomu hormonu. Stopień w jakim zachodziło podwyższenie stężenia kortyzolu był zawsze proporcjonalny do poziomu wyjściowego hormonu, jednak poziom hormonu nie osiągał nigdy tak wysokich wartości jak oznaczony w pierwszych dniach terapii. Obserwacje te obrazują Rys. 8 i 9 przedstawiające zmiany poziomu kortyzolu u pacjentek leczonych amitryptyliną. W obu przypadkach można zauważyć szybki spadek poziomu kortyzolu po rozpoczęciu terapii oraz jego ponowny wzrost po około trzydziestu dniach leczenia.

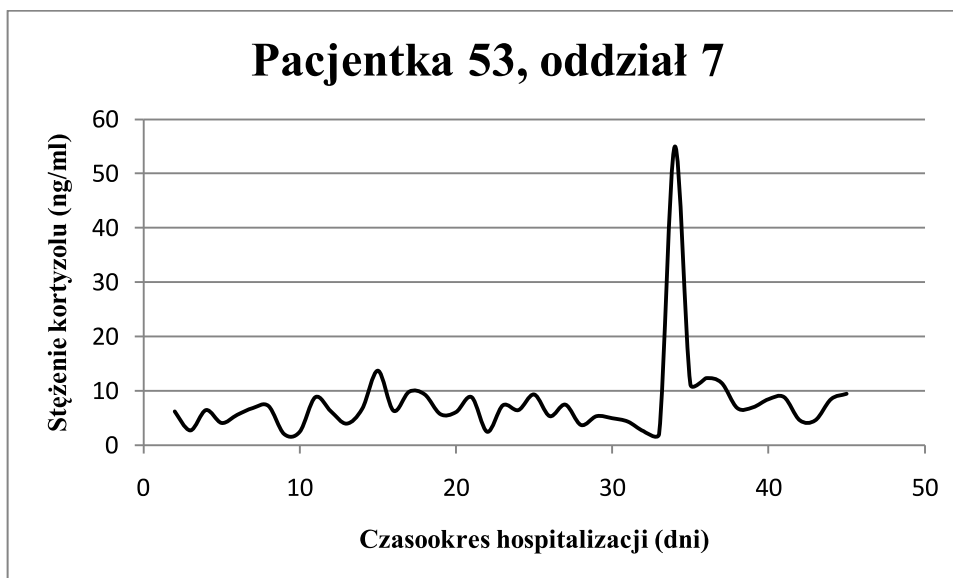


Rys. 8 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii amitryptyliną



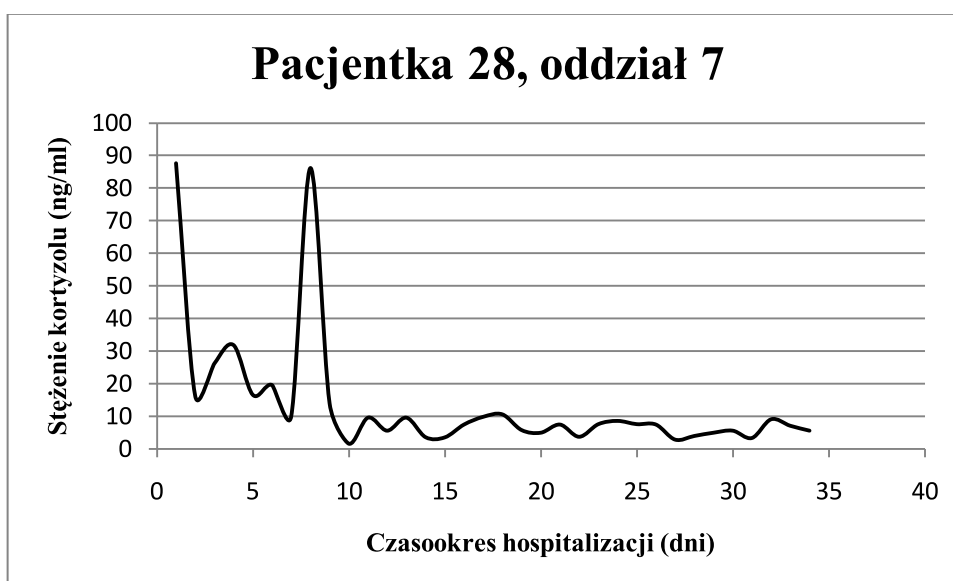
Rys. 9 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii amitryptyliną

Podczas eksperymentu zaobserwowano, że wzrost poziomu kortyzolu po prawie 30. dniach terapii wystąpił również w przypadku pacjentki, u której nie stwierdzono zwiększonego wydzielania hormonu w pierwszym okresie leczenia. Podobnie jak u pacjentki o symbolu 57, normalizacja poziomu kortyzolu następowała w trakcie kolejnych sześciu dni i nie ulegała zmianie do końca trwania hospitalizacji. Zmiany stężenia hormonu w ślinie u pacjentki stosującej terapię klomipraminą przedstawiono na Rys. 10.



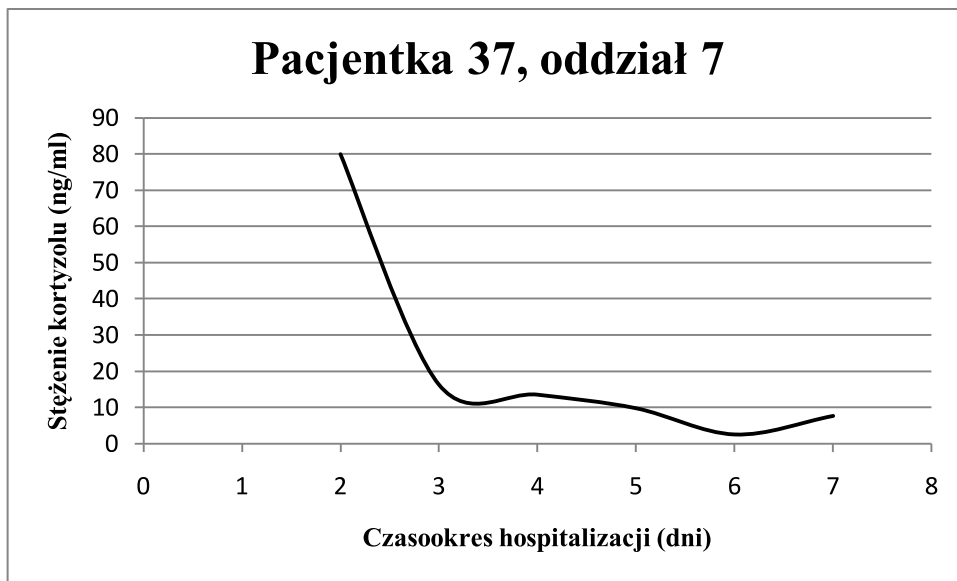
Rys. 10 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii klomipraminą

Tylko w przypadku pacjentki oznaczonej symbolem 28, otrzymującej doksepinę, profil zmian stężenia hormonu nieznacznie różnił się od profili pozostałych probantek poddanych terapii TLPD. Zauważono, że poziomu kortyzolu obniżył się w pierwszym tygodniu leczenia, następnie wystąpiło jednodniowe jego podwyższenie, po czym nastąpił szybki spadek do wartości referencyjnych. W tym wypadku stabilizacja wydzielanego kortyzolu była trwała. Przebieg zmian stężenia hormonu oznaczanego w ślinie podczas terapii doksepiną obrazuje Rys. 11.



Rys. 11 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii doksepiną

Jak już wspomniano szybkość obniżania się stężenia kortyzolu w ślinie kobiet chorych na depresję do wartości oznaczanych u zdrowych ochotników była ściśle związana z okresem pobytu pacjentek w szpitalu. Na Rys. 12 przedstawiono zmiany poziomu hormonu u pacjentki, której okres hospitalizacji trwał mniej niż dziesięć dni. Obniżenie stężenia kortyzolu w ślinie nastąpiło już po trzech dniach kuracji, co może świadczyć o szybkiej reakcji organizmu na podawany lek.



Rys. 12 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii amitryptyliną

Tabela 12. Wyniki analizy poziomu kortyzolu u pacjentek leczonych amitryptyliną

Amitryptylina													
Pacjentka 2, oddział 7		Pacjentka 5, oddział 7		Pacjentka 12, oddział 9		Pacjentka 37, oddział 7		Pacjentka 46, oddział 7		Pacjentka 57, oddział 7		Pacjentka 60, oddział 7	
Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)
29.02.	161,250	12.03.	2,000	09.06.	22,725	13.01.	86,000	18.02.	13,250	06.05.	44,725	25.06.	41,250
06.03.	130,000	14.03.	1,250	20.06.	10,650	14.01.	80,000	02.03.	7,500	08.05.	32,50	09.07.	7,750
07.03.	8,750	15.03.	1,500	27.06.	4,375	15.01.	16,250	03.03.	11,125	09.05.	16,250	10.07.	9,000
08.03.	13,750	16.03.	1,500	28.06.	6,625	16.01.	13,500	04.03.	11,250	10.05.	11,875	11.07.	1,875
09.03.	155,000	17.03.	2,500	29.06.	2,250	17.01.	9,750	05.03.	6,500	11.05.	16,250	12.07.	7,500
10.03.	127,500	18.03.	1,250	30.06.	2,875	19.01.	2,500	06.03.	4,750	13.05.	12,750	13.07.	1,875
11.03.	45,000	19.03.	1,500	01.07.	8,000	20.01.	7,625	07.03.	7,750	14.05.	11,125	14.07.	1,875
12.03.	38,750	20.03.	1,250	02.07.	11,375			08.03.	8,000	15.05.	15,000	15.07.	1,250
13.03.	36,250	25.03.	2,250	03.07.	7,500			10.03.	7,625	16.05.	8,500	16.07.	7,750
14.03.	41,250	26.03.	1,500	04.07.	5,000			11.03.	5,250	17.05.	4,625	18.07.	9,750
15.03.	33,750	27.03.	1,500	05.07.	2,500			12.03.	8,000	18.05.	15,000	23.07.	3,500
16.03.	18,750	28.03.	1,500	06.07.	10,000			13.03.	6,375	19.05.	10,000	24.07.	2,875
17.03.	40,000			07.07.	3,125			14.03.	7,250	21.05.	9,375	25.07.	5,000
18.03.	81,250			08.07.	9,625			15.03.	8,500	22.05.	5,375	26.07.	5,625
19.03.	13,750			09.07.	5,000			16.03.	4,875	25.05.	6,000	27.07.	17,500
20.03.	22,500			10.07.	8,750			17.03.	7,625	26.05.	6,375	29.07.	35,000
21.03.	27,500			11.07.	2,250			18.03.	9,250	28.05.	4,750	30.07.	27,500
22.03.	25,000			12.07.	10,000			19.03.	6,250	02.06.	40,000	04.08.	36,250
23.03.	25,000			13.07.	9,625			20.03.	2,875	03.06.	20,000	05.08.	17,500
24.03.	25,000			14.07.	9,375			21.03.	1,500	04.06.	8,125		

25.03.	25,000						15.07.	8,250				23.03.	12,125	05.06.	5,500	
26.03.	10,000						16.07.	10,250				24.03.	4,000	07.06.	8,750	
27.03.	25,000						17.07.	10,125				25.03.	5,500	08.06.	11,375	
28.03.	83,750						18.07.	4,250				26.03.	3,375	09.06.	4,375	
							19.07.	5,000				27.03.	6,000			
							20.07.	6,250				28.03.	3,375			
							21.07.	21,250				29.03.	7,125			
							22.07.	13,750				30.03.	3,500			
							23.07.	5,000				31.03.	5,625			
							24.07.	9,625				01.04.	1,750			
							25.07.	3,125				02.04.	5,250			
							26.07.	8,750				03.04.	8,250			
							27.07.	8,750								
							28.07.	11,250								
							29.07.	8,625								
							30.07.	1,750								
							01.08.	2,500								
							02.08.	17,500								
							03.08.	4,000								
							04.08.	11,750								
							05.08.	11,250								
							06.08.	2,750								
							07.08.	8,875								

Tabela 13. Wyniki analizy poziomu kortyzolu u pacjentek leczonych klomipraminą

Klomipramina					
Pacjentka 41, oddział 7		Pacjentka 44, oddział 7		Pacjentka 53, oddział 7	
Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)
26.01.	19,375	09.02.	25,500	17.03.	4,500
27.01.	21,750	11.02.	19,750	18.03.	6,250
28.01.	13,375	12.02.	22,500	19.03.	2,750
29.01.	26,250	14.02.	21,125	20.03.	6,500
30.01.	15,000	15.02.	8,500	21.03.	4,125
01.02.	7,500	16.02.	6,000	23.03.	5,625
02.02.	5,000			24.03.	6,875
03.02.	5,000			25.03.	7,250
04.02.	7,625			26.03.	2,0875
05.02.	3,500			27.03.	2,500
06.02.	10,000			28.03.	8,875
07.02.	8,750			29.03.	6,250
08.02.	3,000			30.03.	4,000
09.02.	14,250			31.03.	6,750
10.02.	3,250			01.04.	13,750
11.02.	5,750			02.04.	6,375
12.02.	23,750			03.04.	9,875
				04.04.	9,375
				05.04.	5,750
				06.04.	6,125
				07.04.	8,875
				08.04.	2,500
				09.04.	7,375
				10.04.	6,500
				13.04.	9,375
				14.04.	5,375
				15.04.	7,500
				16.04.	3,750
				18.04.	5,375
				19.04.	5,000
				20.04.	4,375
				21.04.	2,625

				23.04.	2,125
				24.04.	55,000
				26.04.	11,250
				27.04.	12,375
				29.04.	11,500
				30.04.	6,875
				01.05.	7,000
				02.05.	8,500
				04.05.	8,875
				05.05.	4,625
				06.05.	4,625
				07.05.	8,500
				09.05.	9,500

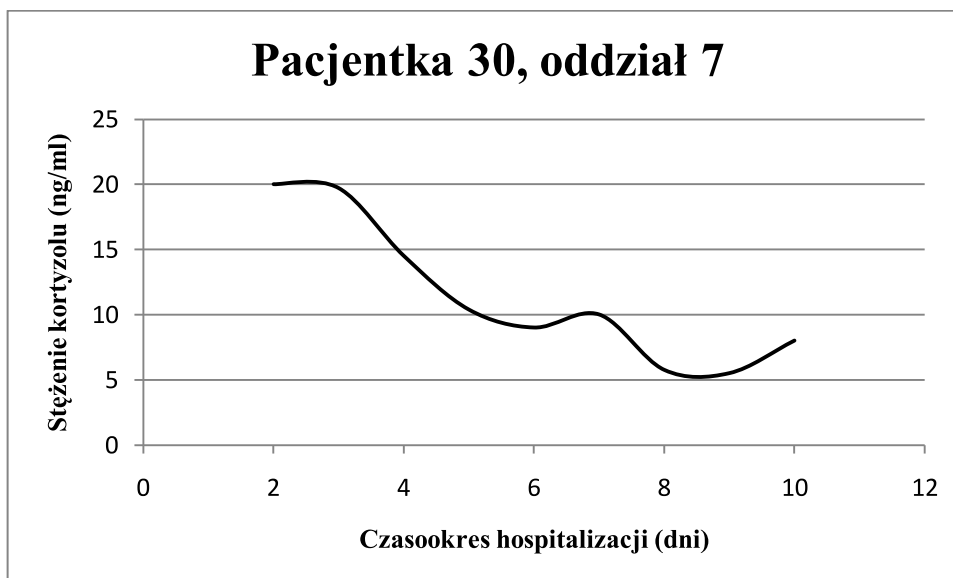
Tabela 14. Wyniki analizy poziomu kortyzolu u pacjentek leczonych doksepiną i opipramolem

Doksepina		Opipramol	
Pacjentka 28, oddział 7		Pacjentka 4, oddział 9	
Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)
27.10.	87,725	01.04.	33,750
29.10.	16,250	02.04.	25,000
30.10.	26,250	03.04.	25,000
31.10.	31,875	04.04.	20,000
01.11.	16,625	05.04.	7,500
02.11.	19,625	06.04.	2,500
03.11.	10,000	07.04.	11,250
04.11.	86,250	08.04.	3,750
05.11.	14,000	09.04.	30,000
06.11.	1,625	10.04.	22,500
07.11.	9,625	12.04.	22,500
09.11.	5,625	14.04.	21,250
10.11.	9,625	15.04.	2,000
11.11.	3,625	16.04.	10,000
14.11.	3,5625	17.04.	16,250
15.11.	7,500	18.04.	16,250
17.11.	9,875	20.04.	27,500
19.11.	10,625	21.04.	10,000
20.11.	5,8125	22.04.	21,250

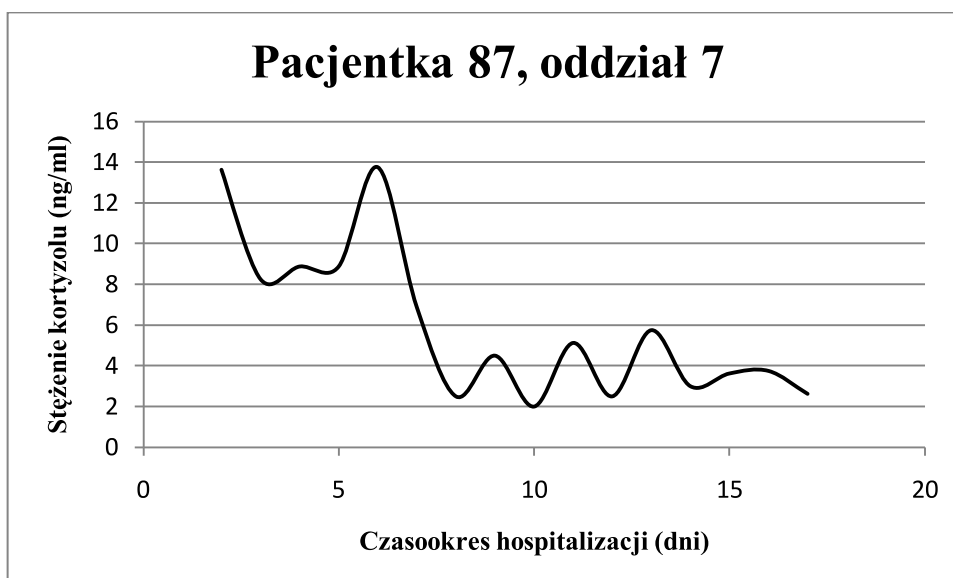
21.11.	5,000	23.04.	26,250
23.11.	7,500	24.04.	13,750
25.11.	3,750	25.04.	8,750
26.11.	7,625	26.04.	16,250
29.11.	8,625	27.04.	20,000
03.12.	7,625	28.04.	33,750
04.12.	7,500	29.04.	22,500
05.12.	2,875	30.04.	13,750
06.12.	4,000		
07.12.	5,000		
08.12.	5,625		
09.12.	3,375		
12.12.	9,125		
14.12.	7,125		
15.12.	5,625		

4.3.2. Wpływ SSRI na wydzielanie kortyzolu

Substancje należące do grupy SSRI stanowią najczęściej stosowaną grupę leków przeciwdepresyjnych. Wśród badanych kobiet, od których pozyskiwano próbki śliny, 28. stosowało terapię preparatami należącymi do tej grupy. Do leków najczęściej podawanych należały: sertralina, citalopram oraz jego enancjomer - escitalopram, ponadto farmakoterapię prowadzono również fluwoksaminą, fluoksetyną i paroksetyną. Średni czas pobytu w szpitalu pacjentek stosujących te leki wyniósł 35 dni. Podobnie jak w przypadku pacjentek leczonych preparatami z grupy TLPD, początkowy poziom kortyzolu bardzo często determinował czasookres pobytu w szpitalu. W szczególności było to widoczne w przypadku pacjentek, których hospitalizacja trwała około 20 dni. Stężenie oznaczanego hormonu ulegało obniżeniu po trzech dniach od rozpoczęcia terapii i nie ulegało ponownemu podwyższeniu, co ilustrują diagramy przedstawione na Rys. 13 i 14.



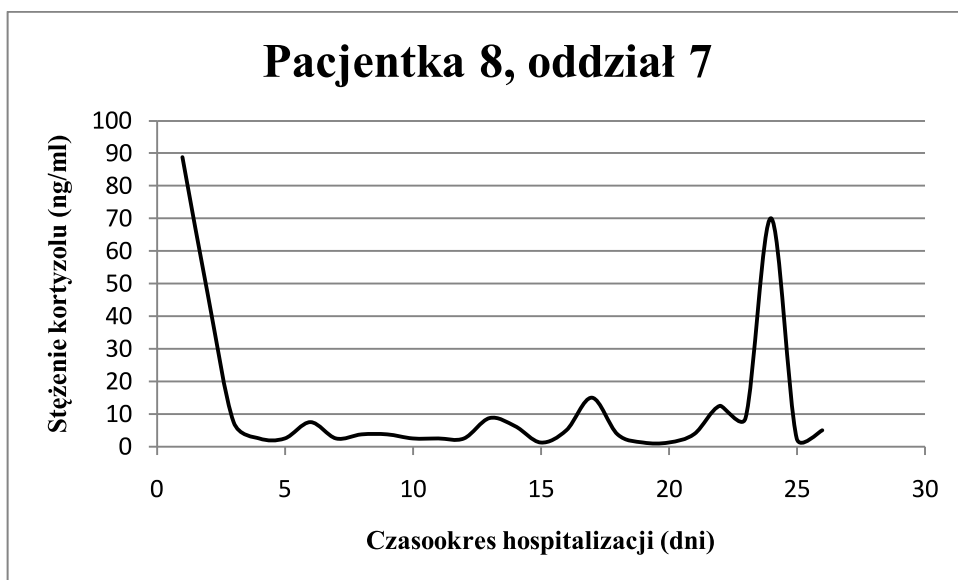
Rys. 13 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii escitalopramem



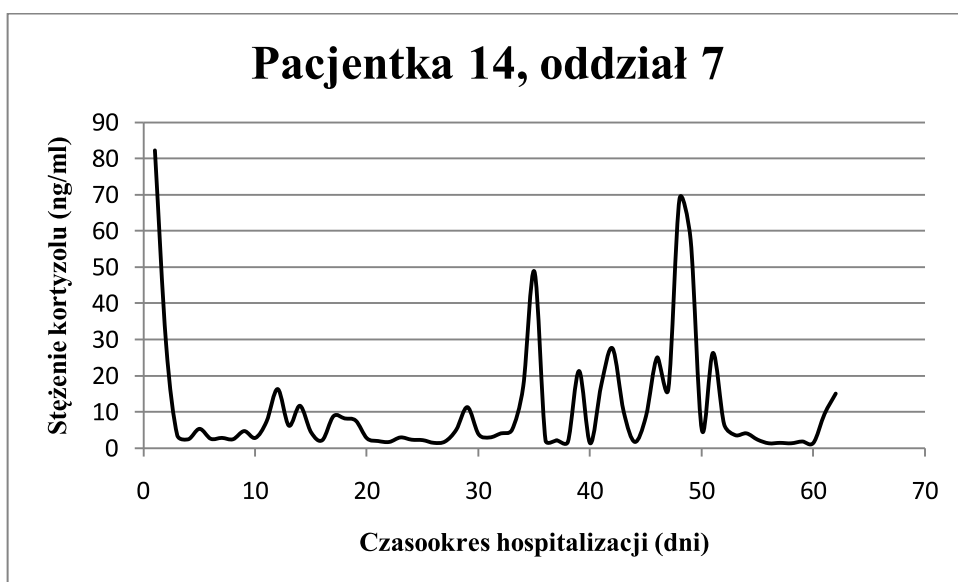
Rys. 14 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii sertralina

Na podstawie wyników zestawionych w Tabelach 15 – 19 można stwierdzić, że zmiany poziomu kortyzolu w ślinie pacjentek stosujących leki z grupy SSRI kształtowały się na dwa sposoby. W przypadku pacjentek, u których stężenie hormonu w pierwszych dniach hospitalizacji było bardzo wysokie (powyżej 60 ng/ml), najczęściej w przebiegu 3. do 6. dni poziom kortyzolu ulegał stopniowemu obniżeniu do wartości referencyjnych. Jednakże po kilku dniach stabilizacji stężenie analitu ulegało ponownie podwyższeniu do wartości nieznacznie przekraczających te oznaczane w ślinie zdrowych ochotników. Ponadto w wielu przypadkach zauważono, że po około 30. dniach hospitalizacji następuje znaczny wzrost

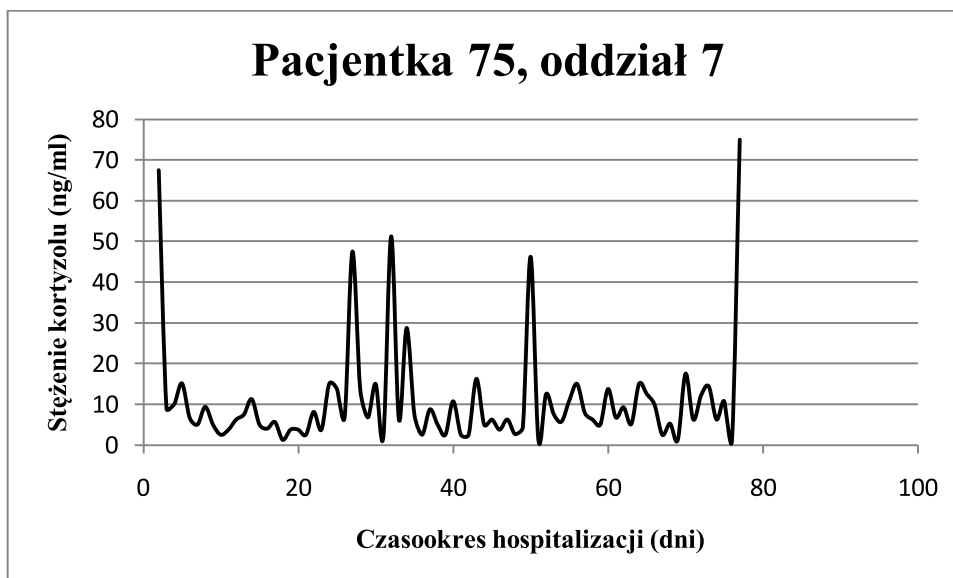
wydzielania kortyzolu, podobnie jak to miało miejsce u pacjentek stosujących leki przeciwdepresyjne z grupy TLPD. Jednak w tym przypadku nie zaobserwowano stabilizacji poziomu hormonu. Ulegał on obniżeniu, lecz oznaczane wartości przekraczały referencyjne oraz wykazywały znaczne wahania. Rys. 15 - 17 ilustrują graficznie zmiany poziomu kortyzolu w ślinie pacjentek, u których początkowe stężenie hormonu przekroczyło 60 ng/ml.



Rys. 15 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii citalopramem



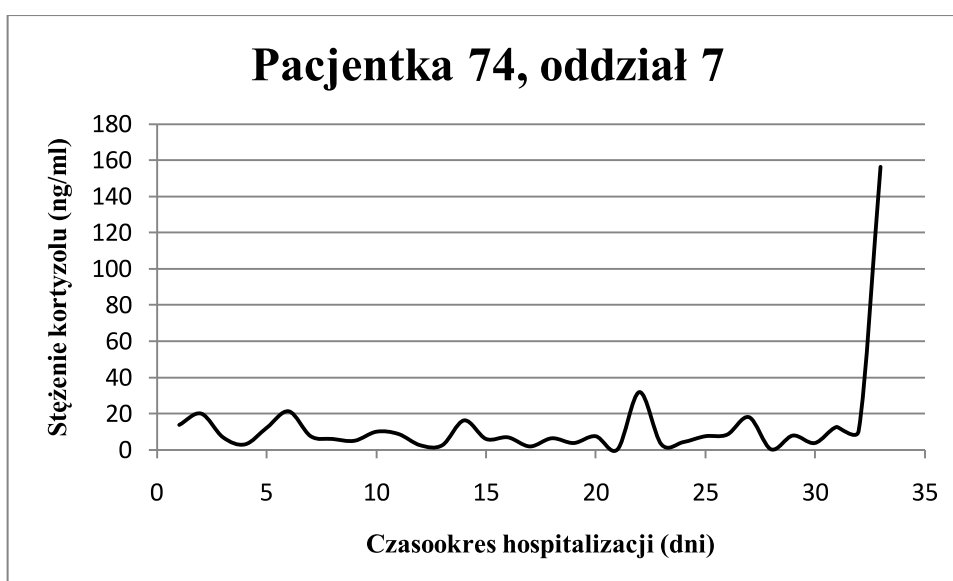
Rys. 16 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii citalopramem



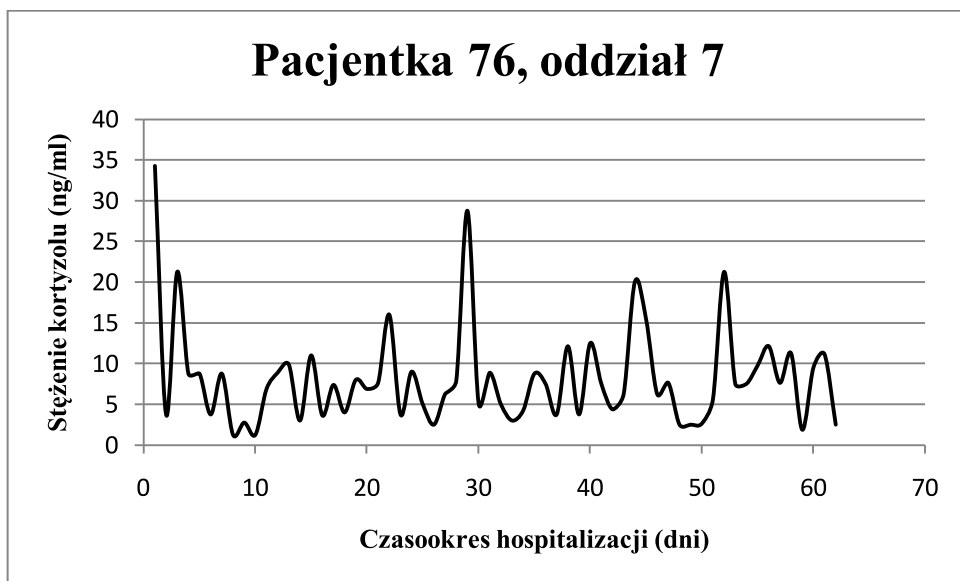
Rys. 17 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii sertralina

W przypadku pacjentek, u których w początkowym okresie leczenia poziom kortyzolu był nieznacznie podwyższony (poniżej 60 ng/ml), zaobserwowano, iż przez cały okres hospitalizacji stężenie hormonu oscyluje w granicach 15 ng/ml, przy czym jego amplituda jest niewielka. W kilku przypadkach, gdy leczenie trwało dłużej, po około 30. dniach terapii następował gwałtowny wzrost wydzielania hormonu, co miało również miejsce u pacjentek, u których początkowe stężenie kortyzolu znacznie przekraczało wartości referencyjne. Również w przypadku probantek o niższym wyjściowym stężeniu hormonu, poziom kortyzolu był najczęściej niższy od jego wartości oznaczonych w pierwszych dniach pobytu w szpitalu.

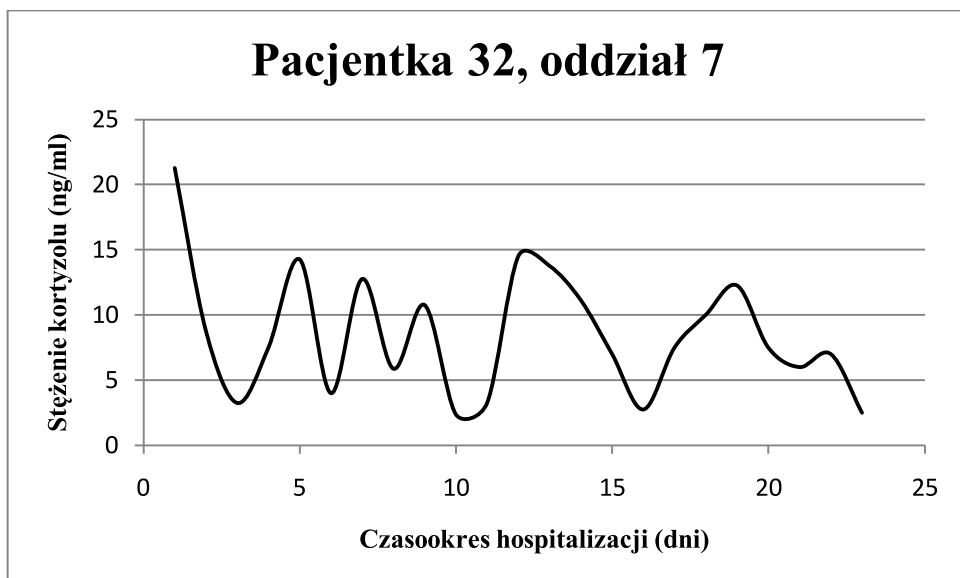
Rys. 18 - 20 przedstawiają zmiany poziomu kortyzolu w ślinie pacjentek, u których wyjściowe stężenie hormonu wynosiło poniżej 60 ng/ml.



Rys. 18 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii sertralina



Rys. 19 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii citalopramem



Rys. 20 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii escitalopramem

Tabela 15. Wyniki analizy poziomu kortyzolu u pacjentek leczonych citalopramem

Citalopram													
Pacjentka 1, oddział 7		Pacjentka 8, oddział 7		Pacjentka 14, oddział 7		Pacjentka 34, oddział 7		Pacjentka 76, oddział 7		Pacjentka 78, oddział 7		Pacjentka 79, oddział 7	
Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)
29.02.	22,450	07.04.	88,750	24.04.	82,245	21.12.	42,750	10.08.	34,250	09.09.	93,250	11.09.	52,500
06.03.	2,500	08.04.	46,250	25.04.	28,750	07.01.	33,750	18.08.	3,750	10.09.	15,000	12.09.	22,500
07.03.	6,250	09.04.	7,500	26.04.	3,500	08.01.	26,250	19.08.	21,250	11.09.	20,000	13.09.	12,750
08.03.	6,250	10.04.	2,500	27.04.	2,375	09.01.	26,250	20.08.	8,750	12.09.	52,500	14.09.	4,375
09.03.	2,500	11.04.	2,500	28.04.	5,250	11.01.	28,750	21.08.	8,750	13.09.	18,750	15.09.	6,250
10.03.	4,500	12.04.	7,500	29.04.	2,500	12.01.	8,000	22.08.	3,750	14.09.	23,750	16.09.	3,750
11.03.	7,500	13.04.	2,500	30.04.	2,750	13.01.	16,250	23.08.	8,750	15.09.	20,000	17.09.	5,000
12.03.	4,250	14.04.	3,750	02.05.	2,375	15.01.	16,250	24.08.	1,250	16.09.	90,000	18.09.	18,750
13.03.	5,625	15.04.	3,750	04.05.	4,625	16.01.	15,000	25.08.	2,750	17.09.	18,750	19.09.	17,500
14.03.	2,750	16.04.	2,500	05.05.	2,750	17.01.	10,000	26.08.	1,250	18.09.	13,750	20.09.	12,500
15.03.	13,750	17.04.	2,500	06.05.	7,250	18.01.	6,250	27.08.	6,875	19.09.	11,250	21.09.	3,750
16.03.	5,375	18.04.	2,500	07.05.	16,250	19.01.	12,375	28.08.	8,875	20.09.	3,875	22.09.	7,500
17.03.	2,500	19.04.	8,750	08.05.	6,125	20.01.	6,750	29.08.	9,875	21.09.	22,500	23.09.	16,875
20.03.	3,750	20.04.	6,250	09.05.	11,625	21.01.	8,000	30.08.	3,000	22.09.	52,500	24.09.	3,750
21.03.	3,750	22.04.	1,250	10.05.	4,250	22.01.	16,250	01.09.	11,000	23.09.	5,625	25.09.	14,375
25.03.	0,625	24.04.	5,000	11.05.	2,125			02.09.	3,625	24.09.	13,750	26.09.	13,750
26.03.	1,500	25.04.	15,000	12.05.	8,750			03.09.	7,375	25.09.	7,500	27.09.	7,625
27.03.	6,500	28.04.	3,750	13.05.	8,125			04.09.	4,000	26.09.	33,750	28.09.	2,500

29.03.	2,000	29.04.	1,250	14.05.	7,500				05.09.	8,000	27.09.	1,250	29.09.	8,250
30.03.	18,750	30.04.	1,250	15.05.	2,625				06.09.	6,875	28.09.	22,500	30.09.	7,500
31.03.	2,125	05.05.	3,875	16.05.	1,875				07.09.	7,625	29.09.	26,250	01.10.	8,750
01.04.	1,625	06.05.	12,500	17.05.	1,625				08.09.	16,000	30.09.	5,000	02.10.	8,750
02.04.	0,625	07.05.	8,750	18.05.	2,875				09.09.	3,750	01.10.	7,500	03.10.	15,000
03.04.	1,250	08.05.	70,000	19.05.	2,250				10.09.	9,000	02.10.	8,750	04.10.	7,500
04.04.	3,750	09.05.	2,500	20.05.	2,125				11.09.	5,000	03.10.	10,000	05.10.	15,000
07.04.	1,250	12.05.	5,000	21.05.	1,375				12.09.	2,500	04.10.	3,750	06.10.	49,500
08.04.	8,750			22.05.	1,750				13.09.	6,250	05.10.	1,250	07.10.	17,500
09.04.	1,250			23.05.	5,000				14.09.	7,875	06.10.	3,875	08.10.	11,875
10.04.	0,625			24.05.	11,250				15.09.	28,750			09.10.	8,750
				25.05.	3,750				16.09.	5,125			10.10.	8,750
				27.05.	2,875				17.09.	8,875			11.10.	10,000
				28.05.	4,000				18.09.	5,000			12.10.	28,750
				29.05.	5,000				19.09.	3,000			13.10.	20,000
				30.05.	17,000				20.09.	4,250			14.10.	48,750
				31.05.	48,750				21.09.	8,750			15.10.	10,000
				03.06.	2,000				22.09.	7,500			16.10.	11,625
				04.06.	2,125				24.09.	3,750			17.10.	10,000
				05.06.	1,625				26.09.	12,125			18.10.	16,250
				06.06.	21,250				27.09.	3,750			19.10.	8,750
				07.06.	1,250				28.09.	12,500			20.10.	6,250

Tabela 16. Wyniki analizy poziomu kortyzolu u pacjentek leczonych escitalopramem

Escitalopram											
Pacjentka 4, oddział 7		Pacjentka 30, oddział 7		Pacjentka 32, oddział 7		Pacjentka 33, oddział 7		Pacjentka 56, oddział 7			
Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)		
28.02.	98,500	01.12.	21,750	30.12.	21,250	03.01.	23,250	22.04.	72,525		
06.03.	95,000	05.12.	20,000	07.01.	8,750	07.01.	17,500	06.05.	9,375		
07.03.	10,000	06.12.	19,700	08.01.	3,250	08.01.	16,250	07.05.	11,250		
08.03.	37,500	07.12.	14,500	09.01.	7,500	09.01.	12,750	08.05.	4,500		
09.03.	82,500	08.12.	10,375	11.01.	14,250	11.01.	13,125	09.05.	9,500		
10.03.	37,500	09.12.	9,000	12.01.	4,000	12.01.	13,750	10.05.	7,875		
11.03.	25,000	12.12.	10,000	13.01.	12,750	13.01.	17,500	11.05.	7,625		
12.03.	2,500	14.12.	5,750	14.01.	5,875	14.01.	16,250	13.05.	5,875		
13.03.	1,250	15.12.	5,500	15.01.	10,750	15.01.	10,750	14.05.	8,125		
14.03.	2,500	16.12.	8,000	16.01.	2,375	17.01.	6,125	15.05.	11,250		
15.03.	1,750			17.01.	3,250	18.01.	10,250	16.05.	3,750		
16.03.	1,250			18.01.	14,500	19.01.	15,000	17.05.	8,875		
17.03.	1,250			19.01.	13,750	20.01.	11,250	18.05.	4,625		
18.03.	1,250			20.01.	11,125	21.01.	20,000	19.05.	7,125		
19.03.	1,875			21.01.	7,000	22.01.	8,000	21.05.	3,500		
20.03.	10,750			23.01.	2,750	24.01.	8,625	22.05.	5,875		
25.03.	1,250			24.01.	7,500	25.01.	9,750	26.05.	1,250		
26.03.	1,375			25.01.	10,000	26.01.	8,500	28.05.	7,500		

27.03.	1,750					26.01.	12,250	27.01.	3,750	29.05.	5,000
28.03.	2,500					27.01.	7,500	28.01.	7,750	30.05.	7,000
29.03.	1,625					28.01.	6,000	30.01.	5,875	02.06.	13,125
30.03.	1,750					29.01.	7,000	31.01.	5,125	03.06.	7,125
31.03.	4,500					02.02.	2,500	01.02.	5,500	04.06.	9,375
01.04.	1,750							02.02.	3,750	05.06.	10,000
02.04.	1,750							03.02.	8,000	06.06.	6,250
03.04.	2,500							04.02.	4,000	07.06.	7,625
04.04.	1,875							05.02.	2,875	08.06.	1,875
05.04.	1,250							06.02.	7,125	09.06.	3,375
07.04.	3,750									11.06.	1,250
08.04.	2,125									13.06.	3,750
09.04.	1,375									15.06.	58,750
10.04.	1,750									16.06.	10,000
11.04.	1,750									17.06.	2,500
14.04.	10,125										
15.04.	10,000										
16.04.	5,000										
17.04.	3,750										

Tabela 17. Wyniki analizy poziomu kortyzolu u pacjentek leczonych fluoksetyną, fluwoksaminą i paroksetyną

Fluoksetyna		Fluwoksamina						Paroksetyna			
Pacjentka 81, oddział 7		Pacjentka 43, oddział 7		Pacjentka 47, oddział 7		Pacjentka 49, oddział 7		Pacjentka 7, oddział 9		Pacjentka 36, oddział 7	
Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)
15.09.	2,500	10.02.	49,750	21.02.	31,500	24.02.	49,375	04.04.	47,500	12.01.	89,000
16.09.	3,750	11.02.	39,500	02.03.	22,375	02.03.	10,875	05.04.	42,500	14.01.	27,500
		12.02.	12,500	03.03.	19,750	03.03.	42,500	06.04.	21,250	15.01.	18,750
		13.02.	11,250	04.03.	7,500	04.03.	11,750	07.04.	17,500	16.01.	20,000
		14.02.	45,000	05.03.	5,625	05.03.	11,250	08.04.	28,750	17.01.	17,500
		15.02.	7,3375	06.03.	5,250	06.03.	7,500	09.04.	20,000	18.01.	6,000
		16.02.	25,000	07.03.	7,500	07.03.	6,625	10.04.	9,500	19.01.	6,250
		18.02.	17,500	08.03.	20,000	08.03.	7,000	11.04.	10,000	20.01.	95,000
		19.02.	8,000	10.03.	12,875	10.03.	3,750	12.04.	17,500	21.01.	8,750
		20.02.	17,250	11.03.	8,875	11.03.	7,250	13.04.	18,750	22.01.	12,625
		21.02.	17,625	13.03.	3,125	12.03.	2,750	14.04.	13,750	23.01.	6,625
		22.02.	13,000	16.03.	19,750	13.03.	18,750	15.04.	20,000	24.01.	6,375
		23.02.	14,000	17.03.	26,250	14.03.	9,625	17.04.	35,000	25.01.	8,625
		24.02.	9,750	18.03.	20,000	15.03.	5,375	18.04.	13,750	26.01.	5,875
				19.03.	8,125	16.03.	11,625	20.04.	17,500	27.01.	5,000
				20.03.	16,250	17.03.	12,000	21.04.	3,750	28.01.	8,125
				21.03.	7,500	18.03.	9,000	22.04.	20,000	29.01.	4,625
				23.03.	10,000	19.03.	9,250	23.04.	3,750	30.01.	3,875
				24.03.	10,000	20.03.	11,875	24.04.	17,500	01.02.	10,000

Tabela 18. Wyniki analizy poziomu kortyzolu u pacjentek leczonych sertralina

Sertralina											
Pacjentka 11, oddział 7		Pacjentka 74, oddział 7		Pacjentka 75, oddział 7		Pacjentka 77, oddział 7		Pacjentka 82, oddział 7		Pacjentka 87, oddział 7	
Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)
21.04.	15,750	28.07.	13,750	30.07.	69,500	18.08.	8,250	15.09.	10,000	01.11.	14,000
25.04.	2,875	29.07.	20,000	31.07.	67,500	19.08.	2,500	16.09.	10,625	10.11.	13,625
26.04.	2,750	30.07.	6,875	01.08.	8,875	21.08.	4,250	17.09.	10,000	11.11.	8,250
27.04.	2,875	31.07.	3,000	02.08.	10,000	22.08.	6,250	18.09.	10,000	12.11.	8,875
28.04.	3,625	01.08.	12,250	03.08.	15,125	23.08.	6,250	19.09.	7,875	13.11.	8,875
29.04.	4,250	02.08.	21,250	04.08.	6,625	24.08.	10,000	20.09.	6,250	14.11.	13,750
30.04.	3,375	03.08.	7,500	05.08.	5,000	25.08.	3,125	21.09.	3,125	15.11.	6,875
02.05.	1,250	04.08.	6,000	06.08.	9,375	26.08.	6,250	22.09.	2,250	16.11.	2,500
03.05.	10,000	05.08.	5,000	07.08.	5,000	27.08.	1,500	23.09.	19,625	17.11.	4,500
04.05.	1,875	06.08.	10,000	08.08.	2,500	28.08.	10,000	24.09.	2,625	18.11.	2,000
05.05.	3,500	07.08.	8,750	09.08.	3,750	29.08.	1,750	25.09.	17,000	19.11.	5,125
06.05.	3,125	08.08.	2,500	10.08.	6,250	30.08.	0,250	26.09.	9,125	20.11.	2,500
07.05.	10,000	09.08.	2,500	11.08.	7,500			27.09.	5,750	21.11.	5,750
08.05.	2,250	10.08.	16,250	12.08.	11,250			28.09.	6,875	22.11.	3,000
09.05.	1,250	12.08.	6,000	13.08.	5,000			29.09.	7,500	23.11.	3,625
11.05.	3,125	13.08.	6,875	14.08.	4,000			30.09.	7,500	24.11.	3,750
12.05.	3,750	14.08.	1,875	15.08.	5,625			01.10.	7,500	25.11.	2,625
13.05.	2,500	15.08.	6,375	16.08.	1,250			02.10.	7,750		
14.05.	2,125	16.08.	3,750	17.08.	3,750			03.10.	5,125		
15.05.	2,500	17.08.	7,500	18.08.	3,750			04.10.	6,500		
16.05.	5,000	18.08.	0,250	19.08.	2,500			05.10.	6,500		
17.05.	1,750	19.08.	31,875	20.08.	8,125			06.10.	2,500		
18.05.	1,250	20.08.	3,000	21.08.	3,750			07.10.	2,250		
19.05.	1,250	21.08.	4,250	22.08.	15,000			08.10.	10,125		
20.05.	10,000	22.08.	7,500	23.08.	13,750			09.10.	13,750		
21.05.	25,000	23.08.	8,375	24.08.	6,875			10.10.	18,625		
22.05.	42,500	24.08.	18,000	25.08.	47,500			11.10.	10,000		
23.05.	1,250	25.08.	0,300	26.08.	13,750			12.10.	10,000		
24.05.	2,000	26.08.	7,875	27.08.	6,750			13.10.	3,250		
25.05.	1,750	27.08.	3,750	30.08.	15,000			14.10.	10,000		
26.05.	2,500	28.08.	12,625	01.09.	2,125			16.10.	5,000		
27.05.	4,500	29.08.	10,375	03.09.	51,250			17.10.	8,750		
28.05.	2,500	30.08.	156,250	04.09.	6,250			18.10.	12,500		
29.05.	2,500			05.09.	28,750			19.10.	7,500		

02.06.	2,750			06.09.	7,500			20.10.	6,250		
03.06.	7,625			07.09.	2,500			21.10.	3,625		
04.06.	3,750			08.09.	8,750			22.10.	3,375		
05.06.	3,375			09.09.	5,000			23.10.	6,375		
09.06.	3,375			10.09.	2,500			25.10.	3,750		
11.06.	3,125			11.09.	10,750			26.10.	7,500		
12.06.	2,000			12.09.	2,500			27.10.	7,875		
13.06.	4,000			13.09.	2,500			28.10.	13,250		
14.06.	2,875			14.09.	16,250			29.10.	5,000		
15.06.	3,500			15.09.	5,000			30.10.	2,500		
16.06.	4,250			16.09.	6,250			31.10.	6,250		
17.06.	4,000			17.09.	3,750			01.11.	6,000		
18.06.	4,750			18.09.	6,250			02.11.	5,500		
				19.09.	2,625			03.11.	6,250		
				20.09.	4,375			04.11.	4,125		
				22.09.	46,250			05.11.	8,750		
				23.09.	1,375			06.11.	5,625		
				24.09.	12,500			07.11.	6,875		
				25.09.	7,500			08.11.	3,375		
				26.09.	5,750			09.11.	4,375		
				27.09.	10,950			10.11.	10,625		
				28.09.	15,000			11.11.	8,000		
				29.09.	7,875			12.11.	4,375		
				30.09.	6,250			13.11.	2,375		
				01.10.	5,000			14.11.	6,875		
				02.10.	13,750			15.11.	15,000		
				03.10.	6,750			16.11.	27,125		
				04.10.	9,250			17.11.	6,750		
				05.10.	5,125			18.11.	9,375		
				06.10.	15,000			19.11.	10,750		
				07.10.	12,500			20.11.	5,625		
				08.10.	9,875			21.11.	5,500		
				09.10.	2,500			22.11.	9,625		
				10.10.	5,250			23.11.	8,875		
				11.10.	1,250			25.11.	4,125		
				12.10.	17,500			26.11.	8,000		
				13.10.	6,250			27.11.	3,8125		
				14.10.	12,125			28.11.	3,750		
				15.10.	14,375			29.11.	10,625		

				17.10.	6,250			30.11.	2,500		
				18.10.	10,750						
				19.10.	1,250						
				20.10.	75,000						

Tabela 19. Wyniki analizy poziomu kortyzolu u pacjentek leczonych sertralina

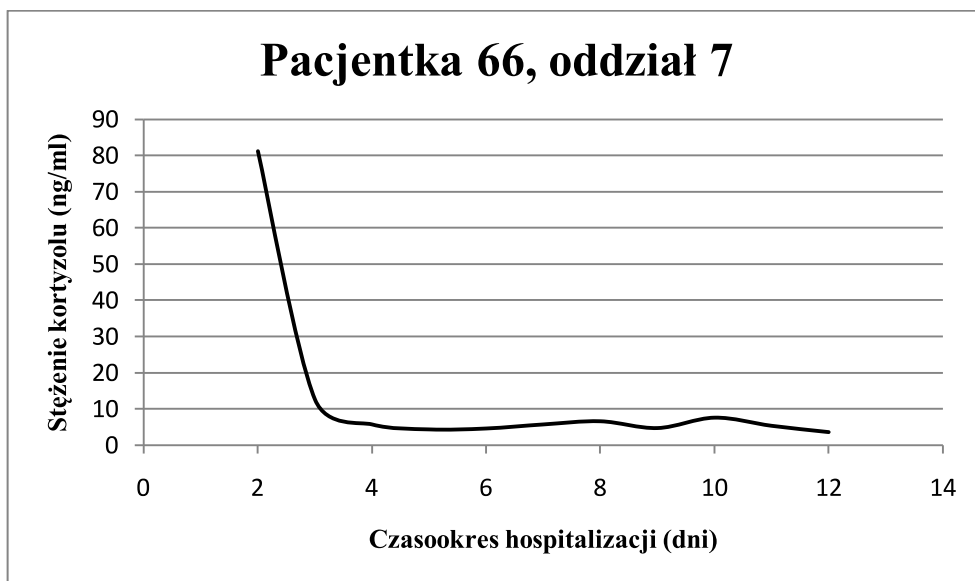
Sertralina							
Pacjentka 6, oddział 9		Pacjentka 9, oddział 9		Pacjentka 11, oddział 9		Pacjentka 16, oddział 9	
Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)
04.04.	190,000	11.04.	45,000	27.06.	23,500	26.06.	4,625
05.04.	48,750	12.04.	5,000	28.06.	15,625	27.06.	5,750
06.04.	22,500	13.04.	2,500	29.06.	20,000	28.06.	10,125
07.04.	12,500	14.04.	7,500	30.06.	10,000	29.06.	3,750
08.04.	27,500	15.04.	8,750	01.07.	3,750	30.06.	6,625
09.04.	10,000			02.07.	10,000	03.07.	9,375
10.04.	6,250			03.07.	8,000	04.07.	7,750
11.04.	10,000			04.07.	17,500	05.07.	3,750
12.04.	55,000			05.07.	6,750	06.07.	10,875
13.04.	11,250			06.07.	4,250	07.07.	5,375
14.04.	7,500			07.07.	3,750	08.07.	5,000
15.04.	11,250			08.07.	6,9375	09.07.	4,625
16.04.	3,750			09.07.	2,250	10.07.	3,250
17.04.	0,750			10.07.	5,500	11.07.	12,375
18.04.	17,500			11.07.	6,750	12.07.	11,250
19.04.	20,000					13.07.	10,500
20.04.	1,250					14.07.	10,750
21.04.	23,750					15.07.	4,250
22.04.	1,500					16.07.	4,000
23.04.	5,000					17.07.	7,500
24.04.	7,500					18.07.	7,625
26.04.	3,750					19.07.	7,125
28.04.	5,000					20.07.	7,000
29.04.	65,000					21.07.	10,000
						22.07.	7,125
						23.07.	9,000
						24.07.	9,750
						25.07.	9,625
						26.07.	4,125
						27.07.	7,750

						28.07.	45,000
						29.07.	6,625
						01.08.	10,000
						02.08.	2,875
						03.08.	1,875
						04.08.	1,250
						05.08.	3,250

4.3.3. Wpływ SNRI na wydzielanie kortyzolu

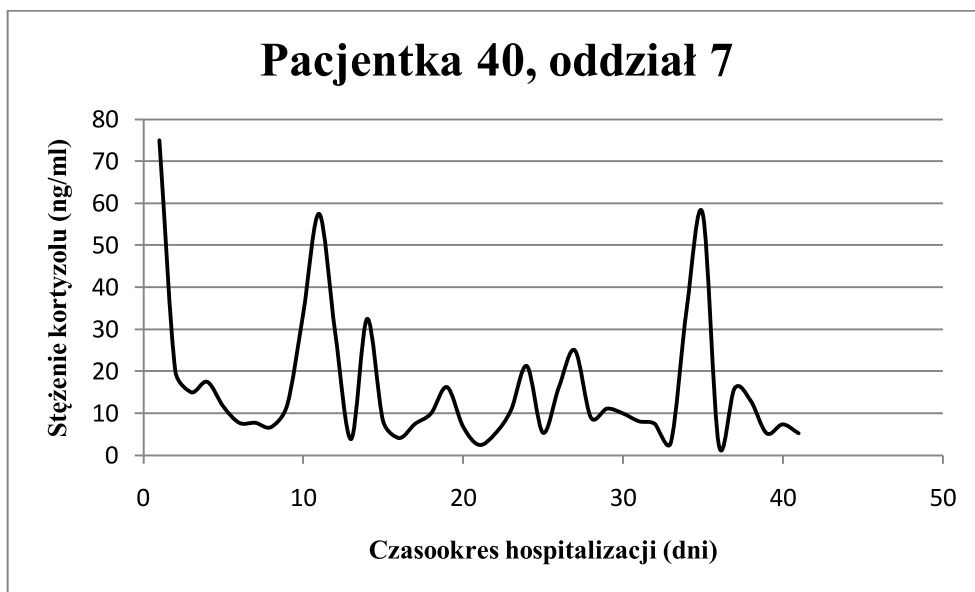
Spośród badanych pacjentek, 15. stosowało wenlafaksynę, lek należący do grupy SNRI. Średni czas hospitalizacji wyniósł 48 dni. Podobnie jak we wcześniej omawianych grupach leków, wpływ wenlafaksyny na poziom kortyzolu kształtował się w różny sposób, co obrazują wyniki oznaczania hormonu w ślinie pacjentek leczonych wspomnianym preparatem, zebrane w Tabelach 20 – 22. Na ich podstawie można zauważyć, że w przypadku wenlafaksyny wykryto zróżnicowane działanie leku na wydzielanie kortyzolu.

U niektórych pacjentek, stężenie hormonu szybko ulegało obniżeniu do wartości referencyjnych, w związku z czym czas ich pobytu w szpitalu nie przekroczył 20. dni. Ponadto stwierdzono, że stabilizacja poziomu hormonu była trwała. Podobny rozkład zmian stężenia obserwowano podczas stosowania wcześniej omówionych preparatów, m.in. amitryptyliny, sertraliny i escitalopramu. Na Rys. 21 zilustrowano zmiany stężenia kortyzolu w ślinie pacjentki o symbolu 66, której okres hospitalizacji wyniósł 18 dni. Zaobserwowano, iż poziom kortyzolu w ciągu dwóch pierwszych dni obniżył się do wartości referencyjnych obserwowanych u zdrowych ochotników.

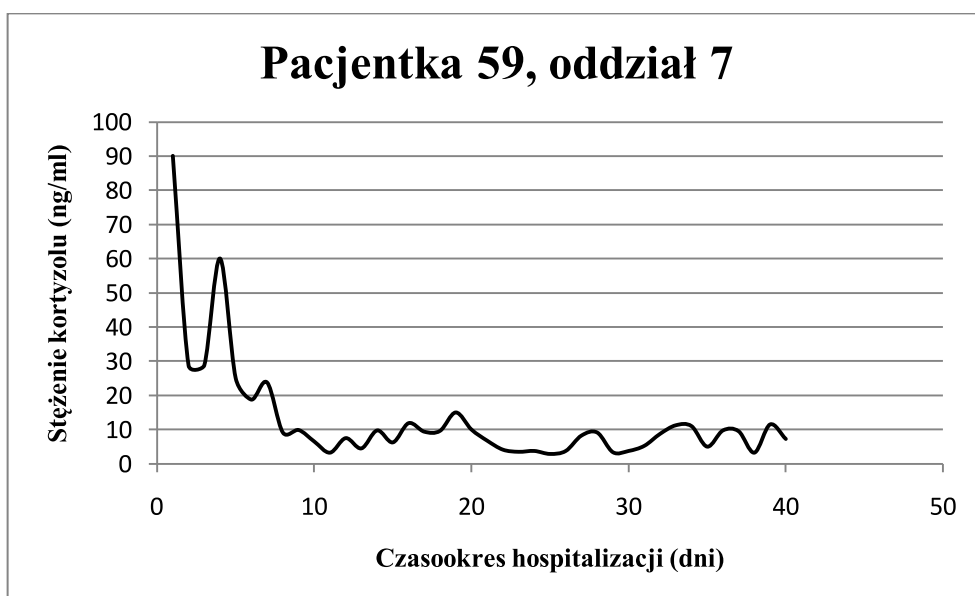


Rys. 21 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii wenlafaksyną

W przypadku pacjentek, u których stężenie kortyzolu obniżało się wolniej, a okres hospitalizacji trwał kilkadziesiąt dni, stwierdzono kilka typów zmian poziomu hormonu. Gdy początkowe stężenie hormonu było wysokie (powyżej 60 ng/ml), wówczas w ciągu kilkunastu dni terapii (12 – 16 dni) poziom hormonu obniżał się stopniowo do wartości referencyjnych. Jednakże już w kilka dni po osiągnięciu wartości referencyjnych, poziom kortyzolu ulegał ponownemu podwyższeniu. Rys. 22 ilustruje typ zmian poziomu hormonu, podczas którego obserwowano, iż po okresie względnej stabilizacji wydzielania kortyzolu, następują ponowne duże wahania jego stężenia. Można jednak zauważyć, że wydzielanie hormonu nie jest już tak nasilone, jak miało to miejsce w początkowej fazie leczenia. Podobne zmiany poziomu kortyzolu obserwowano u pacjentki o symbolu 59, co obrazuje Rys. 23. Również w tym przypadku stężenie hormonu ulega bardzo powolnemu obniżeniu (15 dni), a podczas całego procesu leczenia jego poziom wahał się.



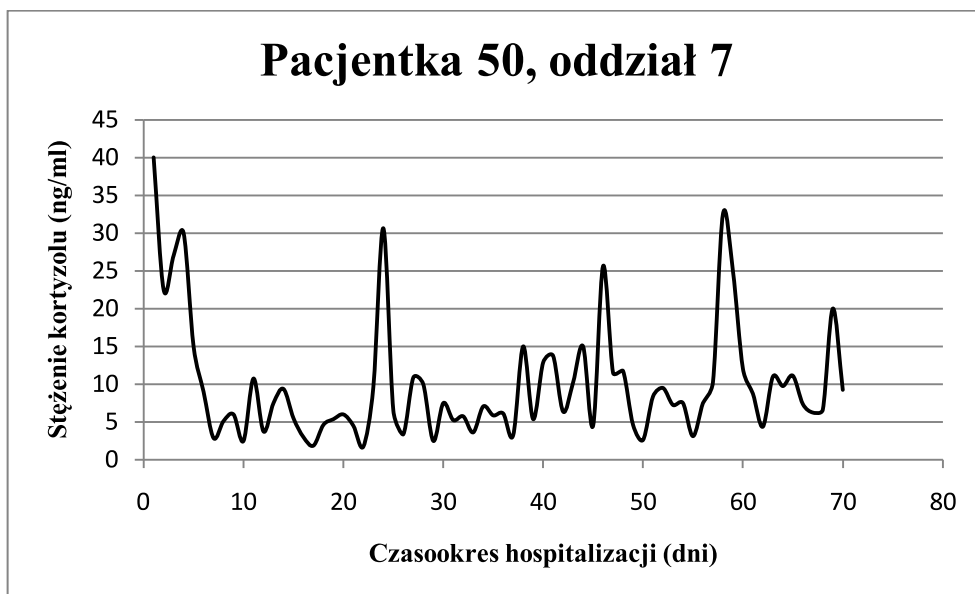
Rys. 22 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii wenlafaksyną



Rys. 23 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii wenlafaksyną

W przypadku pacjentek, u których w początkowym okresie leczenia stężenie kortyzolu w ślinie wynosiło około 40 ng/ml, obserwowano szybsze jego obniżenie do wartości referencyjnych, jednakże również w tym przypadku nie następowała stabilizacja, lecz poziom hormonu wahał się. Ten typ zmian prezentuje Rys. 24, z którego wynika, iż w przez cały czasookres hospitalizacji, mimo często obserwowanego wzrostu wydzielania kortyzolu, jego poziom nie przekroczył wartości oznaczonych w pierwszych dniach terapii.

Należy podkreślić, iż w przypadku pacjentek leczonych wenlafaksyną, w sposób szczególny uwydatnia się wpływ kortyzolu na czas trwania hospitalizacji. W często obserwowanych sytuacjach, poziom oznaczanego hormonu ulegał dużym wahaniom, w związku z czym okres pobytu pacjentek w szpitalu przekraczał 60 dni.



Rys. 24 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii wenlafaksyną

Tabela 20. Wyniki analizy poziomu kortyzolu u pacjentek leczonych wenlafaksyną

Wenlafaksyna					
Pacjentka 3, oddział 9		Pacjentka 5, oddział 9		Pacjentka 8, oddział 9	
Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)
06.03.	173,625	07.04.	158,750	07.04.	41,250
07.03.	6,250	08.04.	5,000	08.04.	7,500
08.03.	6,250	09.04.	25,000	09.04.	1,625
09.03.	5,625	10.04.	7,500	10.04.	7,500
10.03.	3,750	11.04.	7,500	12.04.	2,500
11.03.	2,500	12.04.	2,500	14.04.	40,000
12.03.	2,500	13.04.	5,000	15.04.	6,250
13.03.	1,125	14.04.	3,750	16.04.	5,000
14.03.	0,250	15.04.	2,500	17.04.	11,250
15.03.	67,500	16.04.	6,250	18.04.	3,750
16.03.	6,625	17.04.	22,500	20.04.	7,000
17.03.	77,500	18.04.	3,750	21.04.	36,250
18.03.	40,000	19.04.	5,000	22.04.	2,500

19.03.	23,250	20.04.	2,750	23.04.	22,500
20.03.	6,250	21.04.	13,750	24.04.	18,750
21.03.	1,250	22.04.	5,000	25.04.	17,500
22.03.	5,000	23.04.	31,250	02.05.	2,875
23.03.	0,250	24.04.	11,250	03.05.	5,000
24.03.	1,250			06.05.	8,750
25.03.	2,500				
26.03.	2,500				
27.03.	9,750				
28.03.	9,750				
29.03.	3,750				
30.03.	0,250				
31.03.	1,750				
01.04.	10,375				
02.04.	40,000				
03.04.	30,000				
04.04.	8,750				
05.04.	3,125				
06.04.	18,750				
07.04.	15,000				
08.04.	5,000				
09.04.	20,000				
10.04.	3,750				
11.04.	35,000				
12.04.	5,000				
14.04.	3,750				
15.04.	1,250				
16.04.	8,750				
17.04.	1,250				
18.04.	8,125				
20.04.	5,000				
21.04.	18,750				
22.04.	1,000				
23.04.	7,500				
24.04.	5,000				
25.04.	0,250				
27.04.	10,000				
28.04.	2,500				

29.04.	6,250				
30.04.	11,250				
01.05.	8,750				
02.05.	17,500				
03.05.	1,125				
05.05.	7,500				
06.05.	7,500				
07.05.	2,500				
08.05.	0,025				

Tabela 21. Wyniki analizy poziomu kortyzolu u pacjentek leczonych wenlafaksyną

Wenlafaksyna													
Pacjentka 15 oddział 7		Pacjentka 24, oddział 7		Pacjentka 31, oddział 7		Pacjentka 35, oddział 7		Pacjentka 40, oddział 7		Pacjentka 50, oddział 7			
Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)		
24.04.	15,000	18.07.	24,750	23.12.	372,500	28.12.	91,500	15.01.	75,000	29.02.	40,000		
25.04.	32,500	30.07.	17,500	30.12.	363,750	07.01.	32,500	21.01.	20,000	02.03.	22,500		
26.04.	16,250	04.08.	17,125	31.12.	73,750	08.01.	5,500	22.01.	15,000	03.03.	27,000		
27.04.	27,500	05.08.	3,750	02.01.	176,250	09.01.	6,125	24.01.	17,500	04.03.	30,000		
28.04.	8,750	07.08.	1,250	03.01.	143,750	11.01.	83,750	26.01.	11,625	05.03.	15,000		
29.04.	6,250	11.08.	13,125	04.01.	49,625	12.01.	73,750	27.01.	7,750	06.03.	9,000		
30.04.	3,750	12.08.	10,000	05.01.	32,000	13.01.	50,000	28.01.	7,750	07.03.	2,875		
02.05.	1,250	13.08.	9,000	06.01.	50,000	14.01.	61,250	29.01.	6,750	08.03.	5,125		
03.05.	5,000			07.01.	17,500	15.01.	63,250	30.01.	12,000	11.03.	6,000		
04.05.	2,500			08.01.	15,000	16.01.	36,250	31.01.	33,750	12.03.	2,500		
05.05.	1,250			09.01.	10,250	17.01.	17,500	01.02.	57,500	13.03.	10,750		
06.05.	1,250			11.01.	7,500	18.01.	6,250	02.02.	29,250	15.03.	3,750		
07.05.	6,250			12.01.	8,375	19.01.	11,875	03.02.	3,875	16.03.	7,500		
08.05.	1,250			13.01.	9,125	20.01.	20,000	04.02.	32,500	17.03.	9,375		
09.05.	1,625			14.01.	7,8125	21.01.	10,875	05.02.	8,125	18.03.	5,500		
10.05.	1,875			15.01.	15,000	22.01.	8,375	06.02.	4,125	19.03.	3,000		
11.05.	15,000			16.01.	8,375	23.01.	9,375	07.02.	7,500	20.03.	1,875		
12.05.	1,750			17.01.	5,250	24.01.	2,500	08.02.	10,000	21.03.	4,625		
13.05.	2,500			18.01.	10,125	25.01.	6,750	09.02.	16,250	22.03.	5,375		
14.05.	1,500			19.01.	9,000	26.01.	11,000	10.02.	6,875	23.03.	6,000		
15.05.	17,500			20.01.	9,500	27.01.	3,125	11.02.	2,500	24.03.	4,500		

16.05.	1,250					21.01.	9,000	28.01.	4,125	12.02.	5,125	25.03.	1,750
17.05.	1,875					22.01.	4,750	01.02.	5,125	13.02.	10,750	26.03.	9,625
18.05.	3,500					23.01.	11,875	02.02.	5,750	14.02.	21,250	27.03.	30,625
19.05.	5,000							03.02.	10,375	15.02.	5,375	28.03.	6,500
20.05.	5,875							04.02.	4,500	16.02.	16,250	29.03.	3,375
21.05.	62,500							05.02.	7,125	17.02.	25,000	30.03.	10,875
22.05.	12,500							06.02.	20,000	18.02.	9,000	31.03.	10,000
23.05.	2,625									19.02.	11,125	01.04.	2,500
24.05.	3,000									20.02.	10,000	02.04.	7,500
25.05.	1,625									21.02.	8,125	03.04.	5,250
26.05.	1,750									22.02.	7,500	04.04.	5,750
27.05.	2,250									23.02.	3,000	05.04.	3,625
28.05.	18,750									24.02.	35,000	06.04.	7,0625
30.05.	5,750									25.02.	57,500	07.04.	5,875
31.05.	2,375									26.02.	2,625	08.04.	6,125
01.06.	5,500									02.03.	16,000	09.04.	3,250
02.06.	7,500									03.03.	13,000	10.04.	15,000
03.06.	7,125									04.03.	5,250	13.04.	5,375
04.06.	3,750									05.03.	7,375	15.04.	12,875
05.06.	13,500									06.03.	5,250	16.04.	13,750
06.06.	3,750											17.04.	6,375
07.06.	3,750											18.04.	10,250
08.06.	4,250											19.04.	15,000
09.06.	3,125											20.04.	4,500
10.06.	2,500											21.04.	25,625

11.06.	2,625																	23.04.	11,500
12.06.	2,875																	24.04.	11,750
13.06.	2,125																	26.04.	4,625
15.06.	9,500																	27.04.	2,625
16.06.	3,750																	29.04.	8,375
17.06.	3,625																	30.04.	9,500
19.06.	5,000																	01.05.	7,250
20.06.	11,250																	02.05.	7,500
21.06.	1,750																	04.05.	3,125
22.06.	11,250																	05.05.	7,500
23.06.	5,625																	06.05.	10,250
25.06.	9,875																	07.05.	32,500
																		08.05.	25,000
																		10.05.	12,0625
																		11.05.	8,750
																		13.05.	4,375
																		14.05.	11,000
																		15.05.	9,750
																		16.05.	11,125
																		17.05.	7,375
																		18.05.	6,250
																		19.05.	6,625
																		21.05.	20,000
																		22.05.	9,250

Tabela 22. Wyniki analizy poziomu kortyzolu u pacjentek leczonych wenlafaksyną

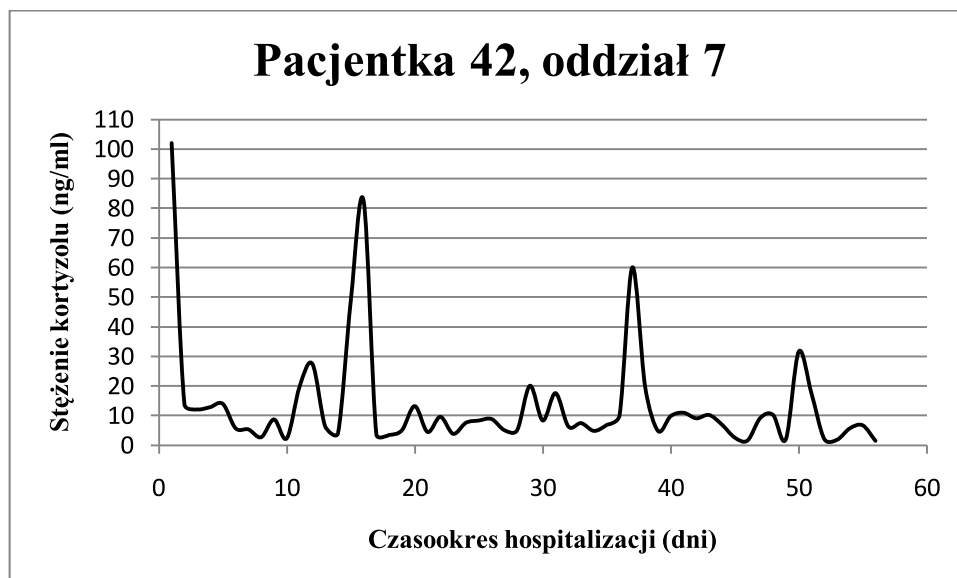
Wenlafaksyna													
Pacjentka 59, oddział 7		Pacjentka 61, oddział 7		Pacjentka 66, oddział 7		Pacjentka 70, oddział 7		Pacjentka 71, oddział 7		Pacjentka 72, oddział 7			
Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)		
01.06.	90,000	28.06	70,000	13.07.	84,750	11.07.	15,000	02.06.	32,750	10.06.	40,000		
02.06.	28,750	06.07.	27,500	14.07.	81,250	27.07	10,875	10.06.	26,500	17.06.	24,750		
04.06.	28,750	07.07	58,750	15.07.	12,500	26.07.	13,625	17.06.	15,625	25.06.	15,500		
06.06.	60,000	08.07.	6,000	16.07.	5,625	29.07.	10,125	25.06.	18,500	30.06.	12,750		
07.06.	25,000	09.07.	3,250	17.07.	4,250	30.07.	2,625	02.07.	12,250	05.07.	17,250		
08.06.	18,750			18.07.	4,500	31.07.	2,375	14.07.	9,500	12.07.	10,750		
09.06.	23,750			23.07.	5,625	01.08.	1,500	22.07.	20,625	20.07.	18,250		
11.06.	9,125			24.07.	6,500	02.08.	3,500	25.07.	22,500	25.07.	8,500		
13.06.	9,875			26.07.	4,625	03.08.	1,625	27.07.	24,500	27.07.	2,500		
15.06.	6,500			27.07.	7,500	04.08.	7,750	28.07.	7,500	28.07.	5,625		
16.06.	3,250			29.07.	5,250	05.08.	3,500	29.07.	4,875	29.07.	1,250		
17.06.	7,500			30.07.	3,500	06.08.	4,875	30.07.	1,500	30.07.	6,625		
23.06.	4,500					07.08.	1,750	31.07.	2,500	31.07.	2,500		
24.06.	9,750					08.08.	1,250	01.08.	4,250	01.08.	1,500		
26.06.	6,250					09.08.	3,625	02.08.	1,375	02.08.	2,500		
28.06.	11,875					10.08.	2,500	03.08.	11,000	03.08.	1,500		
02.07.	9,375					11.08.	1,375	04.08.	3,250	04.08.	3,750		
04.07.	9,625					12.08.	7,250	05.08.	1,250	05.08.	13,750		
05.07.	15,000					13.08.	6,250	09.08.	3,750	07.08.	4,125		
06.07.	10,000					14.08.	3,875	08.08.		08.08.	3,750		

07.07.	6,750									15.08.	1,5625				09.08.	3,000
08.07.	4,125									16.08.	2,0625				10.08.	4,875
09.07.	3,500														12.08.	13,375
10.07.	3,750														13.08.	13,250
11.07.	2,875														14.08.	3,125
12.07.	3,750														15.08.	1,500
13.07.	8,250														16.08.	31,250
14.07.	9,125															
15.07.	3,375															
16.07.	3,750															
18.07.	5,250															
24.07.	8,750															
25.07.	11,250															
26.07.	11,000															
27.07.	5,000															
29.07.	9,750															
30.07.	9,500															
04.08.	3,250															
05.08.	11,500															
07.08.	7,250															

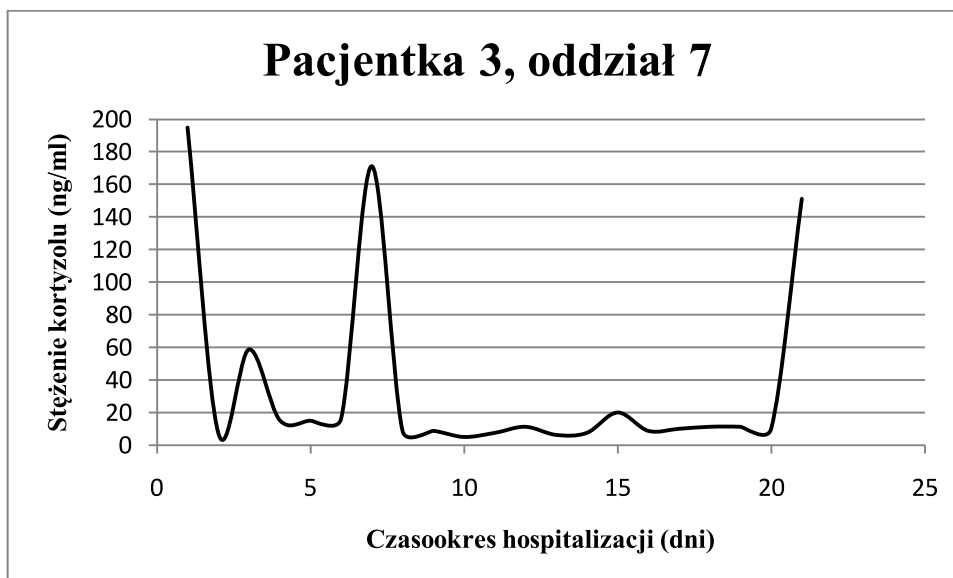
4.3.4. Wpływ SSA na wydzielanie kortyzolu

Jedynym lekiem z grupy SSA stosowanym w Polsce jest mianseryna. Preparat ten podawano siedmiu pacjentkom, których średni czas hospitalizacji wyniósł 40 dni. W przypadku tej grupy probantek trudno jest wskazać jednolity profil zmian stężenia hormonu. Wyniki obrazujące różnorodny wpływ mianseryny na poziom kortyzolu w trakcie trwania hospitalizacji pacjentek przedstawiono w Tabeli 23. W większości przypadków stężenie wydzielanego kortyzolu ulegało znacznym wahaniom w trakcie całego pobytu w szpitalu, niezależnie od początkowego jego poziomu. Należy jednak zauważyć, iż każde następne zwiększenie poziomu wydzielanego hormonu było niższe od poprzedniego, co zilustrowano na Rys. 25. Hospitalizacja pacjentki oznaczonej symbolem 42 trwała 60 dni, a początkowe stężenie kortyzolu wynosiło 102 ng/ml. W trakcie terapii poziom hormonu wielokrotnie przekraczał wartości oznaczane w ślinie zdrowych ochotników.

Podobnie wygląda profil pacjentki o symbolu 3 stosującej ten sam lek, co przedstawiono graficznie na Rys. 26. Również w tym przypadku początkowe stężenie kortyzolu było wysokie, a w trakcie całego okresu hospitalizacji ulegało znacznym wahaniom, przekraczając w niektórych dniach wartości referencyjne.

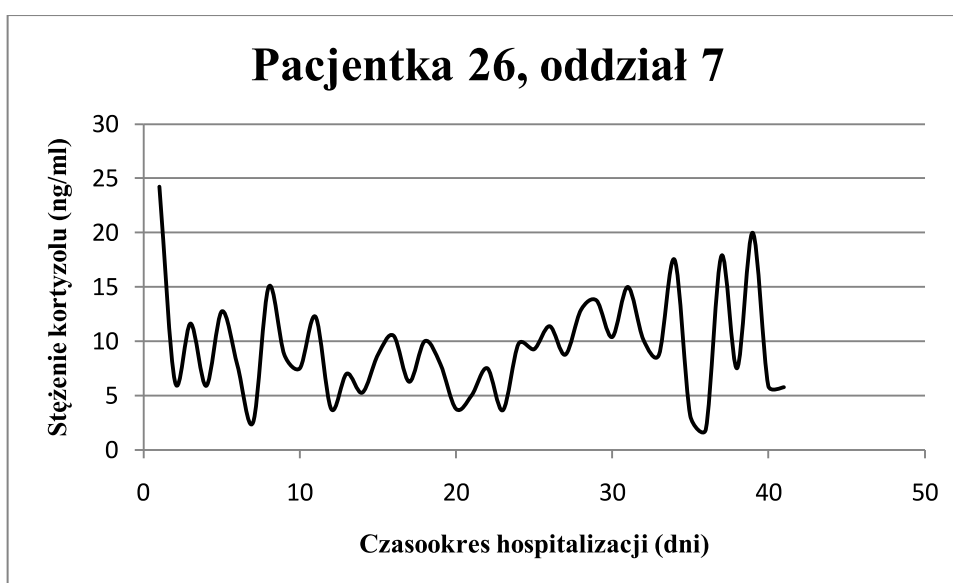


Rys. 25 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii mianseryną



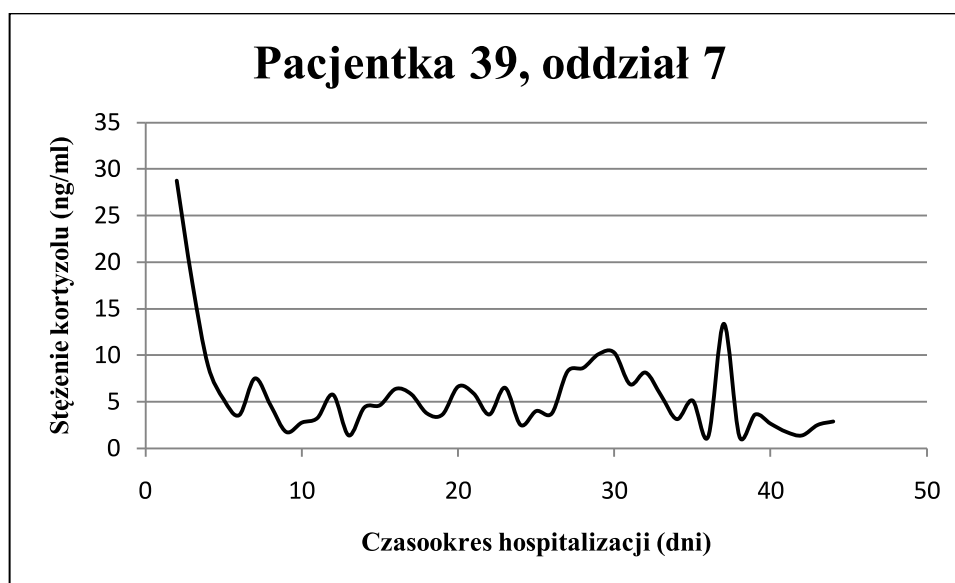
Rys. 26 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii mianseryną

Z kolei u pacjentek charakteryzujących się poziomem hormonu nieznacznie przekraczającym stężenie kortyzolu w ślinie zdrowych ochotników, najczęściej nie dochodziło do całkowitego obniżenia poziomu hormonu i po kilku dniach terapii amplituda zmian stężenia kortyzolu zwiększała się. Taki profil zmian stężenia hormonu w ślinie ilustruje Rys. 27. Pacjentka zaraz po przyjęciu do szpitala miała podwyższony poziom, jednak nie był on tak wysoki, jak u probantek o symbolach 3 i 42, również stosujących mianserynę. W kilka dni po rozpoczęciu terapii stężenie hormonu było niższe i odpowiadało wartościom referencyjnym. Jednakże nie obserwowano tym przypadku długotrwałej stabilizacji i do końca trwania hospitalizacji poziom kortyzolu pozostał nieznacznie podwyższony.



Rys. 27 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii mianseryną

Na Rys. 28 przedstawiono profil pacjentki oznaczonej symbolem 39, u której stężenie kortyzolu oznaczone krótko po przyjęciu do szpitala było podobne do poziomu hormonu u pacjentki oznaczonej symbolem 26, jednakże pacjentka o symbolu 39 odznacza się tym, iż po kilku dniach od rozpoczęcia terapii stężenie kortyzolu uległo u niej obniżeniu do wartości oznaczanych w ślinie osób zdrowych, a ponadto czas stabilizacji był dłuższy. Jednak również u pacjentki o symbolu 26 widać, że mimo stosowania leku i poprawy stanu probantki nie jest możliwa całkowita kontrola wydzielania hormonu, tak iż w końcowym okresie hospitalizacji ponownie amplituda stężenia nieznacznie zwiększa się przekraczając wartości referencyjne.



Rys. 28 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii mianseryną

Tabela 23. Wyniki analizy poziomu kortyzolu u pacjentek leczonych mianseryną

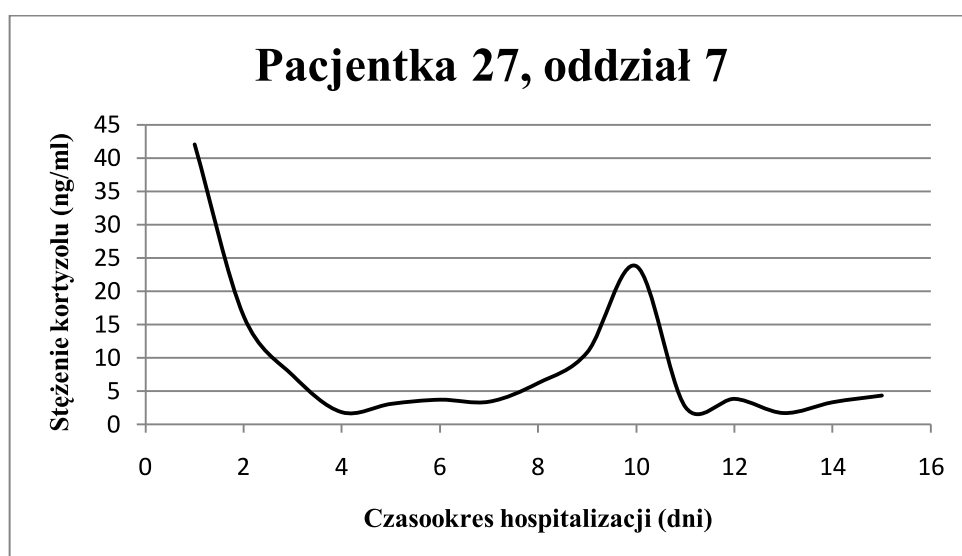
Mianseryna													
Pacjentka 3, oddział 7		Pacjentka 17, oddział 7		Pacjentka 25, oddział 7		Pacjentka 26, oddział 7		Pacjentka 39, oddział 7		Pacjentka 42, oddział 7		Pacjentka 48, oddział 7	
Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)
28.02.	195,000	15.05.	19,250	09.08.	58,000	22.08.	24,250	19.01.	29,500	09.02.	102,000	23.02.	18,250
06.03.	7,500	17.05.	4,250	10.08.	17,375	26.08.	6,250	21.01.	28,750	11.02.	13,750	02.03.	10,625
07.03.	58,750	18.05.	1,625	11.08.	11,375	27.08.	11,625	22.01.	17,750	12.02.	12,000	03.03.	6,875
08.03.	15,375	19.05.	1,250	12.08.	18,750	28.08.	5,875	24.01.	8,875	13.02.	12,750		
09.03.	15,000	24.05.	7,500	13.08.	7,500	29.08.	12,750	25.01.	5,250	14.02.	13,875		
10.03.	16,250	25.05.	5,000	14.08.	5,750	30.08.	7,750	26.01.	3,5625	15.02.	5,625		
11.03.	171,250	27.05.	6,250	15.08.	12,375	31.08.	2,500	28.01.	7,500	16.02.	5,250		
12.03.	8,750	30.05.	5,750	16.08.	11,750	01.09.	15,000	29.01.	4,625	17.02.	2,625		
13.03.	8,750	31.05.	8,250	17.08.	9,625	02.09.	8,750	30.01.	1,750	18.02.	8,625		
14.03.	5,000	02.06.	5,125	18.08.	5,000	03.09.	7,500	31.01.	2,750	19.02.	2,250		
15.03.	7,500	03.06.	5,500	19.08.	10,875	04.09.	12,250	01.02.	3,250	20.02.	19,750		
16.03.	11,250	04.06.	8,875	20.08.	4,000	05.09.	3,750	02.02.	5,750	21.02.	27,375		
17.03.	6,250	06.06.	8,750	21.08.	9,500	06.09.	7,000	03.02.	1,375	22.02.	6,250		
18.03.	7,500	07.06.	11,125	22.08.	9,875	07.09.	5,250	04.02.	4,375	23.02.	4,000		
19.03.	20,000	08.06.	3,750	23.08.	6,250	08.09.	8,750	05.02.	4,625	24.02.	48,750		
20.03.	8,750	09.06.	5,500	24.08.	9,000	09.09.	10,500	06.02.	6,375	25.02.	82,500		
21.03.	10,000	11.06.	6,750	25.08.	11,750	10.09.	6,250	07.02.	5,8125	26.02.	3,500		
25.03.	11,250	12.06.	12,000	26.08.	18,750	11.09.	10,000	08.02.	3,750	27.02.	3,375		

26.03.	11,250	13.06.	2,750	27.08.	8,750	12.09.	7,875	09.02.	3,625	28.02.	5,000	
27.03.	10,000	16.06.	5,250	28.08.	4,750	13.09.	3,750	10.02.	6,625	01.03.	13,125	
28.03.	151,250	17.06.	1,500	29.08.	12,500	14.09.	5,000	11.02.	5,875	02.03.	4,375	
		19.06.	11,625	30.08.	12,125	16.09.	7,500	12.02.	3,625	03.03.	9,500	
		20.06.	10,000	31.08.	7,125	17.09.	3,625	13.02.	6,500	04.03.	3,750	
		22.06.	5,125	01.09.	3,750	19.09.	9,750	14.02.	2,500	05.03.	7,500	
		23.06.	3,000	02.09.	6,250	22.09.	9,250	15.02.	4,000	06.03.	8,250	
				03.09.	5,250	23.09.	11,375	16.02.	3,750	07.03.	8,750	
				04.09.	6,250	24.09.	8,750	17.02.	8,250	08.03.	5,000	
				05.09.	5,000	25.09.	12,875	18.02.	8,625	13.03.	5,000	
				06.09.	10,500	26.09.	13,750	19.02.	10,125	14.03.	20,000	
				07.09.	5,000	27.09.	10,375	20.02.	10,250	15.03.	8,250	
				08.09.	6,250	28.09.	15,000	21.02.	6,875	16.03.	17,500	
				09.09.	10,000	30.09.	10,125	22.02.	8,125	17.03.	6,250	
				10.09.	15,000	01.10.	8,750	23.02.	5,625	18.03.	7,375	
				11.09.	37,500	02.10.	17,500	24.02.	3,125	19.03.	4,750	
				12.09.	6,375	03.10.	3,125	25.02.	5,125	20.03.	6,750	
				13.09.	7,500	04.10.	1,875	26.02.	1,250	21.03.	10,000	
				14.09.	11,750	09.10.	17,875	27.02.	13,375	22.03.	60,000	
				16.09.	5,500	11.10.	7,500	28.02.	1,250	23.03.	19,625	
				17.09.	11,000	12.10.	20,000	01.03.	3,625	24.03.	4,750	
				19.09.	33,750	14.10.	5,875	02.03.	2,625	25.03.	9,750	

4.3.5. Wpływ pozostałych leków przeciwdepresyjnych na wydzielanie kortyzolu

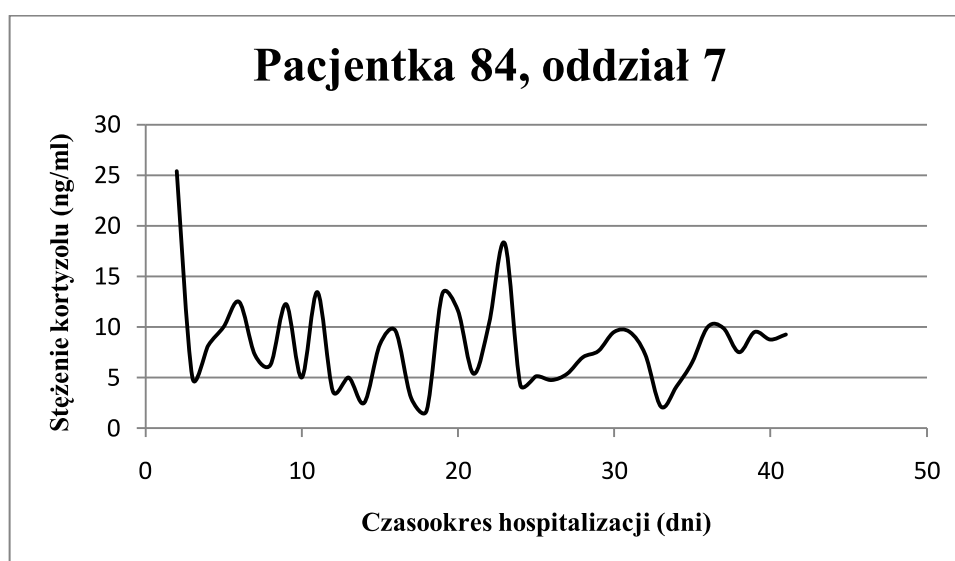
Badano również wpływ na poziom kortyzolu czterech leków nie należących do żadnej z wcześniej wymienionych grup leków przeciwdepresyjnych. Wśród nich znalazły się tianeptyna, trazodon, mirtazapina i moklobemid. Średni czas pobytu w szpitalu pacjentek stosujących te substancje wyniósł: tianeptyna – 29 dni, trazodon – 79, mirtazapina – 12 i moklobemid – 23.

Tianeptyna, której mechanizm działania polega na zwiększaniu wchłaniania serotoniny oraz hamowaniu osi HPA, powinna znacząco i szybko obniżyć poziom wydzielanego kortyzolu. Wśród badanych pacjentek trzy stosowały ten lek, dwie z nich były hospitalizowane po raz pierwszy. Wpływ tianeptyny na wydzielanie kortyzolu nieznacznie różni się od pozostałych omawianych leków należących do grupy TLPD, SSRI, czy SNRI. Zmiany poziomu wydzielanego hormonu pod wpływem terapii tianeptyną oznaczonego w ślinie pacjentek podczas ich hospitalizacji przedstawiono w Tabeli 24. Na Rys. 29 zilustrowano profil zmian poziomu kortyzolu w trakcie terapii tym lekiem. Początkowe stężenie hormonu było podwyższone, po czym następuje stosunkowo łagodne zmniejszenie jego wydzielania. Również w trakcie terapii tianeptyną obserwowany jest wzrost wydzielania hormonu, jednak zarówno wzrost jak i obniżenie się stężenia kortyzolu do wartości referencyjnych następuje stopniowo.



Rys. 29 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii tianeptyną

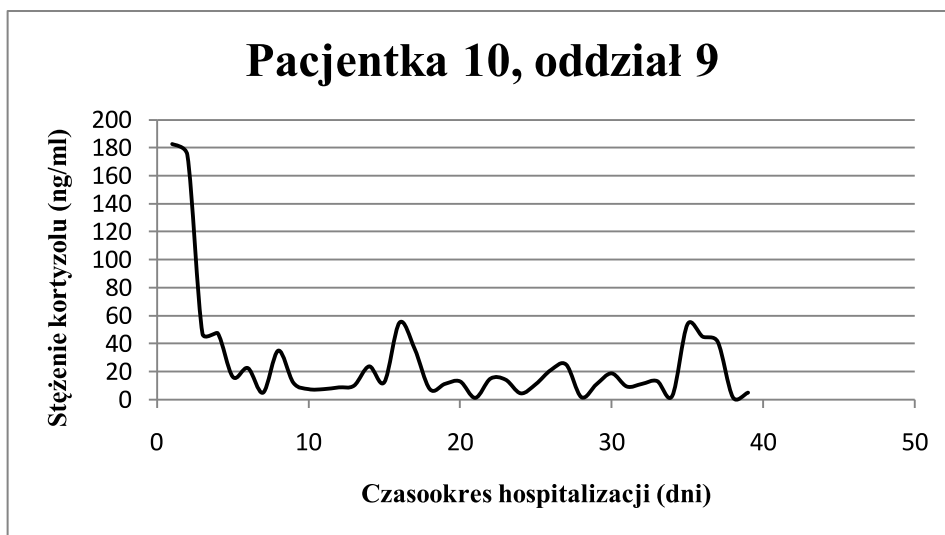
W przypadku pacjentki, którą hospitalizowano po raz siódmy, profil zmian kortyzolu był podobny do profili spotykanych podczas terapii pacjentek wenlafaksyną lub mianseryną, u których poziom kortyzolu w pierwszych dniach terapii nie przekroczył 60 ng/ml. Zmiany stężenia hormonu w trakcie leczenia tianeptyną pacjentki o symbolu 84 ilustruje Rys. 30. Należy podkreślić, iż mimo znacznych wahań poziomu kortyzolu, w szczególności w początkowym etapie leczenia, amplituda zmian jest mniejsza niż w przypadku pacjentek stosujących leki z innych grup, m.in. citalopram, sertralinę, wenlafaksynę i mianserynę. Ponadto różnice pomiędzy stężeniami wyznaczonymi w kolejnych dniach są mniejsze, co dodatkowo świadczy o bezpośrednim hamowaniu osi HPA przez tianeptynę.



Rys. 30 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii tianeptyną

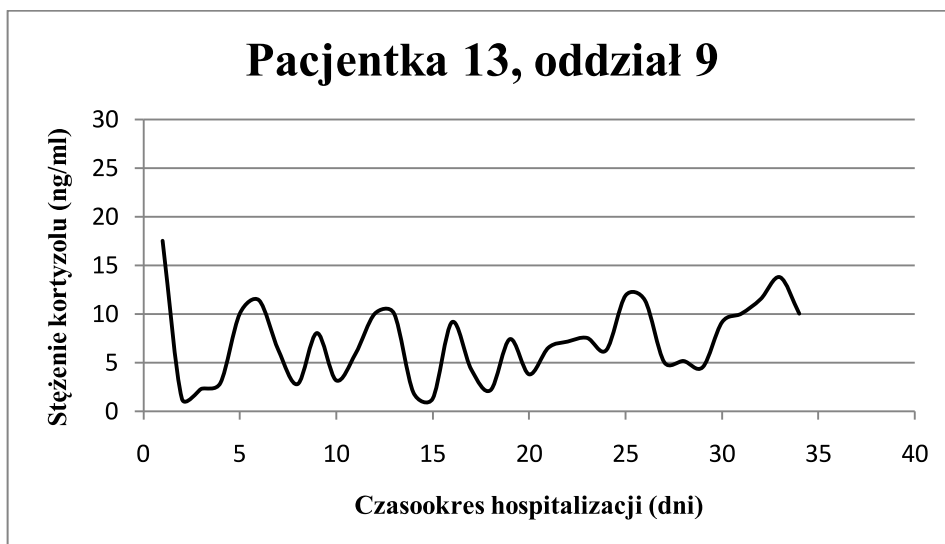
Trazodon jest jedynym lekiem z grupy SARI zarejestrowanym w Polsce. Jego mechanizm działania polega na hamowaniu wychwytu zwrotnego serotoniny oraz antagonistycznym wpływie na receptor 5-HT₂. W trakcie badań trazodon najczęściej podawano w polipragmazji, natomiast w monoterapii stosowano go u trzech pacjentek, których średni czas terapii wyniósł 79 dni. Wszystkie pacjentki były już kilkakrotnie leczone w szpitalu z powodu depresji, jednak okres hospitalizacji nie był proporcjonalny do krotności pobytu. Przez większą część pobytu pacjentek w szpitalu poziom wydzielanego kortyzolu był podwyższony, co obrazuje Tabela 24, w której przedstawiono stężenie hormonu w poszczególnych dniach leczenia pacjentek tym lekiem. W przypadku probantki, u której wyjściowe stężenie hormonu przekroczyło 180 ng/ml, obserwowano szybkie jego obniżenie tak, iż po 10. dniach hospitalizacji oznaczona wartość odpowiadała poziomowi hormonu u

osób zdrowych. Jednak po kilku dniach stabilizacji obserwowano ponowne zwiększenie wydzielania kortyzolu, które w tym przypadku było znacznie niższe niż w początkowej fazie leczenia. Do końca trwania hospitalizacji poziom hormonu wahał się i często przekraczał wartości referencyjne, jednak jego wzrost nie był już tak znaczący jak w pierwszych dniach hospitalizacji. Zmiany poziomu kortyzolu pacjentki leczonej trazodonem przedstawia Rys. 31.



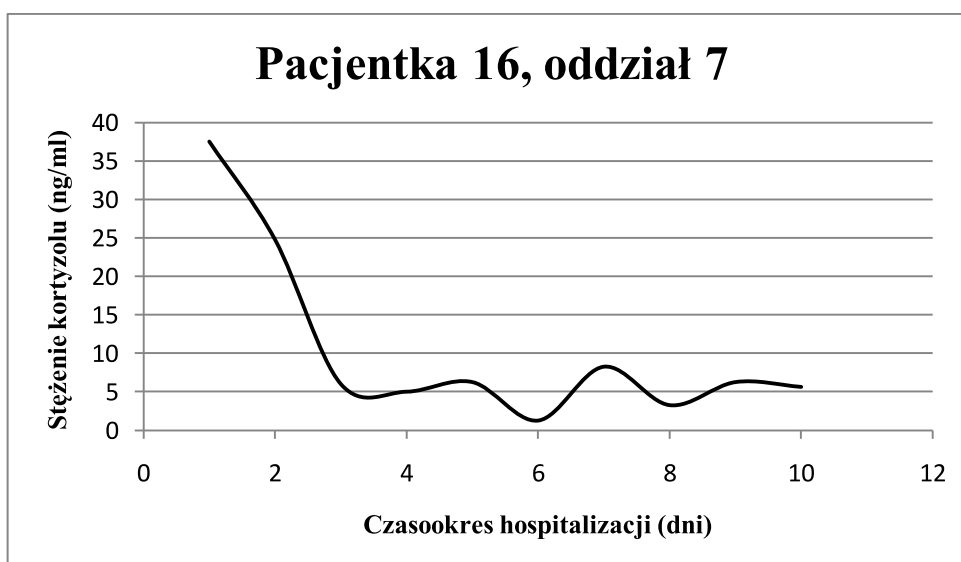
Rys. 31 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii trazodonem

W przypadku pozostałych dwóch pacjentek leczonych trazodonem poziom kortyzolu oznaczony w początkowym okresie hospitalizacji był podwyższony, jednak nie tak znacząco jak u probantki oznaczonej symbolem 10. W trakcie pobytu w szpitalu pozostałych pacjentek leczonych trazodonem, poziom hormonu także się wahał, jednak amplituda zmian jego stężenia była mniejsza. Dotyczy to również okresu, w którym stężenie kortyzolu odpowiadało wartościom referencyjnym, który był dłuższy. Profil zmian poziom hormonu u pacjentki leczonej trazodonem, u której stwierdzono nieznaczne podwyższenie jego wydzielania, obrazuje Rys. 32.



Rys. 32 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii trazodonem

Pozostałe dwa leki stosowane w monoterapii to mirtazapina i moklobemid., którymi leczono tylko dwie pacjentki. Okres pobytu w szpitalu probantek był krótki, terapia mirtazapiną trwała 12 dni, natomiast moklobemidem 23. Ponadto stężenie kortyzolu, które w pierwszych dniach terapii tylko nieznacznie było podwyższone, w obu przypadkach szybko obniżyło się do wartości oznaczanych w ślinie osób zdrowych, co zilustrowano w Tabeli 24. Na tej podstawie określono profil zmian poziomu kortyzolu w ślinie pacjentki leczonej moklobemidem, co ilustruje Rys. 33.



Rys. 33 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii moklobemidem

Tabela 24. Wyniki analizy poziomu kortyzolu u pacjentek leczonych tianeptyną, trazodonem, mirtazapiną i moklobemidem

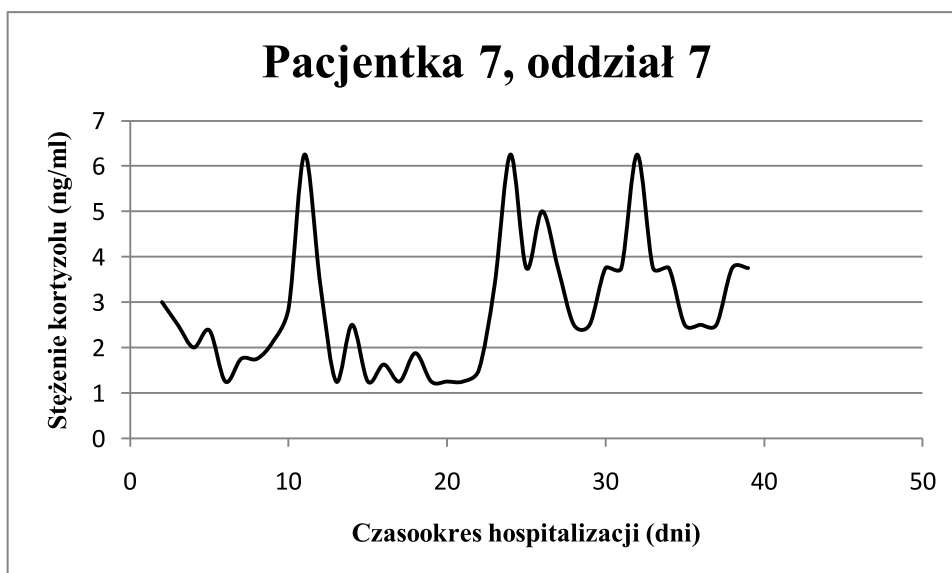
		Tianeptyna				Trazodon				Mirtazapina		Moklobemid			
Pacjentka 27, oddział 7		Pacjentka 63, oddział 7		Pacjentka 84, oddział 7		Pacjentka 10, oddział 9		Pacjentka 13, oddział 9		Pacjentka 15, oddział 9		Pacjentka 14, oddział 9		Pacjentka 16, oddział 7	
Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)
21.10.	42,000	04.07.	52,000	24.09.	27,500	27.06.	182,500	27.06.	17,500	27.06.	37,500	18.06.	33,000	14.05.	37,500
27.10.	16,250	06.07.	28,750	29.09.	25,375	28.06.	174,750	28.06.	1,250	28.06.	8,750	27.06.	31,250	15.05.	24,750
29.10.	7,375	07.07.	33,750	30.09.	5,000	30.06.	47,000	29.06.	2,250	29.06.	7,875	28.06.	8,375	19.05.	6,000
30.10.	1,875	08.07.	11,250	01.10.	8,125	01.07.	47,500	30.06.	2,875	30.06.	3,750	29.06.	6,250	25.05.	5,000
31.10.	3,125	09.07.	17,500	02.10.	10,000	02.07.	16,250	01.07.	10,000	01.07.	2,125	30.06.	8,625	29.05.	6,250
01.11.	3,750	10.07.	6,250	03.10.	12,4625	03.07.	22,500	02.07.	11,375	02.07.	7,750			31.05.	1,250
02.11.	3,450	12.07.	10,750	04.10.	7,250	05.07.	5,000	03.07.	6,250	03.07.	8,000			02.06.	8,250
03.11.	6,250	13.07.	15,000	05.10.	6,250	06.07.	35,000	04.07.	2,750	04.07.	6,750			03.06.	3,250
04.11.	10,875	14.07.	36,250	06.10.	12,250	07.07.	12,000	05.07.	8,000	05.07.	2,500			04.06.	6,250
07.11.	23,750			07.10.	5,000	08.07.	7,500	06.07.	3,125	06.07.	8,750			05.06.	5,625
14.11.	2,625			08.10.	13,4375	09.07.	7,500	07.07.	5,875	07.07.	3,250				
17.11.	3,875			09.10.	3,625	10.07.	8,750	08.07.	10,000	08.07.	32,500				
19.11.	1,750			10.10.	5,000	11.07.	10,000	09.07.	10,000	09.07.	12,750				
20.11.	3,375			11.10.	2,500	12.07.	23,750	10.07.	1,875	10.07.	21,250				
21.11.	4,375			12.10.	8,250	13.07.	12,500	11.07.	1,250	11.07.	4,375				
				13.10.	9,625	14.07.	55,000	12.07.	9,125						
				14.10.	3,000	15.07.	36,250	13.07.	4,250						
				15.10.	1,750	16.07.	7,500	14.07.	2,125						
				16.10.	13,250	17.07.	11,250	15.07.	7,375						

						17.10.	11,625	18.07	13,000	16.07.	3,750									
						18.10.	5,375	19.07.	1,250	17.07.	6,500									
						20.10.	10,375	20.07.	15,000	18.07.	7,125									
						21.10.	18,250	21.07.	14,250	19.07.	7,500									
						22.10.	4,250	22.07.	4,500	20.07.	6,250									
						23.10.	5,125	23.07.	11,125	21.07.	11,875									
						25.10.	4,750	24.07.	21,250	22.07.	11,375									
						26.10.	5,375	25.07.	25,000	23.07.	5,000									
						27.10.	7,000	26.07.	1,750	24.07.	5,125									
						28.10.	7,625	27.07.	11,000	25.07.	4,500									
						29.10.	9,500	28.07.	18,750	26.07.	9,125									
						30.10.	9,500	29.07.	9,375	27.07.	10,000									
						31.10.	7,250	30.04.	11,250	28.07.	11,500									
						01.11.	2,125	01.08.	13,250	29.07.	13,750									
						02.11.	4,125	02.08.	2,750	30.07.	10,000									
						03.11.	6,500	03.08.	53,750											
						04.11.	10,000	04.08.	45,000											
						05.11.	9,875	05.08.	41,250											
						06.11.	7,500	06.08.	1,625											
						07.11.	9,500	07.08.	5,000											
						08.11.	8,750													
						09.11.	9,250													

4.3.6. Wpływ polipragmazji na wydzielanie kortyzolu

Podawane w monoterapii leki przeciwdepresyjne u około 20% pacjentów nie przynoszą oczekiwanych efektów terapeutycznych nawet po kilku tygodniach leczenia. Dlatego też w przypadku tzw. depresji lekoopornej stosowana jest terapia skojarzona. Polipragmazja praktykowana jest także w przypadku, gdy należy rozszerzyć spektrum działania leku. Wśród 97. badanych pacjentek, 16. poddano terapii skojarzonej. Najczęściej łączono leki z grupy SSRI (sertralinę, citalopram i escitalopram) z SARI (trazodonem) oraz SSA (mianseryną). W kilku przypadkach podawano trazodon łącznie z wenlafaksyną (SNRI). Średni czas hospitalizacji pacjentek stosujących terapię skojarzoną wyniósł 40 dni.

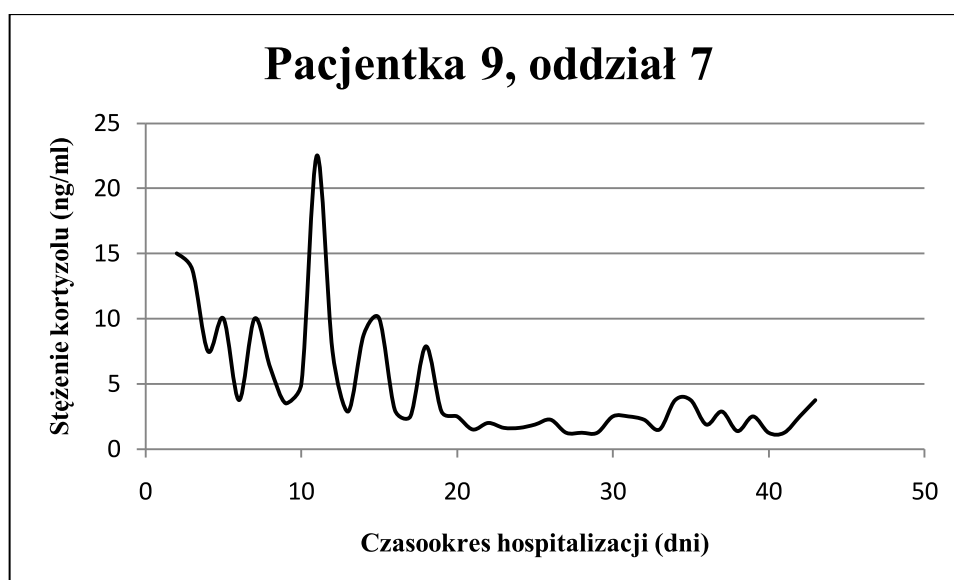
Wyniki analizy poziomu kortyzolu w ślinie pacjentek stosujących terapię skojarzoną przedstawiają Tabele 25 – 28. Na podstawie otrzymanych danych stwierdzono, że oznaczony w pierwszych dniach terapii kortyzol w ślinie pacjentek leczonych preparatami z grupy SSRI w połączeniu z trazodonem najczęściej przekraczał wartości referencyjne. Tylko w jednym przypadku przez cały okres hospitalizacji stężenie hormonu nie przekroczyło dopuszczalnych norm, co ilustruje Rys. 34.



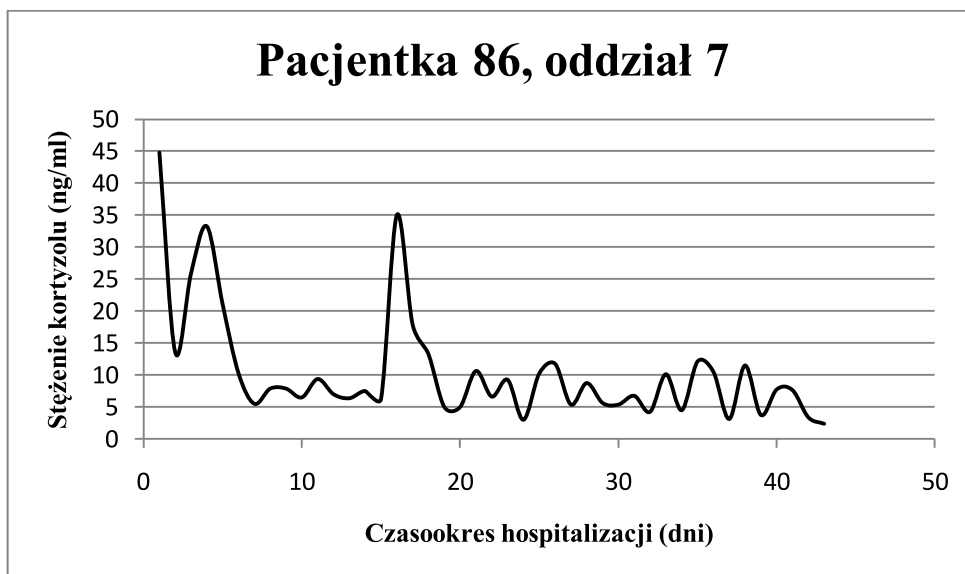
Rys. 34 Zmiany stężenia kortyzolu podczas politerapii escitalopramem i trazodonem

U pozostałych pacjentek jego początkowe stężenie nie przekraczało 60 ng/ml. Ponadto obniżenie poziomu wydzielanego hormonu następowało najczęściej w przeciągu czterech dni od rozpoczęcia terapii. W przypadku pacjentek, dla których była to pierwsza hospitalizacja z

powodu depresji, zauważyć można silniejszy wpływ zastosowanej polipragmazji poprzez trwałe obniżenie poziomu kortyzolu. Profil zmian wydzielania hormonu przedstawiają Rys. 35 i 36. Rys. 35 obrazuje wpływ politerapii sertralina oraz trazodonem na poziom kortyzolu w ślinie pacjentki hospitalizowanej po raz pierwszy. Należy zauważyć, iż stężenie kortyzolu ulega trwałemu obniżeniu do wartości referencyjnych po około dwóch tygodniach terapii i nie ulega podwyższeniu ponad normę do końca trwania hospitalizacji. W przypadku pacjentki, której profil zmian poziomu oznaczanego hormonu przedstawiono na Rys. 36, stosowano terapię skojarzoną escitalopramem z trazodonem. Probandka przebywała w szpitalu po raz szósty. Również w tym przypadku obniżenie poziomu wydzielanego hormonu nastąpiło stosunkowo szybko, jednak po krótkim czasie stężenie kortyzolu ponownie wzrosło, aby po kilka następnym dniach obniżyć się, tak iż do końca trwania hospitalizacji wydzielanie kortyzolu nieznacznie wahało się przekraczając wartości referencyjne.

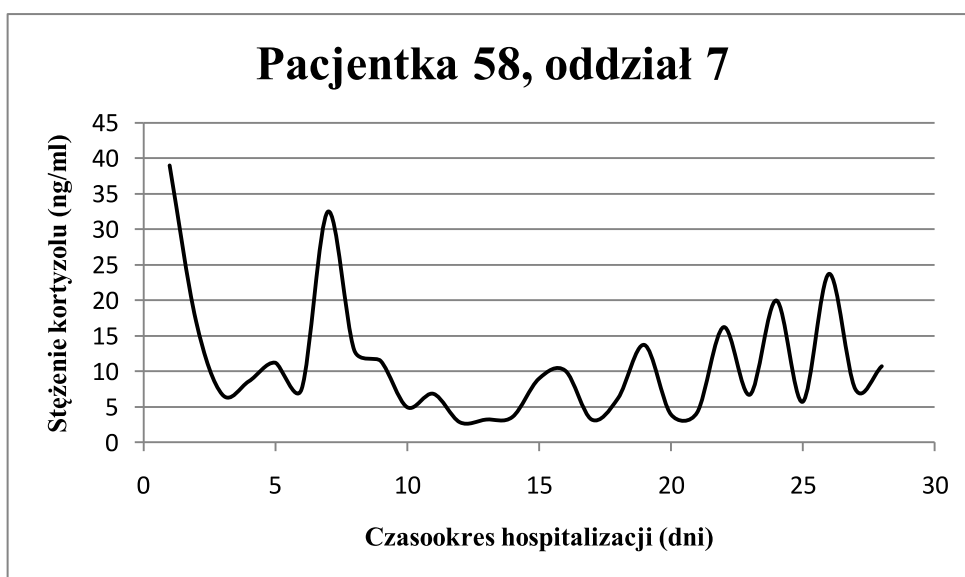


Rys. 35 Zmiany stężenia kortyzolu podczas politerapii sertralina i trazodonem



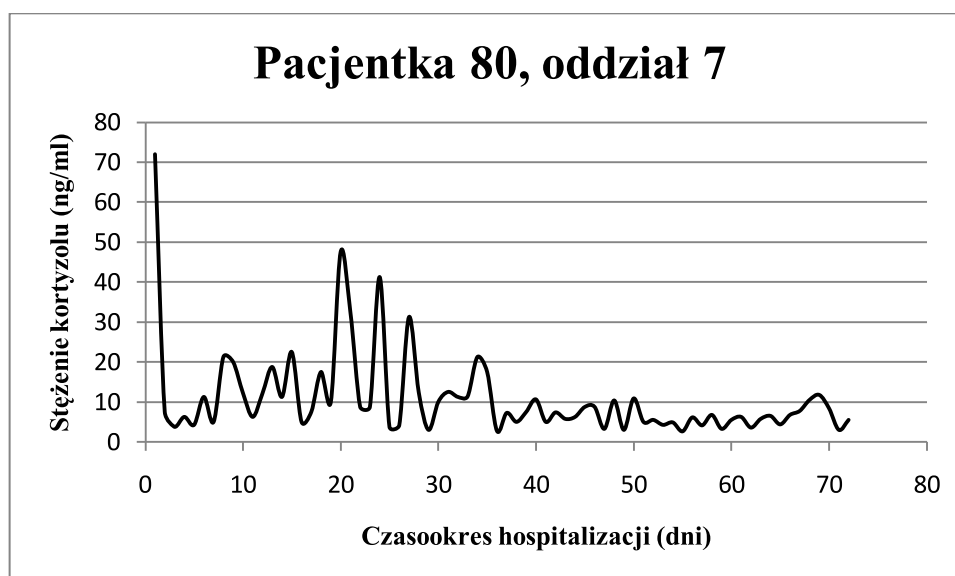
Rys. 36 Zmiany stężenia kortyzolu podczas politerapii escitalopramem i trazodonem

Leki z grupy SSRI łączono również z mianseryną. Taką terapię skojarzoną zastosowano u trzech pacjentek, których średni czas hospitalizacji wyniósł 26 dni. U wszystkich badanych probantek stwierdzono podwyższony poziom kortyzolu w pierwszych dniach terapii, który wynosił około 40 ng/ml. W wyniku zastosowanego leczenia skojarzonego lekami z grupy SSRI i mianseryną poziom hormonu obniżył się, jednak nie można wykazać, aby zmniejszenie jego wydzielania było trwałe. Po kilku dniach u wszystkich badanych pacjentek następował ponowny wzrost stężenia hormonu, a jego wahania utrzymywały się do końca trwania hospitalizacji. Profil zmian poziomu kortyzolu w ślinie wybranej pacjentki, u której zastosowano politerapię citalopramem i mianseryną przedstawia Rys. 37.



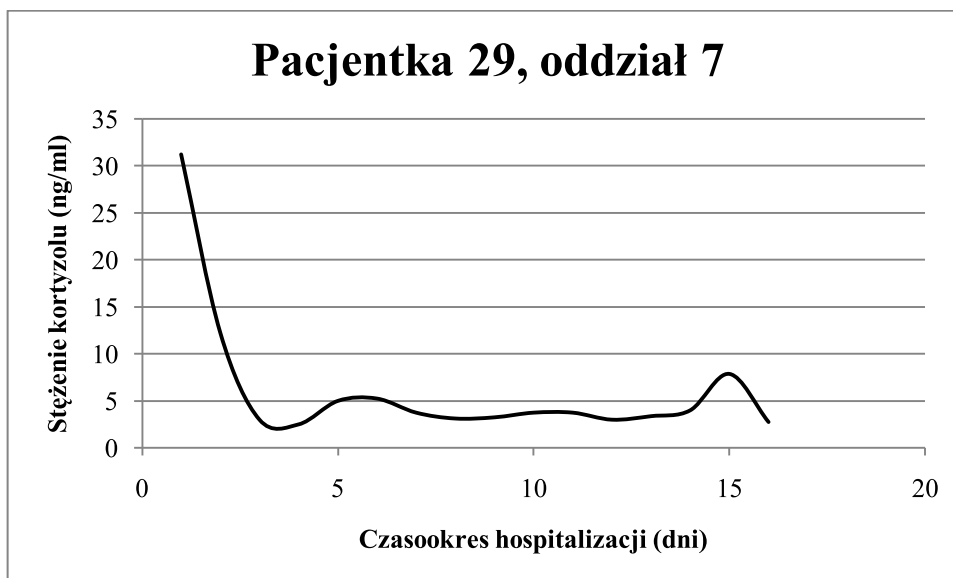
Rys. 37 Zmiany stężenia kortyzolu podczas politerapii citalopramem i mianseryną

Kolejnymi lekami, z którymi stosowano łącznie preparaty z grupy SSRI były wenlafaksyna, mirtazapina oraz leki z grupy TLPD, klomipramina i doksepina. Najczęściej podawanym lekiem z grupy SSRI była sertralina, którą łączono z pozostałymi preparatami. Tylko w jednym przypadku zastosowano terapię skojarzoną citalopramu z klomipraminą u pacjentki oznaczonej symbolem 80, która wielokrotnie była hospitalizowana (12-krotnie), w tym badaniu czas jej pobytu w szpitalu wyniósł 76 dni. Profil zmian poziomu oznaczanego w jej ślinie kortyzolu przedstawia Rys. 38. Początkowe stężenie hormonu wielokrotnie przekraczało wartości referencyjne, jednak po wdrożeniu leczenia uległo bardzo szybko obniżeniu. Niestety, również w tym przypadku po kilku dniach terapii stężenie kortyzolu ponownie przekroczyło wartości oznaczane u osób zdrowych i przez kilka kolejnych dni ulegało dużym zmianom. Dopiero po około 50. dniach terapii nastąpiło trwałe zmniejszenie wydzielania hormonu i praktycznie do końca trwania hospitalizacji było zgodne z wartościami oznaczanymi u osób zdrowych.



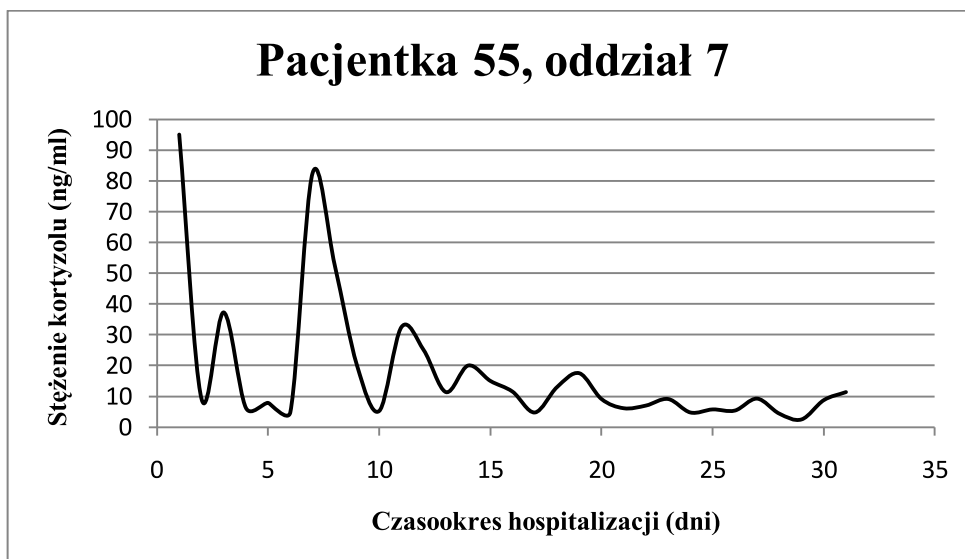
Rys. 38 Zmiany stężenia kortyzolu podczas politerapii citalopramem i klomipraminą

W pozostałych przypadkach polipragmazji, w których z grupy SSRI stosowano sertralinę, trudno jest wskazać cechy wspólne dla profili zmian poziomu kortyzolu. W żadnym z omawianych przykładów, w wyjątku terapii skojarzonej z mirtazapiną, nie udało się obniżyć poziomu hormonu do wartości oznaczanych w ślinie zdrowych ochotników. Ponadto zastosowanie polipragmazji sertraliny i mirtazapiny pozwoliło na trwałe zmniejszenie wydzielania kortyzolu w przeciągu pierwszych 13. dni terapii, co zobrazowano graficznie na Rys. 39.



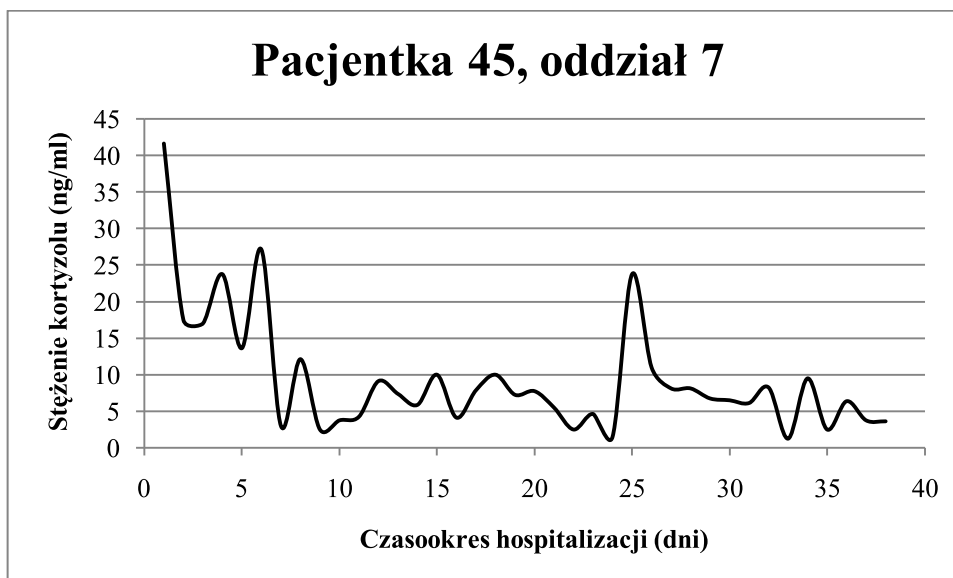
Rys. 39 Zmiany stężenia kortyzolu podczas politerapii sertralina i mirtazapina

W przypadku pacjentek, u których zastosowano połączenie sertraliny z wenlafaksyną oraz sertraliny z doksepina nie uzyskano tak dobrych wyników, jak u probantki o symbolu 29. Obie pacjentki były hospitalizowane po raz pierwszy, a profile zmian stężenia hormonu były podobne do opisanych w przypadku politerapii innymi lekami przeciwdepresyjnymi, np.: sertralina i trazodonem (pacjentka o symbolu 9), czy escitalopramem i trazodonem (pacjentka o symbolu 86). Przykładowy profil zmian poziomu kortyzolu u pacjentki stosującej politerapię sertralina i wenlafaksyną ilustruje Rys. 40. Również obserwowano podwyższone stężenie hormonu w pierwszych dniach terapii, oraz zmniejszenie jego wydzielania po krótkim okresie leczenia. Zmiany te nie były trwałe i do końca hospitalizacji stężenie hormonu wahało się, często przekraczając wartości referencyjne.



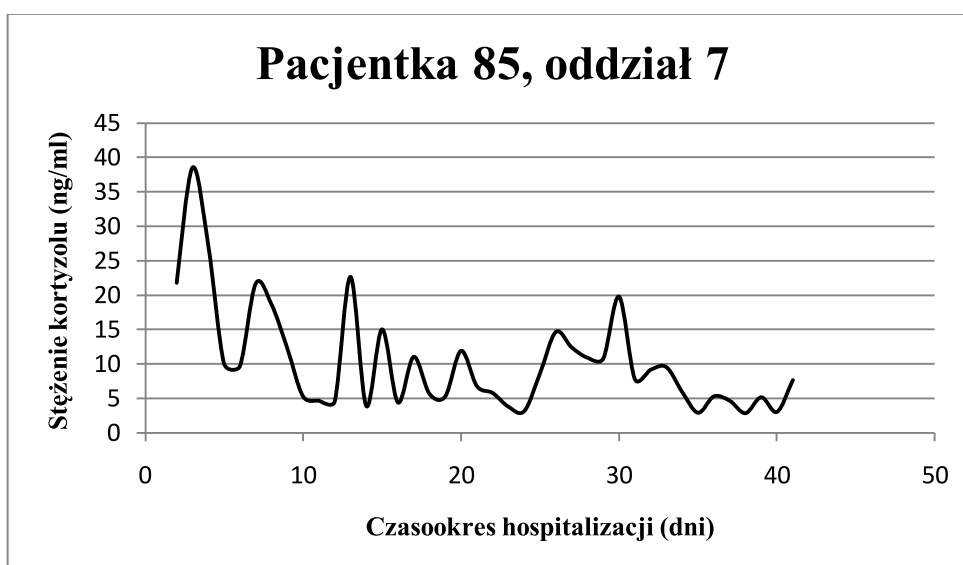
Rys. 40 Zmiany stężenia kortyzolu podczas politerapii sertralina i wenlafaksyna

Jak wspomniano w rozdziale 4.3.5. trazodon był jednym z najczęściej stosowanych leków w polipragmazji. Terapię skojarzoną tym preparatem prowadzono łącząc go z omówionym wyżej preparatami z grupy SSRI (sertralią, escitalopramem), jak również z innymi lekami - wenlafaksyna i mianseryną. W realizowanych w niniejszej pracy badaniach trzy pacjentki były leczone trazodonem z wenlafaksyna, przy czym jedna z nich dodatkowo otrzymywała również mianserynę. Średni czas hospitalizacji pacjentek wyniósł 38 dni. W pierwszych dniach pobytu w szpitalu stężenie kortyzolu u wszystkich probantek było podwyższone, a ponadto pomimo zastosowanej terapii i początkowego zmniejszenia się jego wydzielania, wahało się podczas całego okresu hospitalizacji i nieznacznie przekraczało wartości referencyjne. Dodatkowo należy zauważyć, iż wtórny wzrost stężenia hormonu nigdy nie przewyższył poziomu wykrytego w pierwszych dniach terapii i najczęściej wynosił kilkanaście ng/ml. Profil zmian stężenia kortyzolu w ślinie pacjentki poddanej terapii skojarzonej trazodonem i wenlafaksyna obrazuje Rys. 41.



Rys. 41 Zmiany stężenia kortyzolu podczas politerapii trazodonem i wenlafaksyną

Wśród stosowanych leków w terapii skojarzonej znalazły się również mianseryna w połączeniu z wenlafaksyną. Taki typ polipragmazji zastosowano u jednej z pacjentek, której profil zmian kortyzolu zilustrowano na Rys. 42. Probandka przebywała w szpitalu po raz szósty. Należy zauważyć, iż również w tym przypadku stężenie kortyzolu silnie waha się podczas całego okresu hospitalizacji, jednakże amplituda tych zmian jest coraz mniejsza, a ponadto pod koniec pobytu w szpitalu poziom hormonu odpowiadał wartościom referencyjnym.



Rys. 42 Zmiany stężenia kortyzolu podczas politerapii mianseryną i wenlafaksyną

Tabela 25. Wyniki analizy poziomu kortyzolu u pacjentek leczonych sertralina w połączeniu z innymi lekami

Polipragmazja									
sertralina i trazodon		sertralina i mirtazapina		sertralina i wenlafaksyna		sertralina i mianseryna		sertralina i doksepina	
Pacjentka 9, oddział 7		Pacjentka 29, oddział 7		Pacjentka 55, oddział 7		Pacjentka 83, oddział 7		Pacjentka 88, oddział 7	
Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)
14.04.	16,250	12.11.	31,250	27.04.	95,000	17.09.	42,000	27.10.	13,500
16.04.	15,000	23.11.	12,250	05.05.	9,250	21.09.	13,750	10.11.	12,125
17.04.	13,750	25.11.	3,000	06.05.	37,250	22.09.	11,250	11.11.	9,000
18.04.	7,500	26.11.	2,500	07.05.	6,250	23.09.	17,500	12.11.	3,375
19.04.	10,000	29.11.	5,000	08.05.	7,875	24.09.	8,000	13.11.	8,375
20.04.	3,750	04.12.	5,250	09.05.	4,875	25.09.	27,500	14.11.	3,375
21.04.	10,000	05.12.	3,750	10.05.	82,500	26.09.	5,000	15.11.	8,625
22.04.	6,250	06.12.	3,125	11.05.	52,500	27.09.	13,750	16.11.	9,875
23.04.	3,500	07.12.	3,250	13.05.	20,000	28.09.	11,625	17.11.	3,375
24.04.	5,000	08.12.	3,750	14.05.	5,250	29.09.	1,375	18.11.	11,250
25.04.	22,500	09.12.	3,750	15.05.	32,500	30.09.	15,000	19.11.	9,375
26.04.	7,500	10.12.	3,000	17.05.	25,000	01.10.	17,500	20.11.	8,625
28.04.	2,875	12.12.	3,375	18.05.	11,375	04.10.	2,500	21.11.	12,250
29.04.	8,750	14.12.	4,000	19.05.	20,000	05.10.	5,000	22.11.	3,125
30.04.	10,000	15.12.	7,875	21.05.	15,000	06.10.	5,500	23.11.	5,250
02.05.	3,000	16.12.	2,750	22.05.	11,500	07.10.	2,500	24.11.	2,125
03.05.	2,500			25.05.	4,750	08.10.	5,625	25.11.	2,000
04.05.	7,875			26.05.	13,000				
05.05.	2,875			28.05.	17,500				
06.05.	2,500			02.06.	9,125				
07.05.	1,500			03.06.	6,125				
08.05.	2,000			04.06.	7,000				
09.05.	1,625			05.06.	9,125				
10.05.	1,625			06.06.	4,750				
11.05.	1,875			07.06.	5,750				
12.05.	2,250			08.06.	5,375				
13.05.	1,250			09.06.	9,250				
14.05.	1,250			11.06.	4,375				
15.05.	1,250			15.06.	2,500				
20.05.	2,500			16.06.	8,750				

21.05.	2,500			17.06.	11,375				
22.05.	2,250								
26.05.	1,500								
27.05.	3,750								
02.06.	3,750								
03.06.	1,875								
04.06.	2,875								
08.06.	1,375								
09.06.	2,500								
10.06.	1,250								
11.06.	1,250								
12.06.	2,500								
13.06.	3,750								

Tabela 26. Wyniki analizy poziomu kortyzolu u pacjentek leczonych citalopramem w połączeniu z innymi lekami

Polipragmazja					
citalopram i mianseryna				citalopram i klomipramina	
Pacjentka 52, oddział 7		Pacjentka 58, oddział 7		Pacjentka 80, oddział 7	
Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)
14.03.	46,250	28.05.	39,000	15.09.	72,000
15.03.	18,750	30.05.	17,125	16.09.	7,500
16.03.	7,125	02.06.	6,750	17.09.	3,750
17.03.	15,000	03.06.	8,625	18.09.	6,250
18.03.	7,500	05.06.	11,250	19.09.	4,250
19.03.	16,125	06.06.	7,500	20.09.	11,250
20.03.	7,500	07.06.	32,500	21.09.	5,000
21.03.	5,500	08.06.	13,000	22.09.	21,250
23.03.	1,750	09.06.	11,500	23.09.	20,000
24.03.	9,000	11.06.	5,000	24.09.	12,250
		13.06.	6,875	25.09.	6,250
		15.06.	2,875	26.09.	12,125
		16.06.	3,250	27.09.	18,750
		17.06.	3,625	28.09.	11,250
		24.06.	9,000	29.09.	22,500
		26.06.	10,125	30.09.	5,000
		28.06.	3,250	01.10.	7,500

		02.07.	6,250	02.10.	17,500
		04.07.	13,750	03.10.	10,000
		05.07.	4,000	04.10.	47,500
		06.07.	4,250	05.10.	32,500
		07.07.	16,250	06.10.	8,750
		08.07.	6,750	07.10.	8,750
		09.07.	20,000	08.10.	41,250
		10.07.	5,750	09.10.	3,750
		11.07.	23,750	10.10.	4,125
		12.07.	7,500	11.10.	31,250
		13.07.	10,750	12.10.	12,375
				13.10.	3,000
				14.10.	10,000
				15.10.	12,500
				16.10.	11,250
				17.10.	11,375
				18.10.	21,250
				19.10.	17,500
				20.10.	2,750
				21.10.	7,250
				22.10.	5,000
				23.10.	7,500
				25.10.	10,625
				26.10.	5,000
				27.10.	7,375
				28.10.	5,750
				29.10.	6,250
				30.10.	8,750
				31.10.	8,750
				01.11.	3,250
				02.11.	10,375
				03.11.	3,000
				04.11.	10,875
				05.11.	5,000
				06.11.	5,500
				08.11.	4,250
				09.11.	4,875
				10.11.	2,625

				11.11.	6,125
				12.11.	4,125
				13.11.	6,750
				14.11.	3,250
				15.11.	5,500
				16.11.	6,250
				17.11.	3,5625
				18.11.	5,750
				19.11.	6,500
				20.11.	4,375
				21.11.	6,750
				22.11.	7,750
				23.11.	10,500
				24.11.	11,750
				27.11.	8,375
				29.11.	3,000
				30.11.	5,500

Tabela 27. Wyniki analizy poziomu kortyzolu u pacjentek leczonych escitalopramem w połączeniu z trazodonem

Polipragmazja (escitalopram i trazodon)							
Pacjentka 7, oddział 7		Pacjentka 12, oddział 7		Pacjentka 64, oddział 7		Pacjentka 86, oddział 7	
Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)
31.03.	6,250	22.04.	45,750	06.07.	61,000	14.10.	44,800
02.04.	3,000	25.04.	41,250	07.07.	35,000	16.10.	13,5625
03.04.	2,500	26.04.	5,000	08.07.	20,000	17.10.	25,875
04.04.	2,000	27.04.	2,500	09.07.	15,000	18.10.	33,250
05.04.	2,375	28.04.	3,750	10.07.	46,250	19.10.	21,000
06.04.	1,250	29.04.	3,750	11.07.	10,625	20.10.	10,250
07.04.	1,750	30.04.	5,000	12.07.	6,125	21.10.	5,500
08.04.	1,750	02.05.	2,500	13.07.	9,125	22.10.	7,875
09.04.	2,125	03.05.	3,125	14.07.	11,750	23.10.	7,875
10.04.	2,875	04.05.	6,250			24.10.	6,500
11.04.	6,250	05.05.	3,750			25.10.	9,375
12.04.	3,375	06.05.	3,750			26.10.	7,000
13.04.	1,250	07.05.	3,750			27.10.	6,375
14.04.	2,500	08.05.	3,750			28.10.	7,500

15.04.	1,250	09.05.	3,750			29.10.	6,250
16.04.	1,625	10.05.	2,500			30.10.	35,000
17.04.	1,250	11.05.	2,500			31.10.	17,875
18.04.	1,875	12.05.	2,500			02.11.	13,250
19.04.	1,250	14.05.	3,750			03.11.	5,000
20.04.	1,250	15.05.	2,500			04.11.	5,000
21.04.	1,250	16.05.	3,750			05.11.	10,625
22.04.	1,500	17.05.	3,750			06.11.	6,625
24.04.	3,375	18.05.	4,250			07.11.	9,250
25.04.	6,250	19.05.	2,250			08.11.	3,000
26.04.	3,750	20.05.	4,375			11.11.	10,250
28.04.	5,000	21.05.	3,250			12.11.	11,750
29.04.	3,750	22.05.	1,750			13.11.	5,375
30.04.	2,500	23.05.	3,250			14.11.	8,750
06.05.	2,500	24.05.	2,000			15.11.	5,625
07.05.	3,750	25.05.	2,250			16.11.	5,375
08.05.	3,750	26.05.	2,125			17.11.	6,750
09.05.	6,250	27.05.	2,875			18.11.	4,250
10.05.	3,750	28.05.	9,000			19.11.	10,125
12.05.	3,750	29.05.	2,125			20.11.	4,500
15.05.	2,500	30.05.	2,750			21.11.	12,125
16.05.	2,500	01.06.	3,375			22.11.	10,500
19.05.	2,500	02.06.	2,750			23.11.	3,125
20.05.	3,750	03.06.	15,000			24.11.	11,500
21.05.	3,750	04.06.	3,750			25.11.	3,750
		05.06.	2,500			27.11.	7,750
		06.06.	4,625			28.11.	7,625
		07.06.	5,625			29.11.	3,375
		08.06.	4,250			30.11.	2,375
		09.06.	3,125				
		10.06.	2,375				

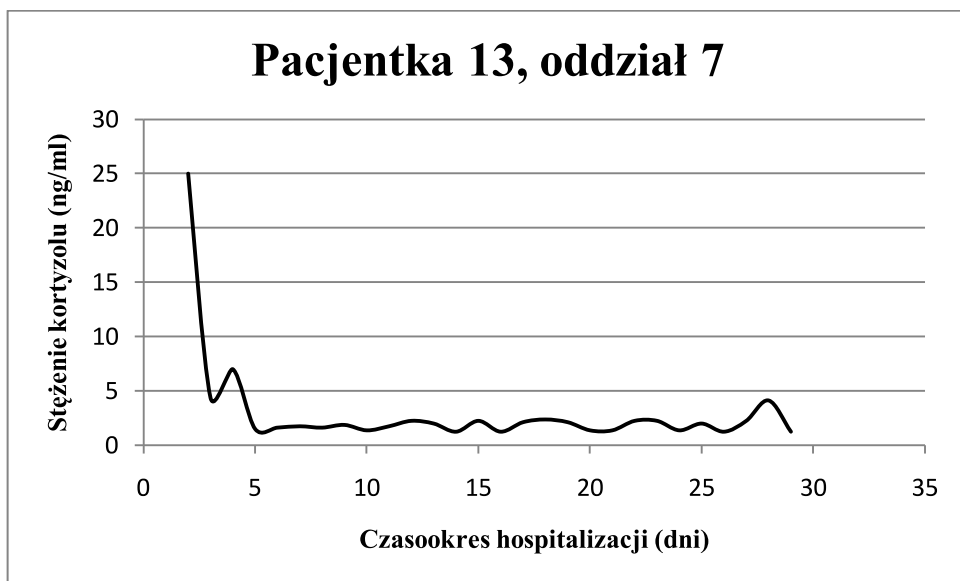
Tabela 28. Wyniki analizy poziomu kortyzolu u pacjentek leczonych polipragnazją

Polipragnazja							
wenlafaksyna i trazodon				wenlafaksyna, mianseryna i trazodon		mianseryna i wenlafaksyna	
Pacjentka 22, oddział 7		Pacjentka 45, oddział 7		Pacjentka 51, oddział 7		Pacjentka 85, oddział 7	
Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)
19.07.	32,000	16.02.	41,625	09.03.	15,625	06.10.	23,500
20.07.	2,750	24.02.	17,500	10.03.	12,125	09.10.	21,750
22.07.	5,000	25.02.	17,000	11.03.	6,875	10.10.	38,500
23.07.	3,125	26.02.	23,750	13.03.	7,375	11.10.	27,200
24.07.	6,000	27.02.	13,625	14.03.	5,250	12.10.	10,000
25.07.	8,375	28.02.	27,125	15.03.	4,750	13.10.	9,625
26.07.	5,375	01.03.	3,000	16.03.	9,250	14.10.	21,625
27.07.	3,625	02.03.	12,125	17.03.	6,750	15.10.	18,625
28.07.	5,000	03.03.	2,500	19.03.	5,375	16.10.	12,250
29.07.	6,750	04.03.	3,750	20.03.	12,125	17.10.	5,250
31.07.	3,875	05.03.	4,250	21.03.	7,250	18.10.	4,625
01.08.	18,750	06.03.	9,125	23.03.	11,750	19.10.	4,500
02.08.	4,625	07.03.	7,375	24.03.	4,250	21.10.	22,625
05.08.	3,750	08.03.	5,875	25.03.	9,125	22.10.	3,875
06.08.	11,500	09.03.	10,000	26.03.	2,750	23.10.	15,000
07.08.	10,250	10.03.	4,125	27.03.	6,250	25.10.	4,375
08.08.	20,125	11.03.	7,875	28.03.	2,875	26.10.	11,000
09.08.	10,125	12.03.	10,000	29.03.	6,000	27.10.	5,625
10.08.	6,875	13.03.	7,250	30.03.	6,250	28.10.	5,250
11.08.	2,500	15.03.	7,750	31.03.	2,750	29.10.	11,875
12.08.	4,000	16.03.	5,500	01.04.	3,375	30.10.	6,750
13.08.	15,000	17.03.	2,500	02.04.	2,875	31.10.	5,750
14.08.	2,875	18.03.	4,625	03.04.	3,000	01.11.	3,750
15.08.	3,125	19.03.	1,500	04.04.	4,875	02.11.	3,125
		20.03.	23,750	05.04.	10,125	03.11.	8,625
		21.03.	11,000	06.04.	9,250	04.11.	14,625
		23.03.	8,125	07.04.	6,000	05.11.	12,375
		24.03.	8,125	14.04.	6,000	06.11.	10,875
		25.03.	6,750	15.04.	1,500	07.11.	10,750
		26.03.	6,500			08.11.	19,750
		27.03.	6,125			09.11.	7,750
		28.03.	8,250			10.11.	9,125

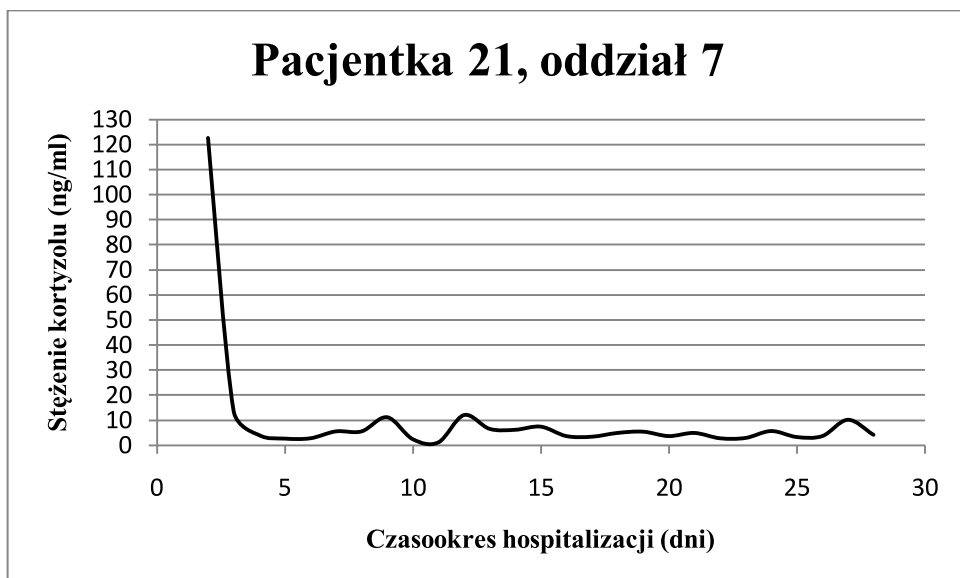
		29.03.	1,250			11.11.	9,500
		30.03.	9,500			12.11.	5,875
		31.03.	2,500			13.11.	2,875
		01.04.	6,375			14.11.	5,250
		02.04.	3,750			15.11.	4,625
		03.04.	3,625			16.11.	2,8125
						17.11.	5,125
						18.11.	3,000
						19.11.	7,625

4.3.7. Wpływ pozostałych leków psychotropowych na wydzielanie kortyzolu

W przypadku depresji pojawiającej się w chorobie afektywnej dwubiegunowej nie jest wskazane stosowanie typowych leków przeciwdepresyjnych ze względu na duże prawdopodobieństwo wystąpienia w trakcie ich podawania epizodu maniakalnego. Ponadto u pacjentek w starszym wieku, u których depresji współtowarzyszą zaburzenia organiczne, również często podaje się leki należące do starszej generacji neuroleptyków. Dlatego też kilka z badanych probantek leczono innymi lekami psychotropowymi, takimi jak perazyna, hydroksyzyna, zyprazydon i olanzapina. Wspomniana farmakoterapia nie odpowiadała celowi postawionemu w pracy, jednakże warto zauważyć, iż także w przypadku tych preparatów profile zmian stężenia kortyzolu u badanych probantek wyglądały podobnie do przedstawionych powyżej, co ilustrują wyniki oznaczeń poziomu hormonu zebrane w Tabeli 29 i 30. Natomiast profil zmian poziomu hormonu pod wpływem stosowanych neuroleptyków u przykładowych pacjentek o symbolach 13 i 21 zilustrowano na Rys. 43 i 44.



Rys. 43 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii perazyną



Rys. 44 Zmiany stężenia kortyzolu podczas terapii zyprazydonem

Tabela 29. Wyniki analizy poziomu kortyzolu u pacjentek leczonych perazyną

Perazyna									
Pacjentka 13, oddział 7		Pacjentka 18, oddział 7		Pacjentka 19, oddział 7		Pacjentka 38, oddział 7		Pacjentka 62, oddział 7	
Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)
23.04.	26,250	20.06.	26,250	18.07.	3,000	13.01.	133,500	06.07.	8,750
25.04.	25,000	21.06.	12,500	19.07.	6,250	14.01.	123,000	07.07.	4,625
26.04.	4,375	22.06.	6,250	20.07.	5,750	15.01.	11,250	09.07.	3,250
27.04.	7,000	23.06.	2,625			16.01.	15,000	10.07.	8,625
28.04.	1,500	24.06.	3,125			17.01.	5,000	11.07.	2,500
29.04.	1,625	25.06.	2,500			18.01.	85,000		
30.04.	1,750	26.06.	2,000			19.01.	17,500		
02.05.	1,625	27.06.	3,375			20.01.	43,750		
03.05.	1,875	28.06.	2,875			21.01.	18,750		
04.05.	1,375	29.06.	8,250			22.01.	7,500		
05.05.	1,750					24.01.	17,50		
06.05.	2,250					25.01.	8,625		
07.05.	2,000					26.01.	3,500		
09.05.	1,250					27.01.	4,125		
10.05.	2,250					28.01.	8,125		
11.05.	1,250					29.01.	3,750		
13.05.	2,125					30.01.	4,250		
14.05.	2,375					31.01.	11,250		
15.05.	2,125					01.02.	6,125		
19.05.	1,375					02.02.	9,625		
20.05.	1,375					03.02.	13,250		
21.05.	2,250					04.02.	5,875		
22.05.	2,250					05.02.	12,625		
23.05.	1,375					06.02.	3,500		
24.05.	2,000					07.02.	4,500		
25.05.	1,250					08.02.	15,000		
26.05.	2,250					09.02.	8,375		
28.05.	4,125					10.02.	11,500		
29.05.	1,250					11.02.	5,500		
						12.02.	3,125		
						13.02.	6,250		
						14.02.	6,625		
						15.02.	5,375		
						16.02.	9,125		

						17.02.	13,750		
						18.02.	3,750		
						19.02.	16,250		
						20.02.	38,750		
						21.02.	9,500		
						22.02.	42,500		
						23.02.	9,000		
						24.02.	18,750		
						25.02.	5,625		
						26.02.	17,500		
						28.02.	13,3125		
						01.03.	78,250		

Tabela 30. Wyniki analizy poziomu kortyzolu u pacjentek leczonych lekami neuroleptycznymi

perazyna i hydroksyzyna		hydroksyzyna		zyprazydon		olanzapina					
Pacjentka 10, oddział 7		Pacjentka 20, oddział 7		Pacjentka 73, oddział 7		Pacjentka 21, oddział 7		Pacjentka 23, oddział 7		Pacjentka 65, oddział 7	
Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)	Data	Stężenie (ng/ml)
20.04.	42,500	16.07.	21,250	22.07.	17,250	15.07.	129,125	26.07.	38,750	13.07.	41,000
21.04.	32,500	17.07.	16,250	27.07.	16,500	19.07.	122,500	27.07.	36,500	14.07.	39,000
22.04.	13,750	18.07.	15,000	29.07.	12,3125	20.07.	13,750	28.07.	4,750	15.07.	22,000
24.04.	56,250	19.07.	15,000	30.07.	9,750	26.07.	4,125	29.07.	7,500	16.07.	17,500
26.04.	7,500	20.07.	18,750	31.07.	3,125	27.07.	2,750	31.07.	7,500	18.07.	2,500
27.04.	28,750	22.07.	10,000	02.08.	9,375	29.07.	2,875	01.08.	12,500		
29.04.	12,500	23.07.	9,750	03.08.	10,9375	31.07.	5,625	02.08.	9,375		
30.04.	12,500	24.07.	10,000	04.08.	8,750	06.08.	5,625	03.08.	1,625		
02.05.	25,000	26.07.	6,875	05.08.	8,000	07.08.	11,250	04.08.	2,125		
03.05.	16,250	27.07.	2,750	06.08.	2,875	08.08.	2,500	05.08.	2,625		
04.05.	20,000	28.07.	8,750	07.08.	5,000	10.08.	1,250	06.08.	7,625		
05.05.	7,500			08.08.	7,500	12.08.	12,125	07.08.	7,125		
06.05.	3,750			09.08.	4,125	13.08.	6,625	08.08.	6,625		
07.05.	10,000			10.08.	7,750	14.08.	6,250	09.08.	9,500		
08.05.	4,125			11.08.	6,250	16.08.	7,500	10.08.	3,750		
09.05.	5,750			12.08.	3,750	17.08.	3,750	11.08.	4,375		
12.05.	8,625			13.08.	12,000	19.08.	3,500	12.08.	12,375		
13.05.	10,000			14.08.	10,375	20.08.	5,000	13.08.	12,000		
14.05.	2,500			15.08.	10,375	21.08.	5,500	14.08.	10,875		

15.05.	2,375				16.08.	1,750	22.08.	3,750	16.08.	6,250	
16.05.	2,500				17.08.	5,250	23.08.	5,000	17.08.	5,625	
17.05.	21,250				18.08.	4,125	24.08.	2,875	18.08.	5,250	
19.05.	25,000				19.08.	5,250	28.08.	3,000	19.08.	7,500	
					20.08.	3,750	30.08.	5,750	20.08.	2,500	
					21.08.	1,625	31.08.	3,375	21.08.	6,000	
					22.08.	11,250	01.09.	3,750	22.08.	3,875	
					23.08.	9,500	02.09.	10,250	23.08.	6,250	
					25.08.	10,500	03.09.	4,250	24.08.	7,000	
					26.08.	7,500			25.08.	23,375	
					27.08.	1,375			26.08.	3,500	
					28.08.	5,875			27.08.	6,250	
					29.08.	9,250			28.08.	9,625	
									30.08.	10,500	
									31.08.	5,000	
									01.09.	1,750	
									02.09.	1,875	
									03.09.	1,750	
									04.09.	5,000	
									05.09.	4,750	
									06.09.	3,375	
									07.09.	1,500	

5. Dyskusja wyników

W 2007 roku minęło 50 lat od opublikowania pierwszego artykułu traktującego o działaniu przeciwdepresyjnym imipraminy, będącej pierwszym lekiem przeciwdepresyjnym należącym do grupy TPLD. Od tego czasu wprowadzono do leczenia ponad 50 leków stosowanych w tym schorzeniu. W międzyczasie, wiele z nich wycofano ze względu na działania niepożądane, a etiologia depresji nadal nie jest do końca poznana. Obecnie poszukuje się nowych preparatów o działaniu przeciwdepresyjnym, nie tylko koncentrując się na ich wpływie na neuroprzekaźniki ale również działających na inne struktury i receptory. Do takich kierunków zainteresowań należą m.in. inhibitory syntezy steroidów, agoniści receptora glukokortykosteroidowego czy neuroaktywnych steroidów (62, 63, 64).

Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badania miały na celu określenie wpływu leków przeciwdepresyjnych, stosowanych zarówno w monoterapii jak i polipragmazji, na wydzielanie kortyzolu u pacjentek hospitalizowanych z powodu depresji. Wzrost wydzielania kortyzolu spowodowany zaburzeniami aktywności osi podwzgórze - przysadka - nadnercza został potwierdzony licznymi badaniami, tak iż obecnie uważa się, że jedną z przyczyn występowania depresji jest osłabienie sprzężenia zwrotnego osi HPA (3, 4). Wybór pacjentek, jako grupy badanej podyktowany był tym, iż depresja należąca do najczęściej występujących chorób na świecie dotyka w głównej mierze właśnie tej płci. Ponadto przebieg schorzeń psychicznych jest dużo intensywniejszy u kobiet niż ma to miejsce u mężczyzn (65).

Przystępując do realizacji badań należało dokonać wyboru materiału biologicznego, który umożliwi w łatwy i prosty sposób oznaczenie ilościowe kortyzolu. Najczęściej stosowanym w tym celu materiałem diagnostycznym jest krew, która umożliwia oznaczenie całkowitego stężenia hormonu, jednak możliwość wywołania infekcji oraz dyskomfortu związanego z codziennym pobieraniem tego materiału stanowi istotną przeszkodę w realizacji założonego celu. Drugim co do częstości wykorzystania materiałem biologicznym jest mocz, szczególnie polecany podczas badań przesiewowych w kierunku wykrycia syndromu Cushinga, jednak w tym przypadku pobór materiału do badań odbywa się poprzez zbiórkę dobową, co również nie jest korzystne dla pacjentek przebywających w szpitalu. Natomiast ślina, jako materiał biologiczny, umożliwia nieinwazyjny oraz bezstresowy pobór próbek, przez co ogranicza możliwość zwiększonego wydzielania kortyzolu w odpowiedzi na stres związany z codziennym pobieraniem krwi. Ponadto w przytoczonej w części teoretycznej

literaturze wielokrotnie podkreślano silną zależność pomiędzy zmianami stężenia kortyzolu we krwi, w moczu i w ślinie (48 – 61).

Kolejnym krokiem w kierunku realizacji założonego programu badań było opracowanie metody analitycznej pozwalającej na szybkie i precyzyjne określenie poziomu kortyzolu w ślinie. Z przedstawionego we Wstępie piśmiennictwie wynika, iż do najczęściej stosowanych metod ilościowego oznaczania hormonów należą techniki nieseparacyjne (38 – 43). Jednak w przypadku prowadzenia badań z użyciem tych metod zachodzi prawdopodobieństwo wystąpienia tzw. reakcji krzyżowej, która może spowodować zawyżenie wyników oznaczeń kortyzolu (46). Również ze względu na niskie stężenie analizowanego hormonu w ślinie u zdrowych ochotników, zastosowanie metod nieseparacyjnych mogłoby przyczynić się do wystąpienia dużego błędu, a tym samym zafałszowania wyników. W związku z tym zdecydowano się na zastosowanie metody separacyjnej – HPLC z detekcją UV, którą stosuje się od początku lat 90' z uwagi na możliwość precyzyjnego kortyzolu w ślinie (66, 67).

Podczas opracowywania metody analitycznej próbki śliny pobierano w godzinach wieczornych, co wynikało z udokumentowanego dobowego rytmu wydzielania kortyzolu, w którym stężenie hormonu jest najniższe około godziny dwudziestej (1). Dlatego też materiał biologiczny przeznaczony do wyznaczenia krzywej kalibracji oraz walidacji metody był gromadzony o tej porze dnia, kiedy to stężenie kortyzolu w ślinie nie przekracza 1 ng/ml (44). W przypadku analizy próbek pochodzących od zdrowych ochotników oraz materiału pobieranego od pacjentek cierpiących na depresję, w którym oznaczano zmiany poziomu hormonu, pobór śliny do badań odbywał się około godziny 10, kiedy to wydzielanie kortyzolu jest największe. Ślinę zbierano do plastikowych probówek, bez wcześniejszej stymulacji, co wynikało przede wszystkim z potrzeby jak największego skrócenia czasu poboru materiału ze względu na stan hospitalizowanych probantek. Podobny sposób gromadzenia materiału opisywano również w literaturze (52, 54, 55).

Po przeprowadzeniu optymalizacji metody analitycznej zdecydowano się na oznaczanie kortyzolu w objętości 1 ml materiału biologicznego z użyciem ekstrakcji typu LLE (rozdział 4.1.), która zapewnia lepsze oczyszczenie próbki oraz skrócenie czasu jej przygotowania. Jest to szczególnie istotne jeżeli uwzględnimy fakt, że metodę przygotowano do analizy materiału biologicznego pochodzącego od 97. pacjentek, obejmującego łącznie 2653. próbki. Ponadto metoda z użyciem ekstrakcji LLE charakteryzowała się lepszą precyzją oznaczeń niż ekstrakcja SPE. Ocenę wydajności zastosowanego typu ekstrakcji przeprowadzono dla dwóch stężeń kortyzolu, 15 i 125 ng/ml. Na podstawie zestawionych w Tabeli 8 danych można

wnioskować, że w trakcie ekstrakcji typu LLE obserwuje się mniejsze straty analitu niż ma to miejsce w przypadku ekstrakcji SPE, co potwierdzono obliczając stosunek stężenia analitu w próbce, którą poddano pełnej procedurze analitycznej do stężenia analitu w próbce, do której kortyzol dodano po przeprowadzeniu procesu ekstrakcji. Dla obu badanych stężeń kortyzolu wydajność ekstrakcji przekroczyła 94%.

Postępowanie analityczne obejmujące wszystkie próbki, zarówno te przeznaczone do walidacji metody i pochodzące od zdrowych ochotników, jak i otrzymane od pacjentek, przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.5.1. Podobną procedurę stosuje się również w przypadku innych materiałów biologicznych, m.in. krwi (57). Przed przystąpieniem do analizy, próbki śliny zamrażano w celu usunięcia mucyn (52), ponadto w trakcie procedury analitycznej pozbywano się reszty białek rozpuszczając suchą pozostałość po odparowaniu warstwy dichlorometanowej w acetonitrylu (46). Dodatkowo wykonano test zamrażania i rozmrażania próbek śliny obciążonych kortyzolem, którego procedurę opisano w rozdziale 3.5.3. W efekcie tych badań stwierdzono, że zamrażanie próbek śliny przed ich analizą nie powoduje strat analitu. Analiza zestawionych w Tabeli 5 wyników wskazuje, iż pomimo przeprowadzenia czterech cykli zamrażania i rozmrażania próbek, odzysk dla każdego z badanych stężeń przekroczył 93%.

Analizę chromatograficzną przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.5.2. Warunki analizy zmodyfikowano w stosunku do opisanych w literaturze (44 – 46), wprowadzając prosty układ binarny w układzie izokratycznym, umożliwiający satysfakcjonujący rozdział związków. W cytowanym we Wstępie piśmiennictwie jako modyfikator wymieniano najczęściej metanol, a ponadto rozdział przeprowadzono stosując technikę pracy w gradiencie (44 - 46).

Detekcję kortyzolu oraz karbamazepiny prowadzono przy długości fali 240 nm. Przed przystąpieniem do analizy zarejestrowano widmo absorpcji kortyzolu. Stwierdzono, że maksimum absorpcji dla tego związku występuje przy długości fali 240 nm, co odpowiada wymaganiom farmakopealnym oraz jest zgodne z danymi literaturowymi (66).

Krzywą kalibracji wyznaczono w przedziale stężeń od 5 do 200 ng/ml i również w tym przedziale potwierdzono liniowość opracowanej metody ($r = 0,9997$). Zakres stężeń, w którym wyznaczono krzywą kalibracji, rozszerzono w stosunku do danych literaturowych (44, 45), ze względu na potrzebę oznaczenia kortyzolu u pacjentek hospitalizowanych z powodu depresji, u których należało się spodziewać podwyższonego poziomu hormonu.

Zastosowana metoda ekstrakcji oraz warunki analizy chromatograficznej pozwoliły na opracowanie selektywnej metody oznaczania kortyzolu w ślinie. Chromatogram ekstraktu nieobciążonej śliny pobranej od zdrowego ochotnika około godziny dwudziestej i próbki tego materiału biologicznego z dodatkiem różnych stężeń kortyzolu ilustruje Rys. 2. W miejscu występowania pików analitu oraz wzorca wewnętrznego nie stwierdzono obecności zanieczyszczeń pochodzących z matrycy biologicznej, dzięki czemu możliwe jest oznaczenie także niższych stężeń kortyzolu w nieobciążonych próbkach śliny gromadzonych około godziny dziesiątej, gdy stężenie wydzielanego kortyzolu w ślinie pochodzącej od zdrowych ochotników oraz badanych pacjentek jest najwyższe.

Opracowaną metodę analityczną zvalidowano określając jej powtarzalność oraz odtwarzalność. W obu przypadkach obliczone wartości współczynników zmienności charakteryzowały się niską wartością, t.j. nie przekraczały 10% (CV). Pozwala to wnioskować o dobrej precyzji oznaczeń zarówno serii jednoczesnej (intra – day) jak i między dniami (inter – day). Ponadto odtwarzalność metody potwierdzono nie tylko poprzez wykonanie analizy w różnym czasie, ale również na innym aparacie HPLC oraz przy zastosowaniu odczynników pochodzących z innej firmy, kontrolując tym samym odporność opracowanej metody. Na podstawie uzyskanego odzysku analitu, obliczonego w oparciu o wyniki otrzymane w trakcie badania powtarzalności i odtwarzalności metody, określono dokładność metody. W związku z tym, że w obu przypadkach minimalna wartość odzysku wyniosła 93,20%, można stwierdzić że badana metoda jest dokładna.

Scharakteryzowana powyżej metoda analityczna posłużyła do określenia zmian poziomu kortyzolu w ślinie pacjentek hospitalizowanych z powodu depresji. Dane zamieszczone w piśmiennictwie cytowanym we Wstępie (3, 4) wykazują, że u większości chorych dochodzi do zwiększonego wydzielania kortyzolu na skutek zaburzeń sprzężenia zwrotnego osi HPA. Dlatego też przystępując do badań można było założyć, iż u większości z badanych probantek stężenie hormonu będzie podwyższone, co potwierdziły wyniki późniejszych analiz. Zastosowanie detekcji UV pozwoliło na wyznaczenie granicy wykrywalności na poziomie 2 ng/ml, natomiast oznaczalności - 5 ng/ml, co jest zgodne z danymi literaturowymi (57), w których granicę wykrywalności określono na poziomie 3 ng/ml.

Przed przystąpieniem do analizy danych uzyskanych w wyniku oznaczenia poziomu hormonu w próbkach śliny pochodzących od pacjentek, określono poziom kortyzolu w ślinie zdrowych ochotniczek, pobranej około godziny dziesiątej, tak aby stanowiła materiał odniesienia dla poziomu hormonu oznaczonego w próbkach śliny pacjentek z depresją.

Otrzymane wartości mieściły się w zakresie stężeń pomiędzy 3,125 a 7,500 ng/ml i są zgodne z danymi literaturowymi (48, 50, 52, 54, 55, 59), według których stężenie wydzielanego kortyzolu oznaczone w ślinie osób zdrowych w godzinach porannych mieści się w zakresie stężeń pomiędzy 2,30 a 6,37 ng/ml. Za wartości referencyjne dla poziomu kortyzolu oznaczonego w ślinie w godzinach porannych, przyjęto zakres stężeń od 1 do 8 ng/ml, natomiast poziom hormonu wydzielanego wieczorem nie powinien przekraczać 1 ng/ml (46).

Po zebraniu wszystkich danych o czasookresie pobytu pacjentek w szpitalu, ich krotności oraz zastosowanej farmakoterapii, nie stwierdzono zależności pomiędzy stosowanym lekiem a czasookresem hospitalizacji pacjentki. Zobrazowano to na Rys. 3, na którym przedstawiono czas pobytu probantek w szpitalu oraz podawane preparaty. Stwierdzono, że tylko na podstawie zastosowanego leku nie można jednoznacznie określić, jak długo będzie trwała hospitalizacja pacjentki. W ten sposób wykluczono, że lek lub grupa leków przeciwdepresyjnych determinuje czas leczenia. Pozwoliło to założyć wpływ innych czynników na szybkość poprawy stanu pacjentek, m.in. poziomu kortyzolu. Teorię tę potwierdzają liczne doniesienia naukowe (3, 4, 68 – 73), traktujące depresję jako stan długotrwałego stresu powodującego wzrost aktywności układu HPA, a w następstwie tego również poziomu kortyzolu (74 – 76). Dlatego też istotna jest odpowiedź na pytanie jak stosowane powszechnie leki przeciwdepresyjne będą wpływały na poziom kortyzolu. Jak wspomniano we Wstępie, tylko nieliczne publikacje traktują o zmianach stężenia tego hormonu podczas trwania terapii (6, 30 - 33), natomiast wielokrotnie badano wpływ leków przeciwdepresyjnych na poziom kortyzolu u zdrowych ochotników oraz u chorych po zakończeniu leczenia (6 – 38).

Leczenie pierwszego epizodu depresyjnego rozpoczyna się od zastosowania dowolnego leku przeciwdepresyjnego w monoterapii (77, 78). W niniejszej pracy badano wpływ najczęściej stosowanych leków przeciwdepresyjnych podawanych zarówno w monoterapii jak i polipragmazji na wydzielanie kortyzolu. Najstarszymi lekami przeciwdepresyjnymi są leki z grupy TLPD. Obecnie najczęściej podawanymi preparatami z tej grupy są amitryptylina i klomipramina (77), co ujawniły m.in. niniejsze badania, ponieważ na dwanaście pacjentek leczonych w monoterapii lekami z grupy TLPD, siedem otrzymywało amitryptylinę, natomiast trzy klomipraminę. Pozostałe dwie pacjentki otrzymywały opipramol i doksepinę.

Zaobserwowano, iż w przypadku pacjentek z podwyższonym początkowym poziomem kortyzolu niezależnie od zastosowanego preparatu, szybkość obniżania się stężenia hormonu determinowała okres pobytu pacjentki w szpitalu. Potwierdzają to dotychczasowe doniesienia

(6, 9), z których wynika, że po przeprowadzonej terapii pacjentek ze stwierdzoną depresją, w tym również lekooporną, następuje zmniejszenie wydzielania kortyzolu. Ponadto poprawa stanu pacjentki zależała od szybkości obniżania się poziomu hormonu, co w szczególności dotyczyło pacjentek leczonych amitryptyliną. Uwidoczniło się to zwłaszcza u probantek, których pobyt w szpitalu nie przekroczył 20 dni.

Podczas realizacji badań zaobserwowano również, że u wszystkich pacjentek leczonych lekami z grupy TLPD, po 30. dniu terapii następowało zwiększenie wydzielania kortyzolu, które po upływie kilku (do pięciu) dni ustępowało. W badaniach prowadzonych przez Weber-Hamann i wsp. (7), określono stężenie kortyzolu w ślinie po 35. dniu terapii. Stwierdzono, że u pacjentek stosujących amitryptylinę poziom hormonu uległ obniżeniu. Czas po którym wykonano oznaczenie, pokrywa się z okresem, jaki upłynął od wtórnego zwiększenia wydzielania kortyzolu w przypadku niniejszych badań. Również wyniki innych opublikowanych badań potwierdzają obniżenie poziomu kortyzolu (8, 9, 79), jednakże w tych przypadkach oznaczenie hormonu prowadzono w dniach, w których jego wydzielanie było obniżone w stosunku do wartości mierzonych w pierwszych dniach terapii.

Ponadto w przedstawionej we Wstępie bibliografii (10, 11, 13) wielokrotnie podkreślano wpływ klomipraminy na działanie receptorów serotoninowych, a w konsekwencji podwyższenie poziomu kortyzolu. W niniejszej pracy, w przypadku pacjentek leczonych tym lekiem wykazano, że po 30. dniu terapii stężenie kortyzolu ulegało podwyższeniu, nawet u probantek, u których początkowy poziom hormonu nieznacznie przekraczał wartości oznaczone w ślinie zdrowych ochotniczek. Następnie stężenie hormonu obniżało się, lecz nadal pozostawało wyższe niż oznaczone w początkowym okresie leczenia. Natomiast u pacjentki o symbolu 41, która wykazywała zwiększone wydzielanie hormonu na początku hospitalizacji nie zauważono obniżenia poziomu hormonu przez większą część pobytu w szpitalu. Obserwacje te potwierdzają hipotezę o modyfikacji receptorów 5-HT przez klomipraminę, co w konsekwencji powoduje podwyższenie poziomu kortyzolu (10, 11, 13, 80, 81).

Rzadziej stosowanymi lekami z grupy TLPD są opipramol i doksepina. W niniejszych badaniach wzięła udział tylko jedna pacjentka (o symbolu 28) stosująca doksepinę, jednakże zaobserwowano, iż profil zmian stężenia kortyzolu różni się od profili pacjentek stosujących inne preparaty należące do grupy TLPD. Początkowy podwyższony poziom kortyzolu po wdrożonej terapii tym lekiem ulega obniżeniu, a wtórny wzrost wydzielania hormonu następuje siedem dni po rozpoczęciu leczenia. W przypadku tej pacjentki nie obserwuje się

podwyższonego poziomu kortyzolu po 30. dniu leczenia. Podobny wpływ doksepyny na stężenie kortyzolu opisano również w literaturze (82).

Opipramol przyjmowała także tylko jedna pacjentka. Zważywszy na mechanizm działania tej substancji, polegający na hamowaniu receptorów serotoninowych 5-HT₂ oraz adrenergicznych α_2 , powinna ona obniżać poziom kortyzolu podobnie jak miało to miejsce w przypadku amitryptyliny czy doksepyny. W badaniu wzięła udział pacjentka, którą hospitalizowano z powodu depresji po raz pierwszy, jednakże poziom kortyzolu pozostawał podwyższony przez cały okres pobytu w szpitalu (153 dni), co świadczy o silnym wpływie osi HPA a także wydzielanego kortyzolu na stan zdrowia pacjentki.

Najczęściej stosowaną grupą leków przeciwdepresyjnych są preparaty z grupy SSRI, które ze względu na mniejszą ilość działań niepożądanych w stosunku do TLPD, podawane są w depresjach o różnym podłożu. Wśród wskazań do aplikacji preparatów z grupy SSRI są depresje związane z chorobą niedokrwienną serca, gdzie udowodniono współistnienie lęku, depresji oraz zaburzeń pracy serca (83, 84). Substancje należące do grupy SSRI są również zalecane jako leki pierwszego wyboru u chorych na depresję w przebiegu chorób neurologicznych, takich jak udar mózgu, stwardnienie rozsiane, padaczka i choroba Alzheimera (85). Ponadto leki SSRI zalecane są również podczas leczenia depresji towarzyszącej bólowi (86), lękom u osób z chorobą Charcot-Marie-Tooth (87), a także w wielu przypadkach depresji towarzyszącej chorobom skóry (88). Innymi wskazaniami do podawania SSRI są również depresje z objawami atypowymi, do których należą: nadmierne łaknienie (hiperfagia), hipersomnia, ociężałość i wrażliwość na odrzucenie (89) oraz depresje występujące u osób w wieku podeszłym (90). Zalecane są także w trakcie terapii sprawców przestępstw seksualnych (91).

W niniejszych badaniach leki SSRI stanowiły najliczniejszą grupę preparatów, tak iż 28 pacjentek było leczonych w monoterapii tą grupą leków, a ponadto 11 pacjentek stosowało je w politerapii, wśród nich najczęściej podawana była sertralina, którą w monoterapii leczono 10 pacjentek oraz citalopram i jego enancjomer – escitalopram, które w sumie stosowano u 12. pacjentek. W trakcie badań zaobserwowano, iż w przypadku probantek leczonych nieselektywnymi inhibitorami wychwyty zwrotnego serotoniny, u których wyjściowy poziom kortyzolu był nieznacznie podwyższony oraz u których wystąpiła szybka odpowiedź organizmu na zastosowaną farmakoterapię w postaci obniżenia poziomu kortyzolu (w przeciągu 3. dni), pobyt pacjentek w szpitalu był krótki – poniżej 20. dni, a oznaczone stężenie hormonu nie przekraczało wartości referencyjnych do końca trwania hospitalizacji.

Podobną zależność zaobserwowano również w przypadku pacjentek leczonych lekami z grupy TLPD, a szczególności stosujących amitryptylinę.

W przypadku pacjentek, których okres hospitalizacji przekroczył 30 dni, obniżenie poziomu kortyzolu nastąpiło również stosunkowo szybko (pomiędzy 3. a 6. dniem), jednakże po 30. dniu farmakoterapii wykryto ponowny wzrost wydzielania hormonu. Wzrost wydzielania kortyzolu obserwowano niezależnie od wyjściowego stężenia hormonu, oznaczonego w pierwszych dniach pobytu w szpitalu. Podobne zmiany w profilach wydzielania kortyzolu zauważono również u pacjentek leczonych preparatami z grupy TLPD, przy czym wtórny wzrost stężenia kortyzolu obserwowano po 35. dniu terapii. Ponadto w przypadku pacjentek stosujących I generację leków przeciwdepresyjnych, stężenie kortyzolu obniżyło się do wartości referencyjnych, czego nie stwierdzono u pacjentek leczonych lekami z grupy SSRI. Może to mieć związek z bezpośrednim wpływem tej grupy leków (SSRI) na receptory serotoninowe.

Dotychczas prowadzone badania nie dają jednoznacznej odpowiedzi, jak leki z grupy SSRI wpływają na wydzielanie kortyzolu. Wielokrotnie potwierdzono wzrost wydzielania hormonu po zastosowaniu citalopramu u osób zdrowych (14 - 18, 21), natomiast w przypadku chorych, u których nastąpiło zaburzenie działania osi HPA wpływ leków z grupy SSRI nie jest już tak jednoznaczny. Z piśmiennictwa (17, 18) wiadomo, iż citalopram powoduje obniżenie wydzielania kortyzolu u pacjentów poddanych terapii tym lekiem trwającej co najmniej 10 tygodni. Nie zaobserwowano natomiast takiej reakcji organizmu podczas ośmiotygodniowej farmakoterapii citalopramem (19, 20).

Na podstawie przeprowadzonych badań wykryto, że w przypadku pacjentek leczonych citalopramem oraz escitalopramem, po 30. dniu terapii, kiedy to poziom hormonu był już zbliżony do wartości referencyjnych, wystąpiło ponowne podwyższenie stężenia kortyzolu, jednakże wzrost jego wydzielania był tylko przejściowy. Nie zauważono również by wtórne podniesienie stężenia analitu było tak wysokie, jak poziomu hormonu oznaczany w pierwszych dniach terapii. Może to świadczyć, iż amplitudy zmian stężenia kortyzolu ulegają zmniejszeniu wraz z czasem trwania terapii citalopramem. Stąd też różnice jakie pojawiły się w wynikach dotychczas przeprowadzonych i opublikowanych badaniach (17 - 20).

Pozostałe badane leki należące do grupy SSRI wykazały podobny do citalopramu wpływ na wydzielanie kortyzolu, co potwierdzono m.in. oznaczając wpływ sertraliny na poziom hormonu, przed oraz po czteromiesięcznej kuracji lekiem (92). Również w tym przypadku

poziom kortyzolu u probantów z depresją był niższy po przeprowadzonej terapii, która trwała ponad 10 tygodni, niż przed jej rozpoczęciem.

Lekiem działającym podobnie jak SSRI na przekąźnictwo serotoninericzne, a dodatkowo noradrenergiczne jest wenlafaksyna, która jest jednym z podstawowych leków stosowanych w terapii depresji (62). Najczęściej stosowana jest w przypadku głębokich i wymagających hospitalizacji epizodów depresyjnych (77) oraz w leczeniu i profilaktyce zaburzeń depresyjnych nawracających (93). Ze względu na wpływ wenlafaksyny na neuroprzekąźniki serotoninowe i noradrenergiczne, podawana jest również w terapii bólu przewlekłego, który często może być spowodowany zmniejszoną aktywnością szlaków neuronalnych biorących udział w patogenezie depresji (94, 95). Ponieważ w wielu przypadkach chorobom somatycznym towarzyszy depresja, badania z zastosowaniem wenlafaksyny prowadzono w neuropatii cukrzycowej, w leczeniu migren, jak również podczas terapii chronicznych zespołów bólowych o różnej etiologii (94).

Wenlafaksyna podobnie jak leki z grupy SSRI znalazła także zastosowanie w leczeniu depresji w przebiegu chorób neurologicznych (85), w psychodermatologii, a w szczególności w leczeniu dysmorfofobii oraz w terapii nerwicowych przeczosów (samookaleczania się przy pomocy papierosów, chemikaliów lub ostrych narzędzi) (88). Wenlafaksyna jest również podawana w farmakoterapii depresji występującej u osób starszych (90, 96).

W publikacjach przedstawiających wpływ wenlafaksyny na wydzielanie kortyzolu podkreślano jej zróżnicowane oddziaływanie na poziom hormonu u osób zdrowych oraz cierpiących na depresję (22 – 24). Jak już wspomniano lek ten hamuje wtórny wychwyt serotoniny oraz noradrenaliny. Wiadomym jest, iż mniejsze dawki wenlafaksyny działają głównie na receptor serotoninowy, dlatego też zrozumiałym wydaje się fakt podwyższenia wydzielania kortyzolu po podaniu tego leku osobom zdrowym (22, 23). Podobny wpływ na poziom hormonu obserwowano po aplikacji citalopramu oraz klomipraminy (10, 14 – 16).

U osób chorych na depresję, u których stwierdzono podwyższony poziom kortyzolu, wenlafaksyna po kilkutygodniowej terapii spowodowała obniżenie stężenia hormonu, jednakże nie nastąpiła normalizacja osi HPA, co manifestowało się podwyższonym poziomem ACTH (24). Ponadto zaobserwowano, że w przebiegu depresji dochodzi do zmniejszenia aktywności enzymów odpowiadających za rozkład kortyzolu, co również może przyczyniać się do podwyższenia poziomu tego hormonu. W trakcie terapii wenlafaksyną stwierdzono, iż aktywności enzymów wróciła do normy (25).

W niniejszych badaniach stwierdzono, że wenlafaksyna wywiera zróżnicowane działanie na zmiany poziomu kortyzolu, co w znaczący sposób wpływało na czas trwania hospitalizacji. W przypadku probantek, u których zaobserwowano szybką odpowiedź organizmu na prowadzoną farmakoterapię, tak iż poziom kortyzolu obniżył się do wartości referencyjnych w ciągu pierwszych kilku dni leczenia, okres pobytu w szpitalu nie przekroczył 30 dni. Natomiast w przypadku pacjentek, u których normalizacja wydzielania kortyzolu trwała ponad 30 dni, zaobserwowano większe wahania poziomu hormonu w trakcie leczenia. Ponadto zauważono również, iż po prawie 30. dniach pobytu w szpitalu, u dwóch pacjentek stosujących wenlafaksynę nastąpił silny wzrost wydzielania kortyzolu, podobny do tego jaki występował u probantek leczonych preparatami z grupy TLPD, m.in. amitryptyliną, czy SSRI, np. citalopramem. Uwidaczniało się to w szczególności u pacjentek, których czas hospitalizacji najczęściej przekroczył 60 dni. Tylko jedna z badanych probantek, u której obserwowano wtórny wzrost poziomu kortyzolu, przebywała w szpitalu 50 dni.

Ponadto zaobserwowano również, iż na czasookres hospitalizacji miała wpływ amplituda zmian stężenia kortyzolu w trakcie leczenia, natomiast nie odnotowano takiej zależności od wyjściowego stężenia hormonu. Nawet w przypadku, gdy poziom kortyzolu oznaczony w początkowym okresie hospitalizacji był bardzo podwyższony, np. u pacjentki oznaczonej symbolem 31 (stężenie kortyzolu przekroczyło 350 ng/ml), okres hospitalizacji trwał zaledwie 34 dni, a czas w jakim doszło do obniżenia wydzielania kortyzolu to 8 dni. Natomiast w przypadku probantki o symbolu 50, której okres hospitalizacji wyniósł 87 dni, mimo stosunkowo nieznacznie podwyższonego poziomu hormonu w początkowym okresie leczenia (40 ng/ml), zaobserwowano silne wahania wydzielania kortyzolu w trakcie całego okresu pobytu w szpitalu.

W opublikowanych danych na temat wpływu wenlafaksyny na poziom kortyzolu (24), terapię tym lekiem prowadzono przez okres 6 tygodni. W przeprowadzonych badaniach w przypadku pacjentek hospitalizowanych poniżej 42. dni (6 tygodni), zaobserwowano również zmniejszenie wydzielania kortyzolu w stosunku do wartości oznaczonych w pierwszych dniach leczenia. Jednakże po zakończeniu leczenia nie zawsze oznaczony poziom hormonu odpowiadał wartościom referencyjnym.

W badaniach określono także wpływ mianseryny na wydzielanie kortyzolu. Lek ten jest jedynym zarejestrowanym w Polsce przedstawicielem grupy SSA, który wykazuje antagonistyczne działanie w stosunku do receptora adrenergicznego α_2 (62). Mianseryna jest najczęściej podawana w depresji, której towarzyszy niepokój oraz bezsenność (77), a ponadto

stosowana jest jako lek z wyboru w przypadku depresji u chorych w stanie terminalnym (97) oraz w leczeniu bezsenności pierwotnej (98).

W opublikowanych dotychczas badaniach niewiele miejsca poświęcono wpływowi mianseryny na wydzielanie kortyzolu. Nieliczne prace na ten temat wskazują, że u osób z depresją mianseryna powoduje normalizację aktywności osi HPA, co w konsekwencji wpływa na obniżenie wydzielania hormonu (27 – 29).

W niniejszych badaniach siedem pacjentek, u których oznaczano poziom kortyzolu w ślinie, leczono mianseryną. W trakcie eksperymentu nie zaobserwowano, aby wydzielanie hormonu trwale obniżyło się do wartości referencyjnych. W kilku przypadkach, po kilku dniach leczenia stężenie kortyzolu było niższe niż oznaczone w pierwszych dniach pobytu w szpitalu. Dotyczyło to w szczególności pacjentek, których okres hospitalizacji nie przekroczył 46 dni. U tych probantek zauważalne jest ponadto nieznaczne przekroczenie wartości referencyjnych poziomu kortyzolu pod koniec pobytu w szpitalu, co może świadczyć o stabilizacji aktywności osi HPA.

W przypadku pacjentek, u których amplituda wahań poziomu kortyzolu była znaczna lub stężenie hormonu nie obniżyło się do wartości oznaczanych w ślinie zdrowych ochotników, czas hospitalizacji wyniósł ponad 55 dni.

Analizowano również wpływ na wydzielanie kortyzolu innych leków przeciwdepresyjnych, rzadziej stosowanych w leczeniu zamkniętym. Były to tianeptyna, moklobemid i mirtazapina, ponadto określono także wpływ trazodonu na poziom hormonu, leku najczęściej podawanego w terapii skojarzonej.

Mechanizm działania tianeptyny polega m.in. na bezpośrednim hamowaniu osi HPA. Powoduje ona również, w przeciwieństwie do pozostałych leków przeciwdepresyjnych, zwiększenie wychwytu zwrotnego serotoniny. Tianeptyna najczęściej podawana jest w przypadku depresji z nasilonym lękiem i zaburzeniami snu (85), a także u chorych w stanie terminalnym (97).

Badania prowadzone z udziałem zdrowych ochotników wykazały, iż tianeptyna powoduje podwyższenie poziomu kortyzolu (35), podobnie jak ma to miejsce w przypadku leków hamujących wtórny wychwyt serotoniny, m.in. citalopramu. Natomiast w przypadku osób cierpiących na depresję stwierdzono, iż tianeptyna w niewielkim stopniu zmniejsza wydzielanie kortyzolu, a ponadto efekt ten nie różni się znacząco od otrzymanego podczas stosowania leków z grupy SSRI (36).

W trakcie przeprowadzonych badań tylko trzy pacjentki otrzymywały tianeptynę, jednakże i w tych przypadkach nie zaobserwowano całkowitej stabilizacji wydzielania kortyzolu, tak iż w trakcie leczenia poziom hormonu podwyższał się. Zauważono jednak, że zmiany stężenia wydzielanego hormonu następowały łagodniej, niż miało to miejsce w przypadku leków z grupy SSRI czy SNRI. Uwidocznilo się to w szczególnie u pacjentek, które hospitalizowano po raz pierwszy. W przypadku pacjentki leczonej w szpitalu po raz siódmy, zmiany poziomu kortyzolu nie odbiegały od tych obserwowanych podczas leczenia probantek lekami z grupy SSRI. Potwierdzają to dane literaturowe (36), wskazujące na obniżenie wydzielania kortyzolu, przy czym zmiany te nie różniły się znacząco od obserwowanych w trakcie terapii SSRI.

Kolejnym lekiem rzadziej stosowanym w leczeniu zamkniętym jest mirtazapina, działająca antagonistycznie w stosunku do receptorów adrenergicznych i serotoninowych (62). Stosowana jest najczęściej w depresji z nasilonym lękiem oraz zaburzeniami snu (85), a także w leczeniu depresji z towarzyszącym przewlekłym, napięciowym bólem głowy (95) oraz w depresji towarzyszącej chorobie Parkinsona (99).

Z dotychczas opublikowanych badań dotyczących wpływu mirtazapiny na poziom kortyzolu wynika, iż u zdrowych ochotników lek ten powoduje obniżenie wydzielania hormonu (30), natomiast w przypadku osób z depresją działanie mirtazapiny nie jest już tak jednoznaczne. W większości opisanych przypadków, w wyniku pięcioletniej terapii mirtazapiną aktywność osi HPA uległa normalizacji i poziom kortyzolu obniżył się (32, 33). Także po zastosowaniu testu DEX/CRH, odpowiedź organizmu osób leczonych mirtazapiną na kortykoliberynę była identyczna z obserwowaną u osób zdrowych i następowało podwyższenie wydzielania hormonu (31).

Realizując cel rozprawy doktorskiej, mirtazapinę w monoterapii zastosowano tylko u jednej pacjentki, u której lek ten również obniżał stężenie kortyzolu. Ponadto szybkość zmniejszenia wydzielania hormonu była proporcjonalna do czasu terapii, o czym świadczy fakt, iż okres hospitalizacji pacjentki wyniósł tylko 12 dni.

Kolejnym badanym lekiem, wywierającym wpływ na poziom kortyzolu był trazodon. W monoterapii preparat ten stosowany jest w leczeniu zaburzeń lękowych, zaburzeń zachowań, t.j. drażliwości, niepokoju, agresji i zachowań opozycyjnych u osób z otępieniem, jak również w leczeniu uzależnień od alkoholu czy benzodiazepin. Ponadto podawany jest też w zaburzeniach snu a także w terapii depresji z nasilonym lękiem oraz ze współistniejącymi z depresją zaburzeniami snu (85, 100).

W ramach prowadzonych badań trazodon stosowano w monoterapii u trzech pacjentek. Zaobserwowano, że pod wpływem zastosowanej terapii poziom kortyzolu uległ szybkiemu obniżeniu i u dwóch z trzech pacjentek, u których początkowe stężenie hormonu nie przekroczyło 40 ng/ml, zmniejszenie jego wydzielania było w znacznej mierze trwałe, ponadto tylko w nielicznych sytuacjach pojawiały się wtórne epizody podwyższonego stężenia kortyzolu. Natomiast u pacjentki, której wyjściowe stężenie hormonu znacznie przekroczyło wartości referencyjne (poziom hormonu u tej pacjentki to 180 ng/ml), nie udało się trwale obniżyć wydzielania kortyzolu, tak iż praktycznie przez cały okres terapii jego stężenie było podwyższone.

Biorąc pod uwagę mechanizm działania trazodonu, polegający na hamowaniu wychwytu zwrotnego serotoniny oraz blokowaniu receptora 5HT₂ (62), podczas jego stosowania należy spodziewać się zmniejszenia wydzielania kortyzolu, podobnie jak miało to miejsce w przypadku terapii mirtazapiną, która również działa antagonistycznie w stosunku do tych receptorów. Jednakże w dostępnej literaturze opisującej działanie trazodonu nie znaleziono informacji o jego wpływie na wydzielanie kortyzolu. Przeprowadzone badania wykazały z kolei, że liczba probantek leczonych tym lekiem w monoterapii jest zbyt mała, by móc wyciągnąć jednoznaczne wnioski o wpływie trazodonu na wydzielanie kortyzolu.

Badania z udziałem trazodonu przeprowadzono na pacjentkach chorych na depresję, których stan zdrowia był na tyle poważny, że nie pozwalał na leczenie ambulatoryjne. W tej sytuacji najlepszym rozwiązaniem było skierowanie na leczenie w szpitalu, stąd też wynika duża liczba probantek, u których zastosowano terapię skojarzoną. Politerapia zaburzeń depresyjnych jest preferowana najczęściej w przypadku tzw. depresji lekoopornej, gdy dwukrotnie zawiodła monoterapia lub podczas współchorobowości zaburzeń, np. zaburzenia lękowe współistnieją z depresją. Ponadto polipragmazję stosuje się gdyż łatwiej jest włączyć drugi lek psychotropowy niż zupełnie zmienić preparat (101).

Podczas leczenia depresji lekoopornej, oprócz potencjalizacji (augmentacji) działania leku przeciwdepresyjnego, w trakcie której podaje się preparaty należące do różnych klas, np.: środki hormonalne jak trijodotyronina, leki przeciwpsychotyczne m.in. olanzapina, kwetiapina, buspiron, normotymiczne – lamotrygina, czy walproinian, możliwe jest również kojarzenie leków należących do tej samej klasy ale posiadających różny mechanizm działania (77, 101). Najczęściej stosuje się połączenie leków z grupy SSRI z lekami grupy TLPD, mirtazapiną lub mianseryną. Spotykane jest również skojarzenie preparatów z grupy SSRI z innym lekiem z tej grupy lub z trazodonem czy z wenlafaksyną (102). Niestety, badania

farmakologiczne dotyczą głównie leków przeciwdepresyjnych w monoterapii (101). Podobnie rzadko prowadzone są prace zmierzające do określenia wpływu terapii skojarzonej na wydzielanie kortyzolu. Nieliczne z nich (9), oprócz porównania skuteczności aktywności osi HPA, dotyczyły wpływu amitryptyliny na wydzielanie kortyzolu, stosowanej w połączeniu z haloperidolem oraz trimipraminy stosowanej w monoterapii. Na podstawie otrzymanych wyników nie stwierdzono różnic w dobowym wydzielaniu hormonu. Jednakże należy brać pod uwagę fakt, że oznaczenia prowadzono w pierwszym oraz w czterdziestym drugim dniu terapii, nie uwzględniając przebiegu leczenia oraz zmian w poziomie kortyzolu w trakcie jej trwania.

Jak wykazały przeprowadzone badania najlepsze wyniki, tzn. trwałe i szybkie obniżenie poziomu kortyzolu, uzyskano stosując skojarzone leczenie lekami z grupy SSRI z trazodonem lub mirtazapiną. Było to szczególnie widoczne w trakcie terapii sertralina, nie zaobserwowano wówczas wtórnego zwiększenia wydzielania hormonu, który był obecny w trakcie monoterapii sertralina. To połączenie leków preferowane jest również przez lekarzy w trakcie terapii skojarzonej (101, 102). Natomiast w przypadku łącznego podawania preparatów z grupy SSRI z mianseryną obserwowano także obniżenie stężenia kortyzolu. Nie było ono jednak trwałe, a oznaczane stężenia kortyzolu nieznacznie przekraczały wartości referencyjne. Podobnie kształtowały się zmiany poziomu hormonu w trakcie terapii lekiem z grupy SSRI, podawanym w połączeniu z preparatem starszej generacji – TLPD. Również w tej sytuacji obserwowano duże wahania poziomu hormonu, a stężenie kortyzolu często przekraczało wartości oznaczane w ślinie zdrowych ochotników. W podobny sposób zmieniał się poziom hormonu w trakcie terapii skojarzonej z wenlafaksyną.

W kilku przypadkach polipragmazji łączono wenlafaksynę z trazodonem lub mianseryną, jednak wtedy najczęściej mimo znacznego zmniejszenia wydzielania kortyzolu, jego poziom nadal pozostał nieznacznie podwyższony.

Terapia skojarzona praktykowana jest najczęściej, gdy zawodzi monoterapia. Należy podkreślić, że w przypadku jej zastosowania znacznie skrócił się czas pobytu pacjentek w szpitalu. Większość z nich hospitalizowano poniżej 50. dni, a tylko jedna przebywała dłużej – 76 dni. Również w tym przypadku wdrożenie polipragmazji powoduje szybkie, a przede wszystkim trwałe zmniejszenie wydzielania kortyzolu. Interesującym wydaje się fakt, iż u większości z badanych probantek, początkowe stężenie kortyzolu nie przekroczyło 40 ng/ml. Tylko w kilku przypadkach poziom hormonu był wyższy i wówczas proces jego trwałego

obniżenia był dłuższy. Również w tej sytuacji nie obserwowano wtórnego silnego wzrostu wydzielania kortyzolu.

Zastosowanie u niektórych pacjentek typowych leków przeciwdepresyjnych nie przynosi oczekiwanych efektów lub też nie jest wskazane leczenie tą grupą leków, jak np. w leczeniu depresji w chorobie afektywnej dwubiegunowej, kiedy zaleca się terapię lekami przeciwpsychotycznymi. Do najczęściej stosowanych preparatów I generacji (klasycznych neuroleptyków) należy perazyna, natomiast II generacji – olanzapina, kwetiapina, zyprazydon. Leki przeciwpsychotyczne mogą być podawane w depresji zarówno w monoterapii, jak i polipragmazji, najczęściej w połączeniu z lekami z grupy SSRI (102). W niniejszej pracy kilka pacjentek stosowało w monoterapii preparaty należące zarówno do I jak i II generacji neuroleptyków. Wpływ preparatów przeciwpsychotycznych na wydzielanie kortyzolu nie stanowił tematu niniejszej pracy, należy jednak zauważyć, iż ich działanie przeciwdepresyjne wywołuje podobną reakcję organizmu na poziom kortyzolu jaką obserwowano w przypadku zastosowania typowych leków przeciwdepresyjnych, co było szczególnie widoczne podczas badania poziomu kortyzolu u pacjentek stosujących preparaty należące do II generacji neuroleptyków – olanzapinę i zyprazydon.

5.1. Interpretacja chemometryczna uzyskanych danych

Poczynione obserwacje potwierdzono wykonując analizę głównych składowych (*Principal Component Analysis*, PCA) oraz analizę skupień (*Cluster Analysis*, CA) (103, 104). PCA używana jest w celu redukcji wymiarowości macierzy bez nadmiernej utraty informacji. Natomiast metoda CA pozwala na grupowanie przypadków lub zmiennych ze względu na występujące między nimi podobieństwa.

Na podstawie otrzymanych w trakcie badań danych utworzono macierz zawierającą 22. zmienne, które obejmowały: wiek probantki (W), liczbę dni pobytu pacjentki w szpitalu (Ld), jego krotkość (Kr) oraz stężenie początkowe (Cp) i końcowe (Ck) kortyzolu. Wzięto także pod uwagę najniższe (Cn) oraz najwyższe (Cw) stężenie hormonu oznaczone w trakcie pobytu probantki w szpitalu, a także różnicę pomiędzy tymi stężeniami (R). Wśród zmiennych znalazły się również średnie stężenie kortyzolu (Cśr) oraz mediana stężeń (M), a także stabilizacja wydzielania kortyzolu, którą określono na podstawie liczby próbek wyrażonych w procentach o stężeniu nie przekraczającym 8 ng/ml (St-8), 10 ng/ml (St-10) i 15 ng/ml (St-15) w stosunku do ogólnej liczby badanych próbek w rozpatrywanym okresie

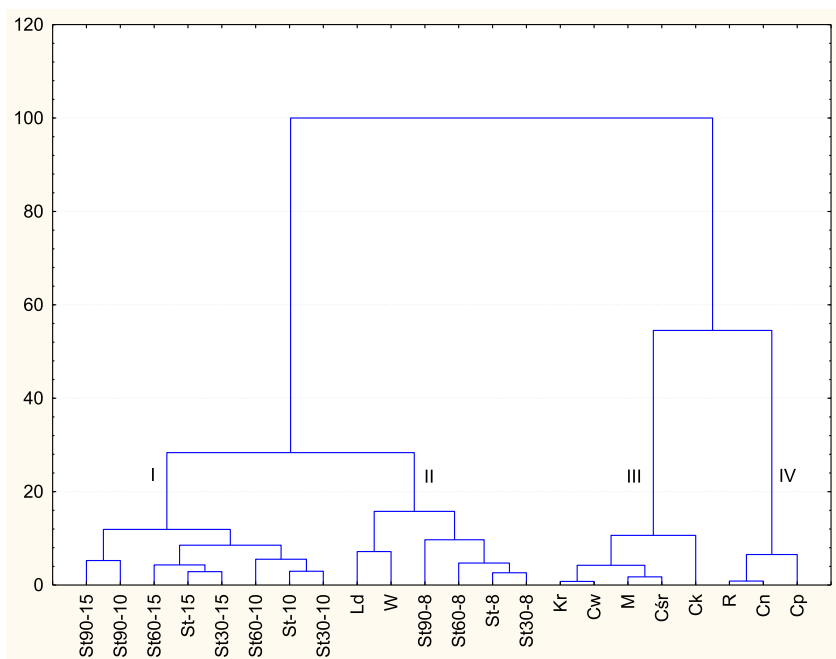
hospitalizacji. Ze względu na zróżnicowany czasookres pobytu probantek w szpitalu zdecydowano się, aby cały okres hospitalizacji traktować jako 100% pobytu danej pacjentki w szpitalu. W ten sposób określono również stabilizację wydzielania kortyzolu po upływie 30% (St30), 60% (St60) i 90% (St90) pobytu pacjentki w szpitalu. Badaniami objęto 97 pacjentek Szpitala dla Nerwowo i Psychicznie Chorych w Starogardzie Gdańskim.

Powyższa macierz zawierała również dane opisujące rodzaj zaburzenia nastroju. Po przeprowadzeniu wstępnych obliczeń CA i PCA okazało się, że zmienne te nie wykazują wpływu na grupowanie się pacjentek, dlatego też nie uwzględniono ich w dalszych obliczeniach.

Obliczenia CA przeprowadzone dla różnych metod aglomeracji i miar odległości wykazały, że najkorzystniejsze wyniki uzyskano stosując metodę Warda jako metodę aglomeracji oraz odległość euklidesową jako miarę odległości. Wyniki analizy skupień przedstawiono w postaci dendrogramu.

Przedstawiony na Rys. 45 dendrogram pozwala stwierdzić, że w odległości poniżej 28% odległości maksymalnej wyróżnia się cztery skupienia, z których I jest największe i obejmuje ponad 36% zmiennych (16 zmiennych), określających stabilizację wydzielania kortyzolu na poziomie 10 i 15 ng/ml hormonu oznaczonego po upływie określonego czasu leczenia.

Drugim co do wielkości skupieniem jest skupienie II łączące się ze skupieniem I w odległości 28% odległości maksymalnej. Grupuje ono sześć zmiennych, które zawierają informacje o stabilizacji wydzielania kortyzolu na poziomie 8 ng/ml i niższym oraz wieku i liczbie dni pobytu pacjentki w szpitalu. Pozostałe zmienne utworzyły dwa kolejne skupienia, III i IV, które łączą się ze sobą w odległości 54% odległości maksymalnej. Klaster III zawiera informacje o stężeniu końcowym kortyzolu, najwyższym jakie wystąpiło podczas hospitalizacji pacjentki, średnim stężeniu oraz medianie hormonu, a także krotności pobytu probantki w szpitalu. Natomiast skupienie IV grupuje zmienne opisujące stężenie początkowe i najniższe oznaczone w trakcie pobytu pacjentki w szpitalu, a ponadto różnicę pomiędzy najwyższym i najniższym stężeniem hormonu u danej pacjentki. Skupienia I i II łączą się z dwoma pozostałymi w maksymalnej mierze odległości.



Rys. 45 Dendrogram przedstawiający sposób grupowania dwudziestu dwóch zmiennych

Z przeprowadzonych uprzednio badań wynika, iż największy wpływ na stabilizację wydzielania kortyzolu na poziomie 8 ng/ml miało pierwsze 30% pobytu pacjentki w szpitalu, co potwierdzona CA (dendrogram zamieszczony na Rys. 45). Należy zauważyć, że w skupieniu II występują wszystkie zmienne opisujące stabilizację wydzielania kortyzolu na tym poziomie, co świadczy o silnej korelacji pomiędzy tymi zmiennymi.

Okres stabilizacji wydzielania kortyzolu na poziomie 10 lub 15 ng/ml (St-10, St-15), oznaczony niezależnie od czasookresu pobytu pacjentki (St30, St60, St90), tworzy jedno skupienie (I), przy czym silna korelacja występuje w przypadku stabilizacji wydzielania kortyzolu na poziomie 10 ng/ml (St-10) w całym okresie hospitalizacji oraz po upływie 30% i 60% pobytu pacjentki w szpitalu. Korelacja jest natomiast dużo słabsza w przypadku stabilizacji wydzielania hormonu oznaczonego w próbkach gromadzonych po 90% hospitalizacji. Zmienna ta (St90-10) wykazuje większą korelację ze zmienną opisującą stabilizację wydzielania kortyzolu na poziomie 15 ng/ml oznaczonym po tym samym okresie pobytu (St90-15).

W skupieniu (III) natomiast wysoką korelację wykazują krotność pobytu pacjentki (Kr) i najwyższe stężenie kortyzolu (Cw). Podobnie silną zależnością charakteryzują się mediana (M) i średnie stężenie hormonu (Csr), natomiast stężenie końcowe (Ck) w najmniejszym stopniu koreluje z pozostałymi zmiennymi skupionymi w tym skupieniu.

W skupieniu IV silna korelacja występuje pomiędzy najniższym stężeniem (Cn) i różnicą pomiędzy najwyższym a najniższym stężeniem (R) kortyzolu. W mniejszym stopniu obie te zmienne korelują za stężeniem początkowym (Cp).

Tę samą metodę użyto do poszukiwania podobieństw i różnic wśród badanych 97 pacjentek, a otrzymane wyniki przedstawiono w formie dendrogramu na Rys. 46. Z uzyskanych danych wynika, że w odległości 33% odległości maksymalnej można wydzielić cztery skupienia, przy czym w odległości nieznacznie mniejszej - 29% odległości maksymalnej wyróżnia się pięć skupień.

Skupienie I obejmuje 23 pacjentki, co stanowi 24% badanej populacji. Są to pacjentki, u których najwyższe stężenie kortyzolu oznaczone na początku leczenia nie przekroczyło 40 ng/ml, natomiast w trakcie terapii nie było wyższe niż 20 ng/ml. Należy również zaznaczyć, iż w odległości poniżej 8% odległości maksymalnej można wyróżnić niewielkie skupienie (Ia) grupujące sześć pacjentek, u których nie stwierdzono podwyższenia poziomu kortyzolu przez cały czas trwania badania, tak iż był on zgodny z wartościami oznaczanymi w ślinie osób zdrowych. Dodatkowo w omawianej grupie pacjentek nie występowały duże amplitudy stężenia hormonu.

Najczęściej stosowanymi lekami u pacjentek skupionych w skupieniu I były preparaty z grupy SSRI, a w szczególności sertralina, którą podawano w monoterapii czterem z dziesięciu badanych pacjentek. Ponadto w skupieniu I znalazła się także pacjentka stosująca fluoksetynę oraz pacjentka leczona moklobemidem. Spośród leków należących do grupy TLPD najczęściej stosowano amitryptylinę, którą przyjmowały dwie pacjentki. W tym samym skupieniu znajduje się również duża grupa pacjentek stosujących polipragmazję – pięć z piętnastu probantek. Również znaczna część pacjentek stosujących leki przeciwpsychotyczne skupiło się w skupieniu I. Zestawienie preparatów stosowanych przez pacjentki zgrupowane w poszczególnych skupieniach przedstawiono w Tabeli 31.

Tabela 31. Preparaty stosowane przez pacjentki zgrupowane w poszczególnych skupieniach

Preparat	Skupienie				
	I	II	III	IV	V
Amitryptylina	2	1	2	1	1
Klomipramina	-	-	3	-	-
Doksepina	-	1	-	-	-
Opipramol	-	-	-	1	-
Sertralina	4	1	3	-	2
Citalopram	1	3	3	-	-
Escitalopram	-	2	3	-	-
Fluwoksamina	-	-	1	2	-
Fluoksetyna	1	-	-	-	-
Paroksetyna	-	1	-	-	1
Wenlafaksyna	2	5	6	-	3
Mianseryna	1	1	4	-	1
Mirtazapina	-	-	1	-	-
Trazodon	-	-	1	1	1
Tianeptyna	1	-	1	1	-
Moklobemid	1	-	-	-	-
Polipragmazja	5	2	7	1	-
Inne leki psychotropowe	4	1	5	-	1

Kolejne trzy skupienia łączą się ze skupieniem I w odległości poniżej 64% odległości maksymalnej, co świadczy o tym, iż dane charakteryzujące pacjentki skupione w nich różnią się między sobą. W pozostałych skupieniach znalazły się probantki, u których amplitudy zmian poziomu kortyzolu są większe, a ponadto stężenia końcowe i początkowe hormonu są dużo wyższe.

Skupienie II grupuje 18 pacjentek, które charakteryzują się przede wszystkim dużymi wahaniami poziomu kortyzolu w trakcie terapii. Ponadto należy zauważyć, że w odległości 8% odległości maksymalnej dzieli się ono na dwa mniejsze skupienia (IIa i IIb), a pacjentki grupujące się w nich nieznacznie różnią się profilami zmian poziomu hormonu w trakcie leczenia. W obejmującej 13 probantek aglomeracji IIa znalazły się przede wszystkim pacjentki, u których stężenie początkowe kortyzolu było wysokie i przekraczało 70 ng/ml. Dodatkowo w początkowym okresie leczenia, mimo obniżania się stężenia hormonu, występowała dość duża amplituda jego zmian. W większości przypadków pobyt w szpitalu pacjentek należących do tej grupy był dość długi i przekraczał 30 dni. W tym okresie wydzielanie hormonu wykazywało krótką stabilizację, po czym amplituda jego zmian zwiększała się. Zdarzało się również, iż poziom kortyzolu stabilizował się, lecz do końca pobytu w szpitalu przekraczał wartości referencyjne.

Skupienie IIb stanowią pacjentki, u których również występowało wysokie stężenie początkowe kortyzolu, jednakże w trakcie terapii ulegało ono obniżeniu i stabilizacji, a poziom hormonu pozostawał nieznacznie wyższy niż w przypadku osób zdrowych.

Wśród leków najczęściej podawanych pacjentkom zgrupowanym w skupieniu II znalazła się wenlafaksyna, którą otrzymywało pięć z piętnastu leczonych tym lekiem pacjentek. Ponadto stosowano citalopram należący do grupy SSRI, który podawano trzem z siedmiu pacjentek oraz escitalopram, który podawano dwóm z pięciu pacjentek.

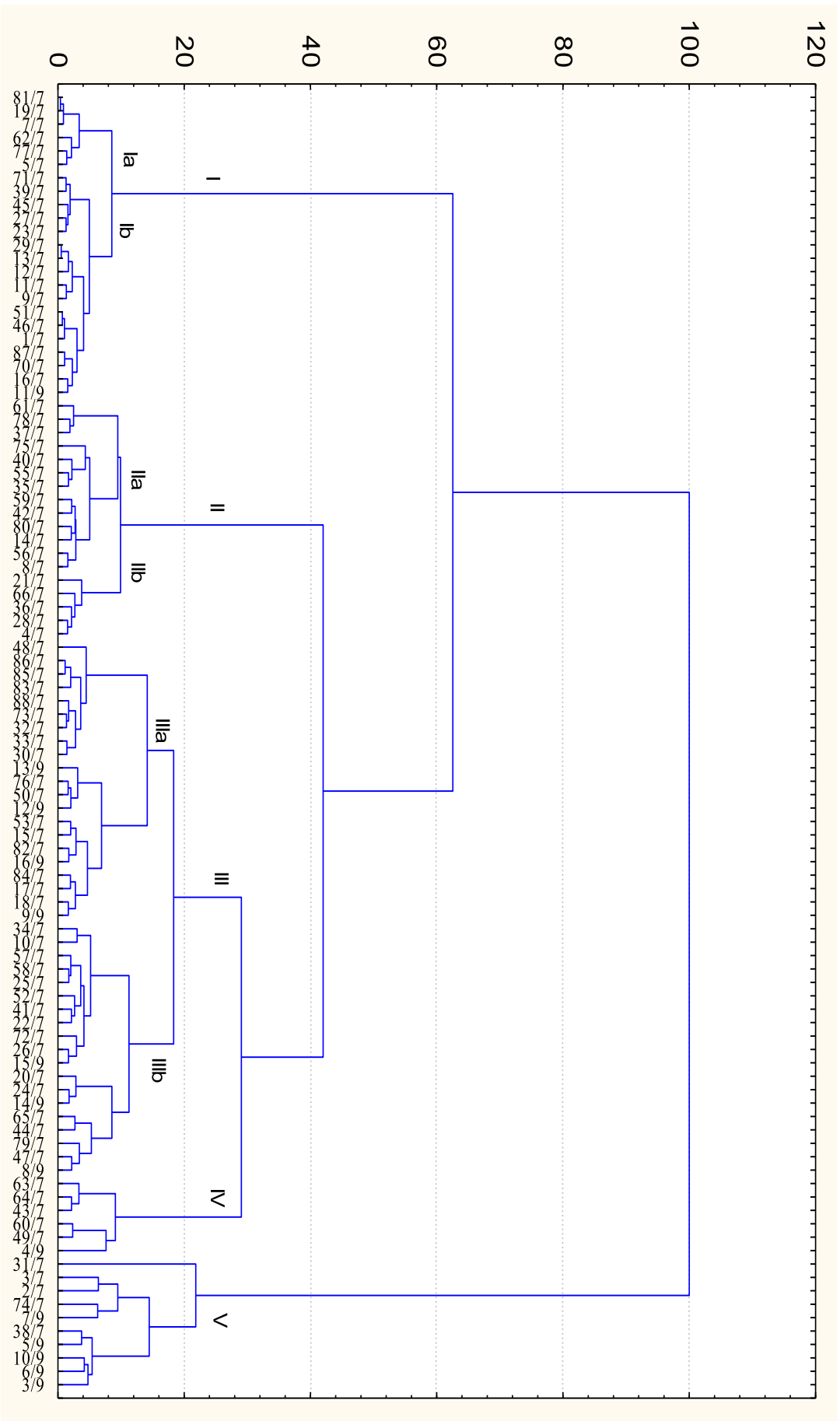
Obejmujące czterdzieści probantek skupienie III utworzyły pacjentki, u których najwyższe stężenie kortyzolu oznaczone na początku leczenia nie przekroczyło 40 ng/ml, jednakże amplitudy jego zmian były stosunkowo duże. Profile zmian stężenia hormonu charakteryzowały się prawie całkowitym brakiem stabilizacji wydzielenia. Dodatkowo u wielu pacjentek z tego skupienia odnotowano znaczny wzrost wydzielenia kortyzolu pod koniec pobytu w szpitalu oraz nasilenie wahań jego poziomu. Należy zauważyć, że w odległości poniżej 20% odległości maksymalnej, skupienie III dzieli się na dwa mniejsze skupienia, IIIa i IIIb, grupujące odpowiednio 21 i 19 pacjentek, różniących się nieznacznie profilami zmian wydzielenia kortyzolu. Skupienie IIIa to probantki, u których początkowe stężenie hormonu nie przekroczyło 20 ng/ml, jednakże amplituda jego zmian w trakcie leczenia była duża i nie następowała stabilizacja. Skupienie IIIb obejmuje pacjentki, u których stężenie początkowe hormonu nie było wyższe niż 40 ng/ml. Również u nich nie stwierdzano stabilizacji wydzielenia kortyzolu w trakcie leczenia, a amplituda jego zmian była duża podczas całego pobytu w szpitalu, tak iż wielkości oznaczone w kolejnych dniach różniły się między sobą nawet o 30 ng/ml.

W skupieniu III znajdują się wszystkie pacjentki, które stosowały klomipraminę należącą do grupy TLPD. Dużą grupę – siedmiu pacjentek, reprezentują probantki leczone terapią skojarzoną oraz stosujące wenlafaksynę – sześć pacjentek. Do najczęściej podawanych preparatów z grupy SSRI należą sertralina, citalopram oraz escitalopram, które stosowały po trzy pacjentki.

Kolejne, IV skupienie, tworzą pacjentki, u których poziom kortyzolu nie przekroczył 40 ng/ml, jednakże w trakcie pobytu w szpitalu odnotowywano jego podwyższony poziom, a stabilizacja wydzielenia hormonu na poziomie nie przekraczającym 8 ng/ml była bardzo krótka i obejmowała kilka dni. Ponadto zaobserwowano, iż w przypadku pacjentek, u których odnotowano stabilizację wydzielenia hormonu, pod koniec pobytu w szpitalu stężenie kortyzolu znacznie podwyższało się.

W skupieniu IV znajdują się dwie pacjentki stosujące fluwoksaminę należącą do grupy SSRI, a ponadto pacjentka leczona opipramolem. Z uwagi na małą liczbę pacjentek tworzących to skupienie trudno jest wskazać jednoznacznie preparaty częściej podawane niż w innych skupieniach.

Skupienie V łączy się z pozostałymi skupieniami w odległości maksymalnej wskazując, że pacjentki w nim zgrupowane znacznie różnią się od pozostałych probantek. Skupia ono dziesięć probantek, charakteryzujących się bardzo wysokim poziomem kortyzolu w ślinie, który przekraczał 200 ng/ml. Wysokie stężenie hormonu pojawia się zarówno na początku terapii, jak i pod koniec jej trwania. Ponadto w trakcie pobytu pacjentek w szpitalu praktycznie nie obserwowano obniżenia wydzielania kortyzolu do wartości referencyjnych. Należy również zaznaczyć, że większość probantek wchodzących w skład skupienia była już leczona kilkakrotnie w szpitalu. Preparaty, które podawano tej grupie pacjentek to głównie sertralina i wenlafaksyna.



Rys. 46 Dendrogram przedstawiający sposób grupowania dziewięćdziesięciu siedmiu pacjentek

Kolejnym etapem opracowania statystycznego uzyskanych wyników było wykonanie analizy głównych składowych (PCA). Przystępując do PCA wzięto pod uwagę wszystkie 97 pacjentek uczestniczących w badaniach. Skorzystano z tej samej macierzy danych, którą przygotowano do CA. Na podstawie wyników zamieszczonych w Tabeli 32 stwierdzono, że do opisu co najmniej 50% zmienności zawartej w danych należy użyć dwie lub trzy pierwsze składowe – PC1, PC2 lub PC3. Wykres wartości własnych w postaci osypiska potwierdził, że dwie pierwsze składowe główne opisują większość zmienności analizowanych danych. Do obliczeń posłużono się algorytmem bez rotacji czynników.

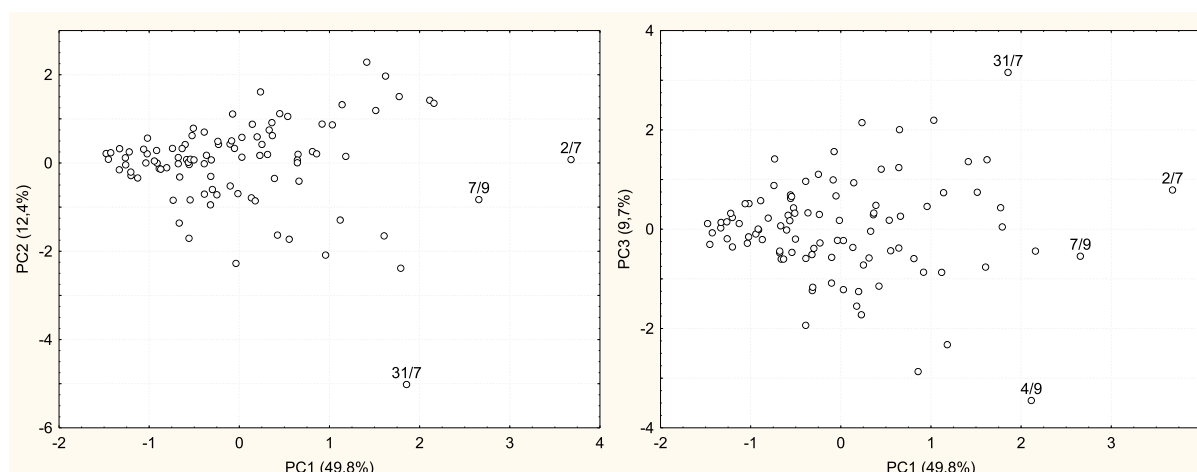
Analiza przedstawionych na Rys. 47 wykresów PC1 vs PC2 oraz PC1 vs PC3 wykazała, iż cztery pacjentki znacznie różnią się od pozostałych. W związku z tym zdecydowano się odrzucić te pacjentki. Były to pacjentki o symbolach: 4 z oddziału 9 oraz 2, 7 i 31 z oddziału 7. Probandki o symbolach 2 i 31 (oddział 7) znacznie różniły się od pozostałych pacjentek ze względu na młody wiek (29 i 31 lat); ponadto podczas całego okresu pobytu w szpitalu stężenie kortyzolu w ich ślinie było silnie podwyższone. W przypadku pacjentki 31 (oddział 7) zaobserwowano także, że stężenie hormonu oznaczone w pierwszych dniach terapii znacznie przekraczało 300 ng/ml. Podobnie kształtował się profil zmian kortyzolu w ślinie pacjentki o symbolu 2 również z oddziału 7, u której nie wykryto obniżenia poziomu hormonu poniżej 10 ng/ml, a ponadto stężenie początkowe kortyzolu przekraczało 160 ng/ml. Należy nadmienić że pacjentka o symbolu 2 (oddział 7), pomimo młodego wieku, była już kilkakrotnie hospitalizowana. U trzeciej pacjentki z oddziału 7 o symbolu 7 również nie stwierdzono stabilizacji wydzielania kortyzolu, a ponadto zaobserwowano, iż pod koniec jej pobytu w szpitalu stężenie hormonu znacznie podwyższyło się, osiągając poziom 190 ng/ml.

Analiza rozrzutu przypadków na płaszczyznę PC1 vs PC3 wykazała ponadto, iż pacjentka o symbolu 4 (oddział 9) również znacznie różni się od pozostałych pacjentek. W tym przypadku probantka przebywała bardzo długi okres w szpitalu (150 dni). W tym czasie poziom hormonu wykazywał znaczne wahania i nie stwierdzono stabilizacji jego wydzielania.

Po usunięciu z macierzy wyników czterech pacjentek, przeprowadzono ponownie obliczenia PCA, z których wynika, iż PC1 i PC2 opisują co najmniej 50% zmienności zawartych danych.

Tabela 32. Wartości własne zmiennych

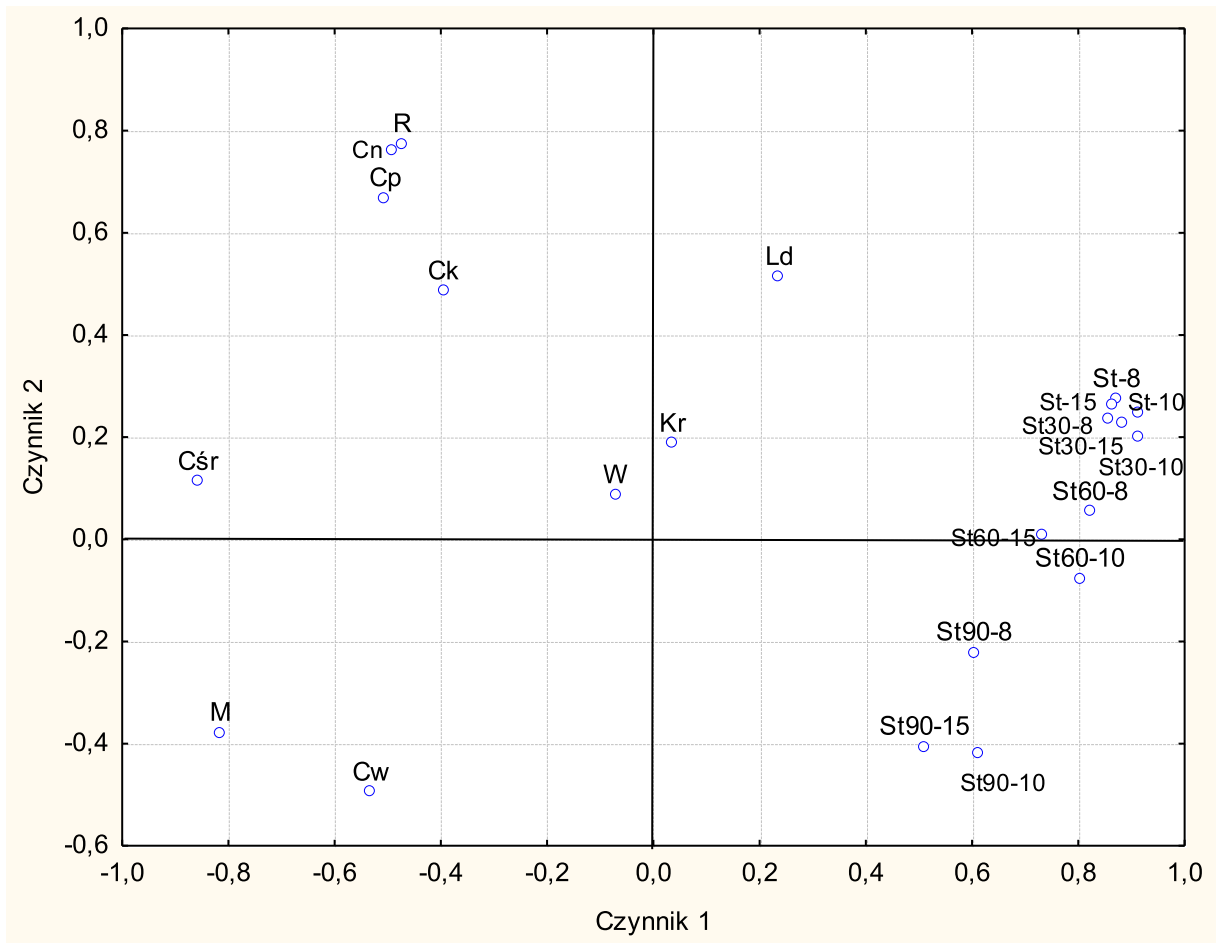
Główna składowa	Macierz obejmująca 97 pacjentek			Macierz obejmująca 93 pacjentki		
	Zmienność		Wartości własne	Zmienność		Wartości własne
	(%)	Skumulowane (%)		(%)	Skumulowane (%)	
PC1	49,8	49,8	10,96	46,2	46,2	10,17
PC2	12,4	62,2	2,73	15,1	61,3	3,32
PC3	9,7	72,0	2,15	9,1	70,4	1,99



Rys. 47 Wykres rzutu głównych składowych PC1 vs PC2 i PC1 vs PC3 na płaszczyznę

Przedstawiony na Rys. 48 wykres ładunków głównych składowych (rozzrzt zmiennych) dla 93. pacjentek wykazał, że największy wpływ na grupowanie się przypadków wzdłuż osi PC1 miał okres stabilizacji wydzielania kortyzolu na poziomie 8, 10 i 15 ng/ml po upływie 30% pobytu w szpitalu (St30-8, St30-10, St30-15) oraz podczas całego procesu leczenia (St-8, St-10, St-15). Nieznacznie mniejszy wpływ na grupowanie się przypadków wzdłuż tej samej osi miał czasookres, w którym wydzielanie kortyzolu nie przekraczało 8 lub 10 ng/ml, a próbki śliny gromadzone były po upływie 60% pobytu pacjentek w szpitalu (St60-8, St60-10). W podobny sposób lecz odwrotnie proporcjonalnie na grupowanie się pacjentek wzdłuż osi PC1 miało wpływ średnie stężenie (C_{sr}) wydzielanego hormonu oraz mediana (M). W nieco słabszy sposób na skupianie się pacjentek wzdłuż osi PC1 oddziaływało stężenie nie przekraczające 8, 10 i 15 ng/ml oznaczone w próbkach zbieranych po upływie 90% okresu leczenia (St90-8, St90-10, St90-15), a także 15 ng/ml po 60% okresie hospitalizacji (St60-15). Na podobnym poziomie na grupowanie pacjentek, lecz wzdłuż osi PC2, swój wpływ zaznaczyły również stężenie początkowe (C_p), najniższe stężenie (C_n) oraz różnica pomiędzy najwyższym i najniższym stężeniem (R). Analiza ta wykazała również, że wiek, liczba dni i

krotność pobytu pacjentki w szpitalu, a także najwyższe (Cw) oraz końcowe stężenie (Ck) nie mają istotnego wpływu na grupowanie się pacjentek.



Rys. 48 Wykres łaďunków głównych składowych

Analiza wykresu PC1 vs PC2 przedstawionego na Rys. 49 wykazała, że pacjentki tworzą cztery głównie klaster. Pacjentki stanowiące klaster w dolnym lewym rogu, tworzą wąskie pasmo wzdłuż osi PC2 i przyjmują ujemne wartości obu składowych, zarówno PC1 jak i PC2. Charakteryzują się one krótkim czasem pobytu w szpitalu, który poza jednym przypadkiem (34/7) nie przekroczył 14 dni. Ponadto podwyższone stężenie początkowe kortyzolu do około 40 ng/ml u tych pacjentek ulegało bardzo szybko obniżeniu. Grupa ta w większości przypadków pokrywa się z pacjentkami tworzącymi skupienie IV w analizie skupień.

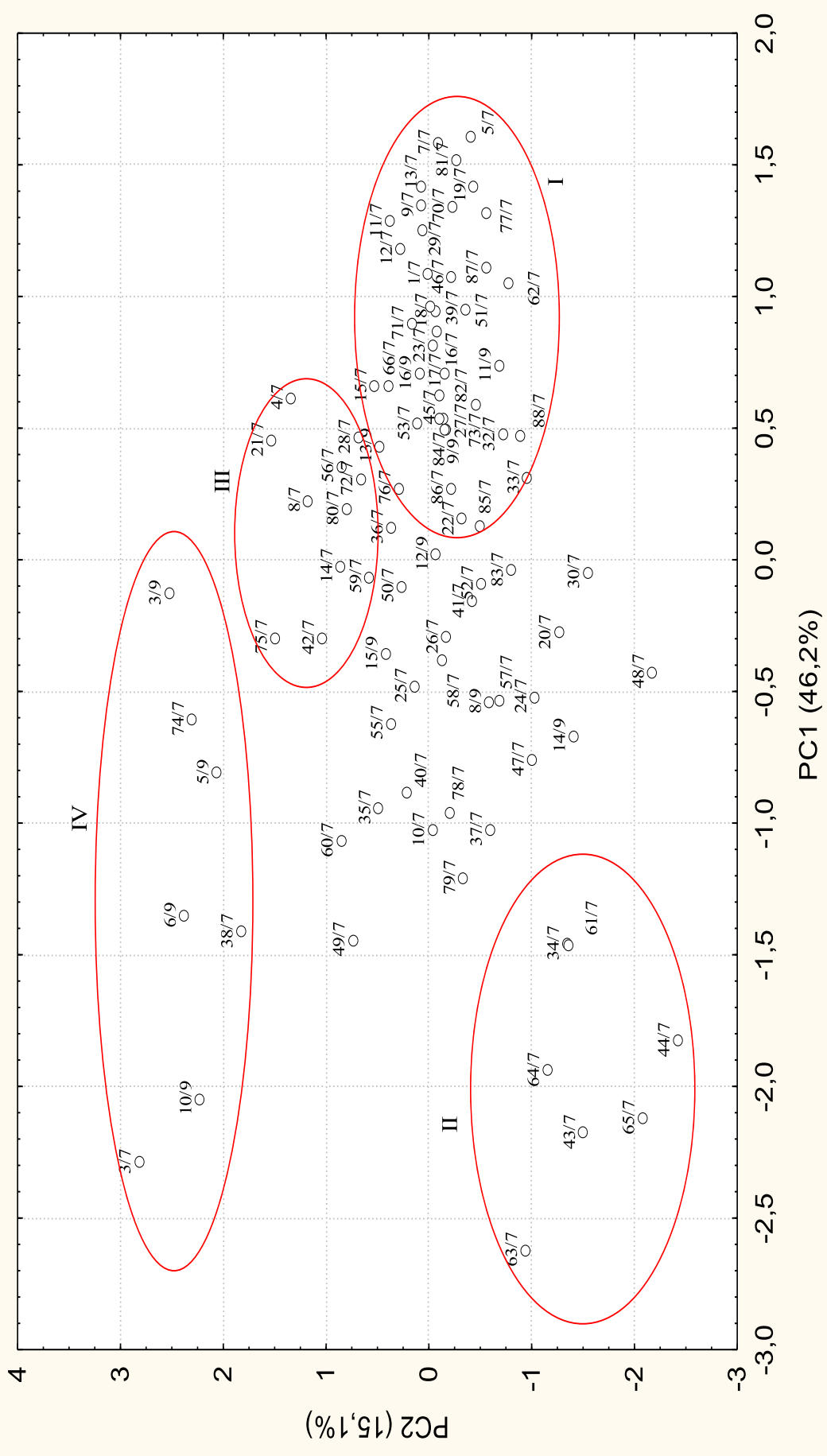
Drugie odrębne skupienie tworzą probantki, które zgrupowały się również wzdłuż osi PC2 i przyjmują najbardziej dodatnie wartości tej składowej. Należą tutaj pacjentki, które w

analizie skupień utworzyły skupienie V. Charakteryzują się one bardzo wysokim stężeniem kortyzolu podczas całego pobytu w szpitalu. U tych pacjentek nie zanotowano również stabilizacji wydzielania hormonu.

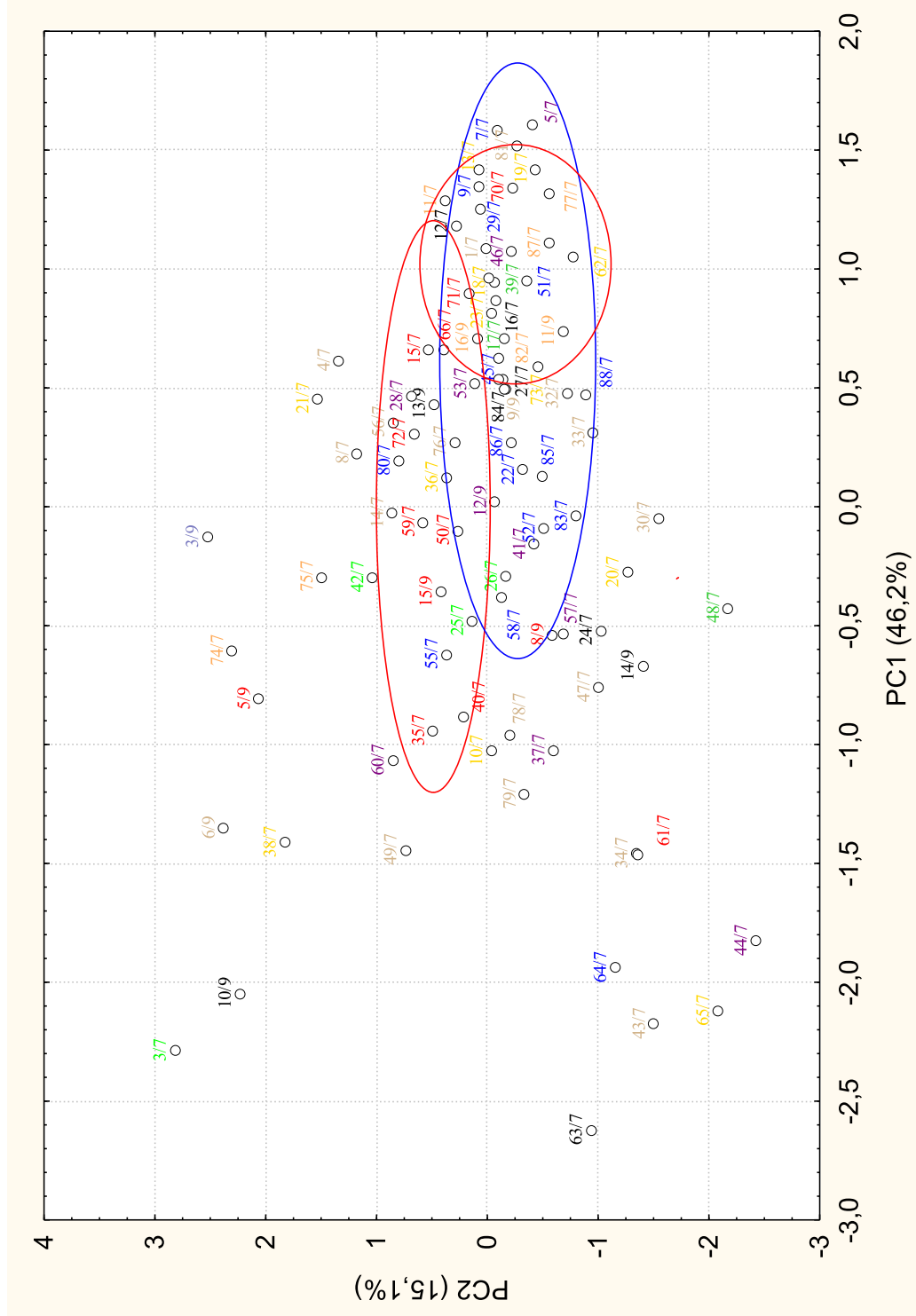
W prawej części wykresu znalazły się pacjentki tworzące wąski klaster wzdłuż osi PC2 i charakteryzujący się wartościami dodatnimi na osi PC1. Na Rys. 49 opisano je jako klaster I, skupienie to odpowiada całemu skupieniu I w analizie skupień oraz części skupienia IIIa na dendrogramie CA. W najbardziej peryferyjnej części wykresu znajdują się probantki charakteryzujące się niskim poziomem kortyzolu przez cały okres hospitalizacji.

Skupienie oznaczone na Rys. 49 jako III grupuje pacjentki, które w większości utworzyły klaster II w analizie skupień. U pacjentek tych występowało wysokie stężenie kortyzolu, a także duża amplituda wahań poziomu hormonu. Ponadto w skupieniu III znalazły się pacjentki, których okres pobytu w szpitalu był długi i większości przypadków przekraczał 40 dni. Pozostałe pacjentki nie tworzą jednolitego skupienia.

Na Rys. 50 kolorami zaznaczono poszczególne grupy leków stosowane w leczeniu depresji przez badane pacjentki. Należy zauważyć, że probantki stosujące określone preparaty tworzą skupienia wzdłuż składowej PC2. Najbardziej charakterystyczne skupienia tworzą pacjentki leczone wenlafaksyną (zaznaczono to kolorem czerwonym). Zastosowanie sertraliny, oznaczonej kolorem pomarańczowym, pokrywa się z dotychczasowymi wnioskami, iż najczęściej stosowana była u pacjentek tworzących aglomerację I w analizie skupień. Należy również zauważyć, iż pacjentki leczone terapią skojarzoną (kolor niebieski) również tworzą odrębne skupienie, zlokalizowane wzdłuż osi PC2.



Rys. 49 Wykres rzutu głównych składowych PC1 vs PC2 dla dziewięćdziesięciu trzech przypadków



Rys. 50 Wykres rzutu głównych składowych PC1 vs PC2 dla dziewięćdziesięciu trzech przypadków

5.2. Podsumowanie badań

Podsumowując wyniki przeprowadzonych badań należy stwierdzić, że opracowana metoda analityczna wykorzystująca ślinę jako materiał diagnostyczny do oznaczania poziomu kortyzolu, pozwala na szybkie i nieinwazyjne określenie stężenia analitu. Ponadto wybrany materiał do badań jest łatwy do gromadzenia, a jego pobranie nie niesie ze sobą zagrożenia infekcją, jak również nie jest kłopotliwe przy codziennym gromadzeniu próbek, dodatkowo jego pobór nie jest też krępujący dla probantki. Jest to szczególnie istotne w przypadku oznaczania poziomu kortyzolu u osób z depresją, która charakteryzuje się znacznym obniżeniem nastroju i związaną z tym apatią. Ilość pobieranej śliny była niewielka i wynosiła 1 ml. Taka objętość materiału do badań dała satysfakcjonujące wyniki podczas oznaczania ilościowego hormonu, co ustalono wcześniej wykonaną analizą wstępną.

W trakcie opracowywania procedury analitycznej stwierdzono, iż metoda ekstrakcji typu LLE charakteryzowała się lepszymi wynikami, w jej toku nie dochodzi do znacznych strat analitu, dlatego też zastosowano ją do analizy próbek pochodzących od probantek chorych na depresję. Do analizy ilościowej kortyzolu użyto chromatografii HPLC z detekcją UV, którą prowadzono przy długości fali 240 nm. Zastosowanie tej techniki pozwoliło na uniknięcie reakcji krzyżowej, która często występuje w trakcie oznaczania ilościowego steroidów przy pomocy metod immunologicznych powodując zawyżenie wyników. Ponadto w toku badań stwierdzono, iż sposób przechowywania materiału diagnostycznego nie powoduje strat analitu w próbkach śliny.

Opracowana metoda analityczna jest selektywna i liniowa w badanym zakresie stężeń. Charakteryzuje się również dobrą precyzją i dokładnością, co pozwala na oznaczenie niewielkich ilości kortyzolu w analizowanym materiale biologicznym.

Przeprowadzone badania pozwoliły na obserwację zmian poziomu kortyzolu w trakcie terapii różnymi lekami przeciwdepresyjnymi, podczas której stwierdzono, że szybkość zmian poziomu hormonu oraz trwałość tych zmian determinuje czas pobytu pacjentki w szpitalu. W przypadku dobrej reakcji organizmu na zastosowaną terapię, niezależnie od podanego leku przeciwdepresyjnego, obniżenie poziomu kortyzolu następowało szybko, a czas pobytu w szpitalu ograniczał się do około 20 dni.

Ponadto w przypadku pacjentek, których okres hospitalizacji był dłuższy, niezwykle istotnym okazał się być kolejny dzień terapii, w którym pobierano próbki do analizy.

Przeprowadzone badania wykazały, iż w większości zastosowanych monoterapii (TLPD, SSRI, SNRI), po 30. dniu trwania monoterapii następował wtórny wzrost wydzielania kortyzolu. Jednakże poziom hormonu był zawsze niższy od stężenia początkowego i w przeciągu kilku następnych dni obniżał się do wartości referencyjnych. Nie obserwowano natomiast takiego skoku stężenia kortyzolu w przypadku zastosowania politerapii łączącej wspomniane wyżej grupy leków.

W toku analizy danych stwierdzono, że amplituda wahań poziomu kortyzolu znacząco wpływała na czas hospitalizacji pacjentek. W przypadku, gdy była ona niewielka i poziom hormonu nieznacznie przekraczał wartości referencyjne, okres leczenia był krótszy. Podobna sytuacja występowała u probantek, u których stężenie kortyzolu nie obniżyło się do wartości referencyjnych, ale nieznacznie je przekroczyło, jednak niewielka amplituda tych zmian spowodowała skrócenie czasu hospitalizacji, co świadczy o tym, iż podczas farmakoterapii następuje normalizacja aktywności osi HPA, a wydzielanie hormonu ustala się na określonym, charakterystycznym dla danej pacjentki poziomie.

Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej badania dowiodły również, że okres pobytu pacjentki w szpitalu nie zależy od początkowego poziomu kortyzolu, natomiast jest ściśle uzależniony od szybkości stabilizacji wydzielania hormonu na poziomie charakterystycznym dla danej pacjentki. Zarówno probantki u których początkowe stężenie hormonu przekroczyło 100 ng/ml, jak również pacjentki, u których poziom ten nie przekroczył 40 ng/ml, kończyły pobyt w szpitalu w przeciągu 50 dni, jeżeli zmiany poziomu kortyzolu w trakcie trwania terapii nie były znaczące.

Nie stwierdzono, aby krotkość pobytu w szpitalu wpływała na okres hospitalizacji. Zaobserwowano natomiast, iż w przypadku pacjentek wielokrotnie leczonych, amplituda zmian poziomu kortyzolu była najczęściej większa niż miało to miejsce u probantek hospitalizowanych po raz pierwszy lub drugi. Było to szczególnie widoczne u pacjentek, których okres pobytu w szpitalu przekroczył 50 dni.

Przeprowadzone badania potwierdziły, iż stosowane w niektórych przypadkach depresji neuroleptyki wykazują podobny wpływ na wydzielanie kortyzolu, jak leki przeciwdepresyjne. Również czas trwania terapii był podobny do okresu hospitalizacji pacjentek leczonych tymoleptykami.

Na podstawie analizy statystycznej uzyskanych danych wykonanej z użyciem CA zaobserwowano, iż badane pacjentki tworzą charakterystyczne grupy, a głównymi czynnikami decydującymi o przynależności pacjentki do danego skupienia są amplituda

zmian poziomu kortyzolu i czasookres stabilizacji wydzielania hormonu na poziomie wartości referencyjnych.

PCA wykazała natomiast, iż na grupowanie się pacjentek, oprócz amplitudy zmian stężenia kortyzolu ma również wpływ okres pobytu w szpitalu oraz czas w jakim następowało obniżenie poziomu hormonu.

Obie techniki chemometryczne pozwoliły na stwierdzenie, które z zastosowanych leków pozwalają na skuteczne obniżenie poziomu kortyzolu w trakcie terapii (sertralina, amitryptylina oraz terapia skojarzona).

6. Wnioski

W pracy przedstawiono wyniki badań związanych z opracowaniem warunków ekstrakcji i rozdziału chromatograficznego, umożliwiających analizę ilościową kortyzolu w materiale biologicznym pochodzącym od pacjentów Szpitala dla Nerwowo i Psychicznie Chorych w Starogardzie Gdańskim. Próbkę śliny pobierano o stałej porze, około godziny 10, w trakcie całego pobytu pacjentek w szpitalu. Materiał do badań gromadzono i analizowano w latach 2008-2010. W toku przeprowadzonych badań analizowano 2653. próbki śliny pochodzące od 97. pacjentek. Opracowana metoda analityczna oraz uzyskane wyniki pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Zastosowanie śliny jako materiału diagnostycznego do monitorowania stężenia kortyzolu pozwala na szybkie i nieinwazyjne gromadzenie próbek do badań, nie stwarza zagrożenia infekcją oraz umożliwia samodzielny pobór próbek przez probantkę. Niewielka ilość śliny potrzebna do wykonania analizy (1 ml) pozwala na uczestnictwo w badaniach również pacjentkom, u których zastosowane leki powodują wystąpienie suchości w jamie ustnej.
2. Opracowana metoda analityczna wykorzystująca ekstrakcję typu LLE oraz HPLC z detekcją UV umożliwia wykrycie, identyfikację i ilościowe oznaczenie kortyzolu w ślinie na niskim poziomie wykrywalności (2,54 ng/ml) i oznaczalności (5,67 ng/ml). Ponadto opracowana procedura charakteryzuje się dobrą precyzją (dla powtarzalności w przedziale od 1,12 do 9,94% i odtwarzalności w zakresie od 1,60 do 6,79%) oraz dokładnością (dla powtarzalności w zakresie od 95,60 do 105,00% i odtwarzalności w przedziale od 93,00 do 102,32%).
3. Analiza próbek śliny pacjentek wykazała zależność pomiędzy szybkością obniżania się poziomu kortyzolu a czasem pobytu pacjentek w szpitalu. Stwierdzono, iż w przypadku szybkiej i trwałej stabilizacji wydzielania hormonu, czas hospitalizacji probantek nie przekraczał 20 dni.
4. U pacjentek hospitalizowanych ponad 30 dni, u których zastosowano terapię preparatami wykazującymi wpływ na wychwyty zwrotny serotoniny (leki z grup: TLPD, SSRI, SNRI), po 30. dniu terapii obserwowano wtórny, jedno lub kilkudniowy wzrost wydzielania kortyzolu. Poziom hormonu był jednak niższy niż jego stężenie oznaczone w pierwszych dniach terapii. W przypadku probantek leczonych preparatami z grupy SSRI, a w szczególności citalopramem stwierdzono, że poziom

hormonu był wyższy niż ten oznaczony bezpośrednio przed wtórnym podwyższeniem, co ma związek z modyfikacją przez ten lek receptorów 5HT.

5. Przeprowadzone badania wykazały, że kolejnym czynnikiem determinującym czas pobytu pacjentek w szpitalu jest amplituda zmian poziomu kortyzolu, niezależnie od zastosowanej terapii jak również początkowego stężenia hormonu. W przypadku, gdy wydzielanie kortyzolu ulegało silnym wahaniom, tak iż różnice stężeń oznaczanych w kolejnych dniach wynosiły powyżej 10 ng/ml, pobyt pacjentek najczęściej przekraczał 50 dni. Było to niezależne od poziomu hormonu oznaczonego w pierwszych dniach terapii.
6. U niektórych pacjentek nie obserwowano obniżenia wydzielania kortyzolu do wartości referencyjnych, natomiast stwierdzono zmniejszenie amplitudy wahań stężenia hormonu do poziomu charakterystycznego dla danej pacjentki.
7. W przypadku zastosowania terapii skojarzonej nie zaobserwowano wtórnego wzrostu wydzielania kortyzolu po 30. dniach hospitalizacji, a ponadto w przypadku kojarzenia preparatów z grupy SSRI z trazodonem wykryto, iż poziom hormonu ulega stabilizacji i nie podwyższa się do końca trwania pobytu pacjentki w szpitalu.
8. Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowane w leczeniu depresji leki przeciwpsychotyczne wykazują podobny wpływ na wydzielanie kortyzolu jak leki przeciwdepresyjne, powodując obniżenie jego wydzielania. Było to szczególnie widoczne w przypadku preparatów należących do neuroleptyków II generacji (olanzapina, zyprazydon).
9. Analiza skupień wykazała, że pacjentki można zróżnicować na podstawie stopnia stabilizacji wydzielania kortyzolu oznaczonego w całym czasookresie pobytu pacjentki w szpitalu oraz po upływie 30% okresu hospitalizacji.
10. Na podstawie analizy głównych składowych stwierdzono, że amplituda stężeń kortyzolu i profil przebiegu jego zmian są szczególnie charakterystyczne dla pacjentek przyjmujących sertralinę, wenlafaksynę oraz leczonych terapią skojarzoną i dzięki temu różnią się od pozostałych probantek.

7. Bibliografia

1. Chrousos GP. Adrenocorticosteroids & adrenocortical antagonists. W: Katzung BG. (Ed.) *Basic and clinical pharmacology*. Mc Graw, Hill, Boston, 2007.
2. Semple RK, Bolander Jr FF. Biochemical endocrinology. W: Dominiczak MH, Baynes JW. (Eds.) *Medical biochemistry. 3rd ed.* Mosby Elsevier, Filadelfia, 2009.
3. Budziszewska B, Lason W. *Neuroendokrynne mechanizmy dzialania lekow przeciwdepresyjnych*. Triangulum M.B.P., Wrocław, 2003.
4. Rybakowski J, Puzyński St, Wciórka J. *Psychiatria. Tom I, Podstawy psychiatrii*. Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2010.
5. Okugawa G, Omori K, Suzukawa J, Fujiseki Y, Kinoshita T, Inagaki C. Long-term treatment with antidepressants increases glucocorticoid receptor binding and gene expression in cultured rat hippocampal neurones. *Neuroendocrinology* 1999, 11, 887-895.
6. Rota E, Broda R, Cangemi L, Migliaretti G, Paccotti P, Rosso C, Torre E, Zeppegno P, Portaleone P. Neuroendocrine (HPA axis) and clinical correlates during fluvoxamine and amitriptyline treatment. *Psychiatry Res* 2005, 133, 281-284.
7. Weber-Hamann B, Kratzsch J, Kopf D, Lederbogen F, Gilles M, Heuser I, Deuschle M. Resistin and adiponectin in major depression: the association with free cortisol and effects of antidepressant treatment. *J Psychiatr Res* 2007, 41, 344-350.
8. Aihara M, Ida I, Yuuki N, Oshima A, Kumano H, Takahashi K, Fukuda M, Oriuchi N, Endo K, Matsuda H, Mikuni M. HPA axis dysfunction in unmedicated major depressive disorder and its normalization by pharmacotherapy correlates with alteration of neural activity in prefrontal cortex and limbic/paralimbic regions. *Psychiatry Res* 2007, 155, 245-256.
9. Kunzel H, Ackl N, Hatzinger M, Held K, Holsboer-Trachsler E, Ising M, Kaschka W, Kasper S, Konstantinidis A, Sonntag A, Uhr M, Yassouridis A, Holsboer F, Steiger A. Outcome in delusional depression comparing trimipramine monotherapy with a combination of amitriptyline and haloperidol - A double-blind multicenter trial. *J Psychiatr Res* 2009, 43, 702-710.
10. Sargent PA, Quedstedt DJ, Cowen PJ. Clomipramine enhances the cortisol response to 5-HTP: implications for the therapeutic role of 5-HT₂ receptors. *Psychopharmacology* 1998, 140, 120-122.
11. Markianos M, Hatzimanolis J, Lykouras L. Serotonergic and dopaminergic neuroendocrine responses of male depressive patients before and after a therapeutic ETC course. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2002, 252, 172-176.
12. Porter RJ, Mulder RT, Joyce PR. Baseline prolactin and L-tryptophan availability predict response to antidepressant treatment in major depression. *Psychopharmacology* 2003, 165, 216-221.
13. Kundermann B, Strate P, Hemmeter-Spernal J, Huber MT, Krieg J-Ch, Lautenbacher S. Mid-term effects of serial sleep deprivation therapy implemented in cognitive-behavioral treatment on the neuroendocrine response to clomipramine in patients with major depression. *J Psychiatr Res* 2009, 43, 711-720.
14. Attenburrow M-J, Mitter PR, Whale R, Terao T, Cowen PJ. Low-dose citalopram as a 5-HT neuroendocrine probe. *Psychopharmacology* 2001, 155, 323-326.
15. Harmer CJ, Bhagwagar Z, Shelley N, Cowen PJ. Contrasting effects of citalopram and reboxetine on waking salivary cortisol. *Psychopharmacology* 2003, 167, 112-114.

16. Mondelli V, Gianotti L, Picu A, Daga GA, Giordano R, Berardelli R, Pariante CM, Fassino S, Ghigo E, Arvat E. Neuroendocrine effects of citalopram infusion in anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* 2006, 31, 1139-1148.
17. Tucker P, Ruwe WD, Masters B, Parker DE, Hossain A, Trautman RP, Wyatt DB. Neuroimmune and cortisol changes in selective serotonin reuptake inhibitor and placebo treatment of chronic posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 2004, 56, 121-128.
18. Nikisch G, Mathe AA, Czernik A, Thiele J, Bohner J, Eap CB, Agren H, Baumann P. Long-term citalopram administration reduces responsiveness of HPA axis in patients with major depression: relationship with S-citalopram concentrations in plasma and cerebrospinal fluid (CSF) and clinical response. *Psychopharmacology* 2005, 181, 751-760.
19. Navines R, Martin-Santos R, Gomez-Gil E, Martinez de Osaba MJ, Imaz ML, Gasto C. Effects of citalopram treatment on hypothermic and hormonal responses to the 5-HT_{1A} receptor agonist buspirone in patients with major depression and therapeutic response. *Psychoneuroendocrinology* 2007, 32, 411-416.
20. Papakostas GI, Chuzi SE, Sousa JL, Fava M. 5-HT_{1A}-mediated stimulation of cortisol release in major depression: use of non-invasive cortisol measurements to predict clinical response. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2010, 260, 175-180.
21. Strachan AT, Leiper JB, Maughan RJ. Paroxetine administration to influence human exercise capacity, perceived effort or hormone responses during prolonged exercise in a warm environment. *Exp Physiol* 2004, 89, 657-664.
22. Daffner-Bugia C, Laakmann G, Voderholzer U, Haag C, Baghai T, Kolmsee S, Schroder U, Munz T. The neuroendocrine effects of venlafaxine in healthy subjects. *Hum Psychopharmacol* 1996, 11, 1-9.
23. Hallam KT, Begg DP, Olver JS, Norman TR. An investigation of the effect of immediate and extended release venlafaxine on nocturnal melatonin and cortisol release in healthy adult volunteers. *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 2008, 23, 129-137.
24. Araya AV, Rojas P, Fritsch R, Rojas R, Herrera L, Rojas G, Gatica H, Silva H, Fiedler JL. Early response to venlafaxine antidepressant correlates with lower ACTH levels prior to pharmacological treatment. *Endocrine* 2006, 30, 289-297.
25. Romer B, Lewicka S, Kopf D, Lederbogen F, Hamann B, Gilles M, Schilling C, Onken V, Frankhauser P, Deuschle M. Cortisol metabolism in depressed patients and healthy controls. *Neuroendocrinology* 2009, 90, 301-306.
26. Horodnicki JM, Warnecka-Przybylska M, Błońska J, Kobiernicka Z, Drecgler M. Ocena działań ubocznych i powikłań podczas leczenia psychoz afektywnych tymoleptykami. *Psychiatr Pol* 1991, 25, 62-69.
27. Ostroumova MN, Nuller IuL, Kosinskii VP. The effect of neurotropic preparations on the sensitivity of the hypothalamo-hypophyseal system to the inhibiting action of dexamethasone. *Probl Endokrinol* 1990, 36, 37-40.
28. Fritze J, Lanczik M, Sofic E, Struck M, Riederer P. Cholinergic neurotransmission seems not to be involved in depression but possibly in personality. *J Psychiatr Neurosci* 1995, 20, 39-48.
29. Tanum L, Bratveit-Johansen K, Malt UF. Fenfluramine challenge test predicts outcome in pharmacological treatment of patients with functional gastrointestinal disorder. *J Psychosom Res* 1999, 47, 525-535.

30. Schule C, Baghai TC, Eser D, Zwanzger P, Jordan M, Buechs R, Rupprecht R. Time course of hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity during treatment with reboxetine and mirtazapine in depressed patients. *Psychopharmacology* 2006, 186, 601-611.
31. Horstmann S, Dose T, Lucae S, Kloiber S, Menke A, Hennings J, Spieler D, Uhr M, Holsboer F, Ising M. Suppressive effect of mirtazapine on HPA system in acutely depressed women seems to be transient and not related to antidepressant action. *Psychoneuroendocrinology* 2009, 34, 238-248.
32. Schule C, Baghai TC, Eser D, Schwarz M, Bondy B, Rupprecht R. Effects of mirtazapine on dehydroepiandrosterone-sulfate and cortisol plasma concentrations in depressed patients. *J Psychiatr Res* 2009, 43, 538-545.
33. Scharnholtz B, Weber-Hamann B, Lederbogen F, Schilling C, Gilles M, Onken V, Frankhauser P, Kopf D, Deuschle M. Antidepressant treatment with mirtazapine, but not venlafaxine, lowers cortisol concentrations in saliva: A randomised open trial. *Psychiatry Res* 2010, 177, 109-113.
34. Muck-Seler D, Pivac N, Sagud M, Jakovljević M, Mihaljević-Peles A. The effects of paroxetine and tianeptine on peripheral biochemical markers in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002, 26, 1235-1243.
35. Jezova D, Duncko R. Enhancement of stress-induced pituitary release and cardiovascular activity by antidepressant treatment in healthy men. *J Psychopharmacol* 2002, 16, 235-240.
36. Kochetkov IaA, Bel'tikova KV, Gorobets LN. Anabolic-catabolic balance in depression: an effect of coxalil. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* 2006, 106, 47-51.
37. Lydyard PM, Whelan A, Fanger MW. Testy immunologiczne. W: *Immunologia, krótkie wykłady*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2001.
38. Hucklebridge F, Hussain T, Evans P, Clow A. The diurnal patterns of the adrenal steroids cortisol and dehydroepiandrosterone (DHEA) in relation to awakening. *Psychoneuroendocrinology* 2005, 30, 51-57.
39. Masharani U, Shiboski S, Eisner MD, Katz PP, Janson SL, Granger DA, Blanc PD. Impact of exogenous glucocorticoid use on salivary cortisol measurements among adults with asthma and rhinitis. *Psychoneuroendocrinology* 2005, 30, 744-752.
40. Groschl M, Rauh M, Dorr H-G. Circadian rhythm of salivary cortisol, 17 β -hydroxyprogesterone, and progesterone in healthy children. *Clin Chem* 2003, 49, 1688-1691.
41. Ouellet-Morin I, Dionne G, Perusse D, Lupien SJ, Arseneault L, Barr RG, Tremblay RE, Boivin M. Daytime cortisol secretion in 6-month-old twins: genetic and environmental contributions as a function of early familial adversity. *Biol Psychiatry* 2009, 65, 409-416.
42. Bandelow B, Wedekind D, Pauls J, Broocks A, Hajak G, Ruther E. Salivary cortisol in panic attacks. *Am J Psychiatry* 2000, 157, 443-456.
43. Elzinga BM, Schmahl CG, Vermetten E, van Dyck R, Bremner JD. Higher cortisol levels following exposure to traumatic reminders in abuse-related PTSD. *Neuropsychopharmacology* 2003, 28, 1656-1665.
44. Okumura T, Nakajima Y, Takamatsu T, Matsuoka M. Column-switching high-performance liquid chromatographic system with a laser-induced fluorimetric detector for direct, automated assay of salivary cortisol. *J Chromatogr B* 1995, 670, 11-20.

45. Kataoka H, Matsuura E, Mitani K. Determination of cortisol in human saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2007, 44, 160-165.
46. Jönsson BAG, Malmberg B, Amilon A, Garde AH, Orbaek P. Determination of cortisol in human saliva using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2003, 784, 63-68.
47. Tanaka Y, Naruishi N, Nakayama Y, Higashi T, Wakida S. Development of analytical method using microchip capillary electrophoresis for the measurement of fluorescein-label salivary components in response to exercise stress. *J Chromatogr A* 2006, 1109, 132-137.
48. Putignano P, Dubini A, Toja P, Invitti C, Bonfanti S, Redaelli G, Zappulli D, Cavagnini F. Salivary cortisol measurement in normal – weight, obese and anorexic women: comparison with plasma cortisol. *Eur J Endocrinol* 2001, 145, 165-171.
49. Baghai TC, Schule C, Zwanzger P, Minov C, Holme C, Padberg F, Bidlingmaier M, Strasburger CJ, Rupprecht R. Evaluation of a salivary based combined dexamethasone/CRH test in patients with major depression. *Psychoneuroendocrinology* 2002, 27, 385-399.
50. Bhagwagar Z, Hafizi S, Cowen PJ. Acute citalopram administration produces correlated increases in plasma and salivary cortisol. *Psychopharmacology* 2002, 163, 118-120.
51. Nadeem HS, Attenburrow M-J, Cowen PJ. Comparison of the effects of citalopram and escitalopram on 5-HT-mediated neuroendocrine responses. *Neuropsychopharmacology* 2004, 29, 1699-1703.
52. Gozansky WS, Lynn JS, Laudenslagert ML, Kohrt WM. Salivary cortisol determined by enzyme immunoassay is preferable to serum total cortisol for assessment of dynamic hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Clin Endocrinol* 2005, 63, 336-341.
53. Marcus-Perlman Y, Tordjman K, Greenman Y, Limor R, Shenkerman G, Osher E, Stern N. Low-dose ACTH (1 µg) salivary test: a potential alternative to the classical blood test. *Clin Endocrinol* 2006, 64, 215-218.
54. Ahn R-S, Lee Y-j, Choi J-Y, Kwon H-B, Chun S-i. Salivary cortisol and DHEA levels in the Korean population: age-related differences, diurnal rhythm, and correlations with serum levels. *Yonsei Med J* 2007, 48, 379-388.
55. Restituto P, Galofre JC, Gil MJ, Mugueta C, Santos S, Monreal JI, Varo N. Advantage of salivary cortisol measurements in the diagnosis of glucocorticoid related disorders. *Clin Biochem* 2008, 41, 688-692.
56. Poll E-M, Kreitschmann-Andermahr I, Langejuergen Y, Stanzel S, Gilsbach JM, Gressner A, Yagmur E. Saliva collection method affects predictability of serum cortisol. *Clin Chim Acta* 2007, 382, 15-19.
57. Kartsova LA, Bessonova EA. Determination of steroids in biological samples by micellar electrokinetic chromatography. *Anal Chem* 2007, 62, 68-75.
58. Yaneva M, Mosnier-Pudar H, Dugue M-A, Grabar S, Fulla Y, Bertagna X. Midnight salivary cortisol for the initial diagnosis of Cushing's Syndrome of various causes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89, 3345-3351.
59. van Crujisen N, Dullaart RPF, Wit HP, Albers FWJ. Analysis of cortisol and other stress-related hormones in patients with Ménière's disease. *Otol Neurotol* 2005, 26, 1214-1219.
60. Viardot A, Huber P, Puder JJ, Zulewski H, Keller U, Muller B. Reproducibility of nighttime salivary cortisol and its use in the diagnosis of hypercortisolism compared with urinary free

- cortisol and overnight dexamethasone suppression test. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90, 5730-5736.
61. Putignano P, Toja P, Dubini A, Giraldi FP, Corsello SM, Cavagnini F. Midnight salivary cortisol versus urinary free and midnight serum cortisol as screening tests for Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88, 4153-4157.
 62. Pużyński S. Psychiatria - postępy 2006, 50 lat stosowania leków przeciwdepresyjnych. *Terapia* 2007, 4, 71-81.
 63. Kostowski W. Współczesne kierunki badań nad patomechanizmem stresu i depresji i ich znaczenie w kształtowaniu poglądów na działanie leków przeciwdepresyjnych. *Psychiatria* 2004, 1, 63-71.
 64. Stahl SM. Kanały jonowe i enzymy jako miejsce działania leków psychofarmakologicznych. W Stahl SM. (Ed.) *Podstawy psychofarmakologii, Teoria i praktyka, Tom 1*. Via Medica, Gdańsk, 2009.
 65. Shubuladè S. Psychiatria i kobieta. W: Wright P, Stern J, Phelan M. (Eds), *Sedno Psychiatria Tom 2*. Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2008.
 66. Wade SE, Haegele AD. Differential measurement of cortisol and cortisone in human saliva by HPLC UV detection. *J Liq Chromatogr* 1991, 9, 1813-1827.
 67. Saito Z, Takeda R. Analysis of synthetic corticoids by high performance liquid chromatography. *Nippon Rinsho* 1994, 3, 653-659.
 68. Landowski J. Zaburzenia depresyjne a mechanizmy stresu. *Psychiatria w Praktyce Ogólnolekarskiej* 2002, 2, 9-13.
 69. Rajewska-Rager A, Rybakowski J. Rola stresujących wydarzeń życiowych w patogenezie depresji. *Neuropsychiatria i Neuropsychologia* 2008, 3, 147-152.
 70. Szubert S, Florkowski A, Bobińska K. Wpływ stresu na zmiany plastyczności mózgu i rozwój wybranych zaburzeń psychicznych. *Pol Merk Lek* 2008, 24, 162-165.
 71. Rymaszewska J. Konsultacje psychiatryczne w endokrynologii. *Psychiatria w Praktyce Ogólnolekarskiej* 2007, 7, 60-65.
 72. Ryś A, Miodek A, Szemraj P, Szemraj J, Kocur J. Immunologiczne i endokrynologiczne aspekty patogenezy depresji. *Post Psychiatr Neurol* 2007, 16, 335-337.
 73. Cabała WJ, Landowski J. Układ serotonergiczny i oś limbiczno-podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowa (LPPN) w depresji. *Psychiatr Pol* 2006, 40, 415-430.
 74. Landowski J. Depresja jako stres przewlekły. *Dyskusje o Depresji* 2001, 17, 2-6.
 75. Twardowski K, Rybakowski J. Oś limbiczno-podwzgórzowo-przysadkowo- nadnerczowa w depresji. *Psychiatr Pol* 1996, 30, 741-756.
 76. Landowski J. Zespoły depresyjne - przewlekła aktywacja układu stresu. W: Dudek D, Zięba A. (Eds) *Depresja w chorobie niedokrwiennej serca*. Biblioteka Psychiatrii Polskiej, Kraków, 2001, 25-35.
 77. Dudek D. Leczenie epizodu depresyjnego. *Farmakoterapia w Psychiatrii i Neurologii* 2007, 1, 11-15.
 78. Święcicki Ł. Strategia postępowania terapeutycznego w depresji. *Psychiatria w Praktyce Ogólnolekarskiej* 2006, 4, 171-175.
 79. Meltzer HY. Serotonergic function in the affective disorders: The effect of antidepressants and lithium on the 5 - hydroxytryptophan - induced increase in serum cortisol. *Ann N Y Acad Sci* 1984, 430, 115-137.
 80. Humble M. Noradrenaline and serotonin reuptake inhibition as clinical principles: a review of antidepressant efficacy. *Acta Psychiatr Scand* 2000, 101, 28-36.

81. Schüle C. Neuroendocrinological mechanisms of actions of antidepressants drugs. *J Neuroendocrinol* 2006, 19, 213-226.
82. Deuschle M, Schmider J, Bettina H, Standhardt H, Korner A, Lammers C-H, Schweiger U, Hartmann A, Heuser I. Pulse-dosing and conventional application of doxepin: effects on psychopathology and hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) system. *J Clin Psychopharmacol* 1997, 17, 156-160.
83. Wilkowska A. Epizody depresyjne u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca. *Psychiatria w Praktyce Klinicznej* 2008, 1, 12-21.
84. Dobrzyńska E, Pawłowski T, Kiejna A. Współwystępowanie objawów lękowych i depresyjnych z chorobą niedokrwienną serca. *Adv Clin Exp Med*. 2005, 14, 1071-1076.
85. Jaracz J. Zasady stosowania leków psychotropowych w neurologii. www.lekseek.com/PDF/psychotropy.pdf.
86. de Walden-Gałuszko K. Ból a depresja - w teorii i w praktyce. *Psychoonkologia* 2003, 7, 25-29.
87. Łojko D, Suwalska A, Rybakowski J. Zaburzenia lękowe u osoby z chorobą Charcot-Marie-Tooth skutecznie leczone citalopramem. *Postępy Psychiatrii i Neurologii* 2005, 14, 45-46.
88. Jakuszkowiak K, Cabała WJ. Psychodermatologia w codziennej praktyce lekarskiej. *Psychiatria w Praktyce Ogólnolekarskiej* 2004, 4, 107-111.
89. Landowski J, Rudnik E. Depresja z objawami atypowymi. *Psychiatria* 2005, 2, 154-160.
90. Sobów T. SSRI i SNRI w farmakoterapii depresji u osób w wieku podeszłym: przegląd piśmiennictwa i metaanaliza danych z randomizowanych badań klinicznych. *Postępy Psychiatrii i Neurologii* 2007, 16, 281-290.
91. Marcinek P, Peda A. Leczenie sprawców przestępstw seksualnych - kompleksowy program terapii. *Psychoterapia* 2010, 3 (154), 49-57.
92. Yang T-T, Hsiao F-H, Wang K-C, Ng S-M, Ho RTH, Chan CLW, Lai Y-M, Chen Y-T. The effect of psychotherapy added to pharmacotherapy on cortisol responses in outpatients with major depressive disorder. *J Nerv Ment Dis* 2009, 197, 401-406.
93. Jaracz J. Farmakologiczna profilaktyka depresji okresowo nawracającej. *Farmakoterapia w Psychiatrii i Neurologii* 2007, 1, 31-33.
94. Jęczkowski K, Rabe-Jabłońska J. Skuteczność leków przeciwdepresyjnych w leczeniu bólu przewlekłego. *Psychiatria w Praktyce Ogólnolekarskiej* 2005, 3, 129-135.
95. Jaracz J, Rybakowski J. Depresja a ból: nowe dane kliniczne, neurobiologiczne i psychofarmakologiczne. *Psychiatr Pol* 2005, 39, 937-950.
96. Parnowski T. Farmakoterapia depresji wieku podeszłego. *Farmakoterapia w Psychiatrii i Neurologii* 2007, 1, 17-22.
97. de Walden-Gałuszko K. Zespół depresyjny u chorych w stanie terminalnym. *Polska Medycyna Paliatywna* 2003, 2, 87-91.
98. Sobańska A, Wichniak A, Wierzbicka A, Szatkowska E, Czasak K, Musińska I, Jernajczyk W. Mianseryna w leczeniu bezsenności pierwotnej. *Sen* 2006, 6, 58-63.
99. Baranowski P, Pawłowski T, Budrewicz S. Farmakoterapia epizodu depresyjnego u pacjenta z chorobą Parkinsona. *Postępy w Psychiatrii i Neurologii* 2005, 14, 15-17.
100. Landowski J, Cabała WJ. Trazodon - charakterystyka kliniczna i farmakologiczna. *Psychiatria* 2005, 2, 135-144.
101. Łoza B, Czernikiewicz A, Patejuk-Mazurek I, Roszkowska A, Britmann J, Grzesiewska J, Mosiołek A. Politerapia zaburzeń depresyjnych. *Psychiatria* 2007, 4, 97-104.
102. Pużyński S. Depresja lekooporna. *Terapia* 2005, 13, 27-33.

103. Hill T, Lewicki P. *Statistic, method and applications: A comprehensive reference for science, industry, and data mining*. StatSoft, Inc., Tulsa, 2006.
104. Otto M. *Chemometrics: Statistics and computer application in analytical chemistry*. Wiley - VCH, New York, 1999.

8. Aneks

Charakterystyka pacjentek leczonych w Szpitalu dla Nerwowo i Psychiczenie Chorych w Starogardzie Gdańskim. Wyniki analizy zawartości kortyzolu w ślinie tych pacjentek są przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej.

L.p.	Symbol pacjentki	Wiek (lata)	Typ zaburzenia	Czasookres leczenia (liczba dni)	Krotność pobytu w szpitalu	Stosowany lek	Grupa zastosowanego leku
1	3/9	51	Depresyjne z elementami psychiatrycznymi	90	4	Wenlafaksyna	SNRI
2	4/9	60	Depresyjne	153	1	Opipramol	TLPD
3	5/9	52	Depresyjne, zaburzenia organiczne	28	1	Wenlafaksyna	SNRI
4	6/9	63	Depresyjne	31	2	Sertralina	SSRI
5	7/9	38	Depresyjne, zaburzenia organiczne	29	1	Paroksetyna	SSRI
6	8/9	47	Depresyjne	31	2	Wenlafaksyna	SNRI
7	9/9	55	Depresyjne	24	1	Sertralina	SSRI
8	10/9	51	Depresyjne	76	4	Trazodon	SARI
9	11/9	36	Depresyjne	31	1	Sertralina	SSRI
10	12/9	54	Depresyjne nawracające	59	7	Amitriptylina	TLPD
11	13/9	38	Depresyjne	104	3	Trazodon	SARI
12	14/9	63	Depresyjne	12	1	Mirtazapina	NaSSA
13	15/9	46	Depresyjne	57	7	Trazodon	SARI
14	16/9	38	Depresyjne	84	3	Sertralina	SSRI
15	1/7	45	Organiczne zaburzenia lękowe	41	4	Citalopram	SSRI
16	2/7	31	Organiczne zaburzenia lękowe	32	3	Amitriptylina	TLPD
17	3/7	53	Zespół depresyjny	29	6	Mianseryna	SSA
18	4/7	48	Depresyjne nawracające	49	5	Escitalopram	SSRI
19	5/7	39	Depresyjne nawracające	16	2	Amitriptylina	TLPD
20	7/7	51	Depresyjne, po próbie samobójczej	52	1	Escitalopram/ Trazodon	SSRI/SARI
21	8/7	54	Depresyjno-lękowe	39	3	Citalopram	SSRI
22	9/7	59	Depresja endogenna	61	1	Sertralina/ Trazodon	SSRI/SARI
23	10/7	26	Depresyjne, po próbie samobójczej	24	2	Perazylna/ Hydroksyzyna	Neuroleptyk
24	11/7	56	Depresyjno-lękowe mieszane	78	1	Sertralina	SSRI
25	12/7	53	Depresyjne nawracające	49	2	Escitalopram/ Trazodon	SSRI/SARI
26	13/7	50	Depresyjne z objawami psychiatrycznymi	38	3	Perazylna	Neuroleptyk
27	14/7	58	Depresyjne	72	2	Citalopram	SSRI
28	15/7	57	Depresyjne	63	1	Wenlafaksyna	SNRI
29	16/7	50	Depresyjno-lękowe	23	5	Moklobemid	RIMA

30	17/7	28	Depresyjno-lękowe	39	4	Mianseryna	SSA
31	18/7	50	Depresyjno-lękowe	38	3	Perazylna	Neuroleptyk
32	19/7	56	Depresyjno-lękowe	7	1	Perazylna	Neuroleptyk
33	20/7	21	Reakcja sytuacyjna	12	1	Hydroksyzyna	Neuroleptyk
34	21/7	47	Depresyjne	19	7	Zyprazydon	Neuroleptyk
35	22/7	47	Depresyjno-lękowe	28	2	Wenlafaksyna/ Trazodon	SNRI/SARI
36	23/7	34	Depresyjno-lękowe	43	2	Olanzapina	Neuroleptyk
37	24/7	36	Depresyjne nawracające	26	1	Wenlafaksyna	SNRI
38	25/7	65	Depresyjne	46	1	Mianseryna	SSA
39	26/7	43	Depresyjne	55	1	Mianseryna	SSA
40	27/7	46	Reaktywny zespół depresyjny	30	1	Tianeptyna	SSRE
41	28/7	56	Depresyjne	50	3	Doksepina	TLPD
42	29/7	48	Depresyjne nawracające	36	2	Sertralina/ Mirtazapina	NaSSA
43	30/7	51	Depresyjno-lękowe	18	7	Escitalopram	SSRI
44	31/7	29	Depresyjne	34	1	Wenlafaksyna	SNRI
45	32/7	55	Depresyjne	34	1	Escitalopram	SSRI
46	33/7	52	Epizod depresyjny	34	2	Escitalopram	SSRI
47	34/7	51	Reakcja sytuacyjna	32	1	Citalopram	SSRI
48	35/7	53	Organiczne zaburzenia nastroju	40	2	Wenlafaksyna	SNRI
49	36/7	36	Reakcja sytuacyjna	28	5	Paroksetyna	SSRI
50	37/7	65	Depresyjne nawracające	7	3	Amitriptylina	TLPD
51	38/7	43	Organiczne zaburzenia osobowości i nastroju	48	1	Perazylna	Neuroleptyk
52	39/7	57	Depresyjne nawracające	46	2	Mianseryna	SSA
53	40/7	53	Depresyjne	50	1	Wenlafaksyna	SNRI
54	41/7	54	Depresyjno-lękowe	17	4	Klomipramina	TLPD
55	42/7	52	Organiczne zaburzenia nastroju, lekkie upośledzenie umysłowe	60	2	Mianseryna	SSA
56	43/7	31	Depresyjne z myślami i próbami samobójczymi	14	4	Fluwoksamina	SSRI
57	44/7	58	Depresyjno-lękowe	8	2	Klomipramina	TLPD
58	45/7	44	Depresyjne, po próbie samobójczej	46	2	Trazodon/ Wenlafaksyna	SARI/SNRI
59	46/7	52	Depresyjne	46	2	Amitriptylina	TLPD
60	47/7	47	Depresyjno- paranoidalne	33	4	Fluwoksamina	SSRI
61	48/7	46	Organiczne zaburzenia depresyjne, po próbie samobójczej	6	2	Mianseryna	SSA
62	49/7	47	Depresyjne nawracające	29	5	Fluwoksamina	SSRI
63	50/7	44	Organiczne zaburzenia depresyjne, zaburzenia osobowości	87	2	Wenlafaksyna	SNRI
64	51/7	47	Depresyjne	39	3	Wenlafaksyna/ SNRI/SSA/SARI	SNRI/SSA/SARI

						Mianseryna/ Trazodon	
65	52/7	42	Depresyjne	11	2	Citalopram/ Mianseryna	SSRI/SSA
66	53/7	63	Organiczne zaburzenia nastroju	52	1	Klomipramina	TLPD
67	55/7	59	Depresyjne	52	1	Sertralina/ Wenlafaksyna	SSRI/SNRI
68	56/7	39	Epizod depresyjny	58	1	Escitalopram	SSRI
69	57/7	43	Depresyjne	35	2	Amitryptylina	TLPD
70	58/7	46	Depresyjne	46	1	Citalopram/ Mianseryna	SSRI/SSA
71	59/7	26	Zespół depresyjny, po próbie samobójczej	68	1	Wenlafaksyna	SNRI
72	60/7	55	Zespół depresyjny, CHAD	43	1	Amitryptylina	TLPD
73	61/7	47	Depresyjne	14	1	Wenlafaksyna	SNRI
74	62/7	55	Depresyjne	9	1	Perazyna	Neuroleptyk
75	63/7	47	Depresyjne	12	1	Tianeptyna	SSRE
76	64/7	69	Depresyjne	8	2	Escitalopram/ Trazodon	SSRI/SARI
77	65/7	49	Epizod depresyjny, schorzenie schizoafektywne	14	3	Olanzapina	Neuroleptyk
78	66/7	48	Depresyjne nawracające	18	2	Wenlafaksyna	SNRI
79	70/7	52	Depresyjne	36	1	Wenlafaksyna	SNRI
80	71/7	46	Depresyjne	68	4	Wenlafaksyna	SNRI
81	72/7	31	Depresyjne	66	3	Wenlafaksyna	SNRI
82	73/7	44	Depresyjne	41	3	Hydroksyzyna	Neuroleptyk
83	74/7	44	Reakcja sytuacyjna	32	3	Sertralina	SSRI
84	75/7	49	Zespół depresyjny, CHAD	82	5	Sertralina	SSRI
85	76/7	53	Depresyjno-lękowe	79	2	Citalopram	SSRI
86	77/7	26	Epizod depresyjny, myśli samobójcze	12	1	Sertralina	SSRI
87	78/7	48	Organiczne zaburzenia nastroju	29	3	Citalopram	SSRI
88	79/7	58	Organiczne zaburzenia lękowe i depresyjne	40	3	Citalopram	SSRI
89	80/7	59	Organiczny zespół depresyjny	76	12	Klomipramina/ Citalopram	TLPD/SSRI
90	81/7	60	Organiczne zaburzenia depresyjne	31	6	Fluoksetyna	SSRI
91	82/7	66	Depresyjne	76	2	Sertralina	SSRI
92	83/7	31	Depresyjne, osobowości, po próbie samobójczej	21	1	Mianseryna/ Sertralina	SSA/SSRI
93	84/7	28	Depresyjne	46	7	Tianeptyna	SSRE
94	85/7	56	Depresyjne nawracające	45	6	Mianseryna/ Wenlafaksyna	SSA/SNRI
95	86/7	53	Organiczne zaburzenia depresyjne	47	6	Escitalopram/ Trazodon	SSRI/SARI
96	87/7	44	Zespół depresyjny	25	2	Sertralina	SSRI
97	88/7	53	Epizod depresyjny	29	1	Sertralina/ Doksepina	SSRI/TLPD

Streszczenie

Kortyzol, jeden z najważniejszych hormonów steroidowych, produkowany przez korę nadnerczy, odpowiada za kontrolę większości przemian metabolicznych organizmu, działanie układu odpornościowego, sercowo - naczyniowego, jak również szkieletowego, pośredniczy także w zmianach ekspresji licznych genów. Podwyższenie jego poziomu towarzyszy wielu chorobom w tym również depresji, która według WHO jest czwartym co do częstości występowania schorzeniem na świecie. Przyjmuje się, iż depresja dotyka częściej kobiety niż mężczyzn, co jest w dużej mierze związane ze zmianami hormonalnymi zachodzącymi w organizmie.

W leczeniu depresji stosowane są leki należące do kilku grup a ich podział opiera się głównie na wpływie na określone neuroprzekaźniki, co wynika z najlepiej udokumentowanej teorii powstawania depresji, jaką jest teoria monoaminergiczna. Stosunkowo niedawno zaczęto rozpatrywać inne procesy, które mogą mieć wpływ na pojawienie się tego schorzenia. Obecnie prowadzone są liczne badania mające na celu określenie roli kortyzolu w patogenezie depresji. Analizuje się również wpływ stosowanych leków przeciwdepresyjnych na poziom hormonu zarówno u osób zdrowych, jak i u cierpiących z powodu depresji. Z danych literaturowych wynika, iż leki przeciwdepresyjne w różny sposób wpływają na poziom kortyzolu w zależności od stanu zdrowia probanta.

Najczęściej poziom hormonu u osób chorych na depresję oznaczany jest przed oraz po przeprowadzonej terapii. Brak jest jednak danych dotyczących zmian jego stężenia w trakcie leczenia. Materiał badawczy, w którym najczęściej oznaczany jest kortyzol, stanowi krew. Należy jednak zauważyć, że jej pobór do badań może być kłopotliwy ze względu na bardzo często towarzyszącą depresji apatię. Ponadto stres związany z pobieraniem krwi może dodatkowo przyczynić się do wzrostu poziomu hormonu.

Z danych literaturowych wynika, iż do analizy ilościowej kortyzolu najczęściej stosowane są metody nieseparacyjne, a wśród nich RIA i EIA. Otrzymane przy ich wykorzystaniu wyniki mogą być jednak zawyżone ze względu na często występującą reakcję krzyżową pomiędzy oznaczanymi hormonami steroidowymi.

Analizując dostępne dane literaturowe stwierdzono, iż brak jest pełnej informacji na temat wpływu poszczególnych leków przeciwdepresyjnych na wydzielanie hormonu w trakcie terapii, dlatego też zdecydowano się przeprowadzić badania, których celem jest

określenie zmian poziomu kortyzolu pod wpływem stosowanych leków psychotropowych u kobiet hospitalizowanych z powodu depresji. Jako materiał badawczy wybrano ślinę, której pobór jest mało inwazyjny, a jej gromadzenie nie nastręcza trudności probantce.

Oznaczenia ilościowe wykonano przy pomocy HPLC z użyciem detektora UV przy długości fali 240 nm. Przed przystąpieniem do analizy próbek pochodzących od pacjentek opracowano procedurę analityczną pozwalającą na oczyszczenie próbki. Do wstępnej analizy zastosowano dwa typy ekstrakcji – SPE i LLE. Na podstawie analizy uzyskanych danych stwierdzono, iż lepsze wyniki daje ekstrakcja typu ciecz – ciecz. W związku z powyższym zdecydowano się na zastosowanie ekstrakcji dichlorometanem.

Przed opracowywaniem warunków analizy chromatograficznej wykonano widmo absorpcji kortyzolu w celu określenia optymalnej długości fali, następnie przystąpiono do doboru fazy ruchomej i stacjonarnej. Jako faza ruchoma najbardziej optymalny okazał się układ binarny acetonitryl : woda (30 : 70, v : v), natomiast w roli fazy stacjonarnej użyto kolumnę z wypełnieniem C₁₈. Opracowane warunki ekstrakcji i analizy chromatograficznej zastosowano do wyznaczenia krzywej kalibracji stosując metodę wzorca wewnętrznego, którym była karbamazepina. Następnie określono trwałość kortyzolu na podstawie testu zamrażania i rozmrażania próbek, obejmującego 4 cykle. Ponadto określono również wydajność zastosowanej ekstrakcji.

Przed przystąpieniem do analizy próbek pochodzących od pacjentek przeprowadzono walidację metody określając jej selektywność, powtarzalność, odtwarzalność, dokładność, a także wyznaczając liniowość, granice wykrywalności i oznaczalności oraz czułość.

Badaniami objęto pacjentki hospitalizowane z powodu depresji w Szpitalu dla Nerwowo i Psychicznie Chorych w Starogardzie Gdańskim w latach 2008 - 2010. Próbki śliny pobierano do plastikowych pojemników każdego dnia w trakcie całego pobytu pacjentki w szpitalu. Materiał do badań gromadzono o stałej porze, około godziny 10, kiedy to poziom endogennego kortyzolu jest najwyższy. Próbki śliny przechowywano w lodówce, a następnie przewożono do Katedry i Zakładu Chemii Analitycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, gdzie w stanie zamrożonym przechowywano do czasu analizy.

Analizie poddano 2653. próbki śliny pochodzące od 97. pacjentek, których średni wiek wynosił 48 lat, a średni okres hospitalizacji - 42. dni. Wśród stosowanych leków znalazły się preparaty podawane zarówno w mono- jak i politerapii, należące do grupy TLPD (amitryptylina, klomipramina, doksepina i opipramol), a także SSRI (sertralina, citalopram, escitalopram, fluoksetyna, fluwoksamina, paroksetyna), jak również wenlafaksyna,

mianseryna oraz mirtazapina. Kortyzol oznaczano też w ślinie probantek leczonych terapią skojarzoną oraz innymi preparatami psychotropowymi, takimi jak perazyna czy olanzapina.

Przed przystąpieniem do analizy próbki śliny rozmrażano, a następnie z każdej pobierano 1 ml materiału biologicznego, dodawano wzorca wewnętrznego i ekstrahowano dichlorometanem. Oczyszczone ekstrakty poddawano następnie analizie chromatograficznej w opisanych wyżej warunkach.

Na podstawie otrzymanych danych wykonano diagramy obrazujące zmiany stężenia kortyzolu w trakcie terapii poszczególnymi lekami. Pozwoliły one na wstępną analizę wyników. Zaobserwowano, iż w przypadku pacjentek, których odpowiedź organizmu na zastosowane leczenie była dobra, następowało szybkie obniżanie wydzielanego kortyzolu, a czas hospitalizacji probantki rzadko przekraczał 20 dni. Istotnym wydaje się fakt, iż taka sytuacja miała miejsce niezależnie od zastosowanej terapii.

W pozostałych przypadkach, kiedy poziom kortyzolu ulegał wahaniom w trakcie terapii, profile zmian stężenia hormonu w ślinie różniły się od siebie w zależności od zastosowanego leku i jego mechanizmu działania, a w szczególności od sposobu wpływu leku na receptory serotoninowe. Zaobserwowano, iż w przypadku pacjentek hospitalizowanych powyżej 30 dni, które leczono przede wszystkim preparatami z grupy TLPD (amitryptylina i klomipramina) oraz SSRI (sertralina i citalopram), po upływie prawie 30. dni terapii następował wtórny wzrost wydzielania kortyzolu, a w ciągu następnych kilku dni stężenie hormonu obniżało się.

Stwierdzono ponadto, że leki modyfikujące receptory serotoninowe u osób zdrowych, jak citalopram i klomipramina, w podobny sposób wpływają na receptory 5-HT również osób chorych na depresję. W związku z tym, iż u pacjentek leczonych tymi lekami po wystąpieniu wtórnego wzrostu stężenia kortyzolu, poziom hormonu pozostawał podwyższony, a amplituda jego zmian była większa niż przed wystąpieniem wtórnego wzrostu jego wydzielania.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono również, iż na czasookres pobytu pacjentki w szpitalu bezpośredni wpływ ma amplituda zmian poziomu kortyzolu w ślinie. Pacjentki, u których występowały znaczne wahania stężenia hormonu tak, iż różnica pomiędzy oznaczonymi wartościami w kolejnych dniach była rzędu kilkunastu ng/ml, charakteryzowały się dłuższym czasookres hospitalizacji w stosunku do probantek, u których różnice stężeń kortyzolu nie przekraczały kilku ng/ml. Zaobserwowano ponadto, że pacjentki u których wystąpiły duże wahania poziomu hormonu były już kilkakrotnie leczone w szpitalu z powodu depresji.

Badania wskazały również, iż pacjentki, u których zastosowano terapię łączoną, a czas ich pobytu w szpitalu był dłuższy niż 30 dni, nie odznaczały się wtórnym wzrostem wydzielania kortyzolu również wtedy, gdy jednym z leków był preparat, który w monoterapii wywoływał wtórny wzrost wydzielania hormonu (citalopram, wenlafaksyna). W tych przypadkach tylko w nielicznych sytuacjach obserwowano nieznaczne podwyższenie stężenia kortyzolu.

Analiza uzyskanych danych pozwoliła także stwierdzić, iż u niektórych pacjentek pomimo obniżenia stężenia kortyzolu w trakcie terapii, nadal przekraczał on wartości referencyjne. Zaobserwowano jednak, że amplituda zmian stężenia hormonu była niewielka (kilka ng/ml), co świadczy o tym, iż w wyniku zastosowanego leczenia następuje stabilizacja wydzielania kortyzolu na poziomie charakterystycznym dla danej pacjentki.

Wśród badanych pacjentek znalazły się również probantki leczone preparatami przeciwpsychotycznymi, które powodują, że zmiany poziomu kortyzolu mają podobny przebieg, jaki obserwowano w przypadku pacjentek leczonych typowymi lekami przeciwdepresyjnymi.

W celu potwierdzenia wniosków wynikających z przeprowadzonych badań, uzyskane dane poddano analizie statystycznej z użyciem analizy skupień (CA) i analizy głównych składowych (PCA). W obu przypadkach skorzystano z macierzy zawierającej 22. zmienne, które charakteryzowały 97. pacjentek. CA wykazała, że badane probantki można podzielić na grupy biorąc pod uwagę przede wszystkim amplitudę zmian poziomu hormonu w ślinie. Jedną grupę utworzyły pacjentki, u których amplituda zmian była niewielka (kilka ng/ml), a stężenie kortyzolu najczęściej nie przekraczało wartości referencyjnych. Kolejna grupa obejmowała probantki, u których nie zaobserwowano obniżenia poziomu kortyzolu do wartości referencyjnych w trakcie całego okresu hospitalizacji. W tej grupie pacjentek szczególnie mocno zaznaczył się fakt, iż były uprzednio kilkakrotnie hospitalizowane z powodu depresji.

Pozostałe trzy grupy utworzyły probantki, u których stwierdzono obniżenie wydzielania kortyzolu do wartości referencyjnych. W przypadku tych pacjentek klasyfikacja do poszczególnych grup zależała od czasu w jakim utrzymywał się obniżony poziom wydzielania hormonu.

Należy również zauważyć, iż analiza skupień pozwoliła zaobserwować, które leki były najczęściej stosowane przez pacjentki należące do poszczególnych grup. Potwierdziło to opisane wyżej wyniki badań, jak również dane literaturowe na temat wpływu niektórych

leków, jak np.: klomipraminy i citalopramu, na receptory serotoninowe nie tylko u osób zdrowych, lecz także cierpiących z powodu depresji.

PCA wykazała z kolei, iż największy wpływ na grupowanie się pacjentek ma czasookres ich pobytu w szpitalu, w trakcie którego wykryto poziom wydzielanego kortyzolu zbliżony do wartości referencyjnych. Istotna jest również amplituda zmian poziomu kortyzolu w trakcie leczenia. Odrębne grupy tworzą pacjentki, u których zaobserwowano szybki spadek poziomu kortyzolu oraz krótki okres hospitalizacji, a także te kilkakrotnie leczone, u których poziom hormonu ulegał znacznym wahaniom w ciągu całego okresu hospitalizacji, a ponadto nie wykryto u nich stężenia kortyzolu odpowiadającego wartościom referencyjnym.

Zaobserwowano również, że w szczególności probantki stosujące sertralinę, wenlafaksynę oraz terapię skojarzoną tworzą charakterystyczne skupienia, które pokrywają się z odpowiednimi aglomeracjami tworzonymi przez pacjentki w analizie skupień.

Wyniki przeprowadzonych badań oraz wykonana na ich podstawie analiza statystyczna wykazała, że sertralina, amitryptylina oraz polipragmazja najczęściej pozwalają na skuteczne obniżenie poziomu kortyzolu podczas leczenia depresji. Ponadto stwierdzono, iż w przypadku pacjentek dobrze reagujących na podany lek przeciwdepresyjny niezależnie od jego mechanizmu działania, następuje szybka poprawa stanu zdrowia probantki, co znajduje swoje odzwierciedlenie w obniżaniu się poziomu wydzielanego hormonu i równocześnie w krótkim okresie hospitalizacji.

Wykazano także, że inne leki psychotropowe, jak perazyna, hydroksyzyna, olanzapina czy zyprazydon, stosowane również w terapii depresji, wykazują podobny wpływ na obniżenie wydzielania kortyzolu, a pacjentki stosujące te leki charakteryzowały się zbliżonym profilem zmian poziomu hormonu do obserwowanego u probantek leczonych lekami przeciwdepresyjnymi.

Summary

Cortisol is one of the most important steroid hormones produced by adrenal cortex. It controls majority of body metabolism, immune function, cardiovascular system and skeleton. It also mediates in expression of many genes. The increase of its level is concomitant in many diseases, like for example depression, which according to WHO is forth of the most common occur diseases in the world. It is suggested that the depression appears more often in women population and it can be caused by hormonal changes in females' organisms.

There are few groups of drugs that are used in treatment for depression. Division of them is based on their influence on neurotransmitters because the best documented theory about genesis of depression is based on drugs action on monoamines. Until recently there are some investigations about other processes, which can cause this illnesses. In nowadays many researches are related to the role cortisol plays in pathogenesis of depression. The influence of the antidepressant drugs on the level of cortisol in healthy and depressed people is also analyzed. In the literature we can find, that antidepressants effect in different way cortisol's level and it depends on health condition of subject.

Most often the level of the cortisol in depressed persons is determined before or after drug therapy and there is no enough information about changes of hormone's concentration during the treatment. As a research material, the blood is the most frequently used for determination of cortisol level, but it can be difficult for sampling because of the apathy which occur very often during the depression. Moreover during the blood sampling the stress can cause the increase of cortisol level.

The EIA and RIA are the most popular unseparated methods used for determination of the cortisol according to recorded data, but the results of these methods can be inflated because of crossing reaction between different steroids hormones.

The analysis of the literature allows to state that there is no complete information about the influence of antidepressants on cortisol secretion during the therapy. That is why it was decided to carry out the researches related to determination of the level of cortisol in women hospitalized because of depression during the psychotropic drugs therapy. The saliva was chosen as a research material because of non-invasive way of receiving it and its sampling does not procure the troubles for subject.

The quantitative determination of the cortisol was made by HPLC with UV detection by 240 nm. Before the analysis of saliva samples obtained from depressed patients there was analytical procedure developed, which allowed refining the probe. For the preliminary analysis the LLE and SPE were applied. The results of the initial analysis showed that LLE gave the better effect, so it was decided to use this kind of extraction with dichloromethane.

Before the elaboration of chromatographic conditions the absorption spectrum of cortisol was made for determination its wavelength. After this the chromatographic condition – mobile and stationary phases were worked up. As a mobile phase acetonitrile and water were used (70 : 30, v : v) and the chromatographic column with reversed - phase C₁₈ filling was used as a stationary phase. The elaborated conditions of extraction and chromatographic analysis were used for determination of calibration curve with internal standard method which was the carbamazepine. Then the freezing and thawing test was made which included 4 cycles. In addition the efficiency of extraction was made.

The validation of elaborated method was made before the analysis of samples obtained from patients. Selectivity, intra- and inter – assay study, accuracy, linearity, limit of detection and quantification and sensitivity of method were determined.

Depressed women and hospitalized in the years 2008 – 2010 in Hospital for Psycho and Nervous Ill in Starogard Gdański took a participation in the researches. The saliva samples were sampled into plastic tubes on daily basis about 10 a.m. when the level of endogenous cortisol is the highest. The sampling took place every day during the whole stay of the patient in the hospital. The saliva samples were stored in the fridge and then transported into Department of Analytical Chemistry of Medical University of Gdańsk, where they were frozen until the analysis.

The 2653 saliva samples obtained from 97 patients were analyzed. Patient mean age was 48 and mean hospitalized time was 42 days. Among the drugs, that were applied in monotherapy and also in polipragmasy were TCA (amitriptyline, clomipramine, doxepin and opipramol), as well SSRI (sertraline, citalopram, escitalopram, fluoxetine, fluvoxamine, paroxetine) and venlafaxine, mianserine, mirtazapine were used. The cortisol was determined in saliva samples obtained from depressed women treated with combined treatment and with other psychotropic drugs like olanzapine and perazine.

The saliva samples were thawing before the analysis. After this 1 ml of saliva was taken and the internal standard was added then the extraction with dichloromethane was made. The

cleaned extracts of saliva samples were analyzed by HPLC in conditions which were described below.

The results of the researches in form of diagrams were used for presentation of changes in salivary cortisol level during the therapy. It was useful for initial analysis of the results. It was observed that in the case of patient organism respond to treatment, the concentration of cortisol was decreased very quickly and the time of hospitalization of that patient was not longer than 20 days. It was interesting that this kind of situation appeared independently of applied drug therapy.

In the other cases, when the level of cortisol oscillated during the therapy, profiles of changes of its concentration in saliva were different depending on the applied drug and its mechanism of action, in particular the influence on serotonin receptors. It was observed, that the patients, who stayed at hospital longer than 30 days and were treated with drugs from TCA (amitriptyline and clomipramine) or SSRI (sertraline and citalopram) had the increase of the secretion of cortisol after almost 30 days of the therapy. After few next days the level of this hormone was decreasing.

Also it was observed that drugs, like clomipramine and citalopram, which modify the serotonin receptors in healthy subject, cause the similar action on the 5-HT receptors in depressed persons too. In this situation it was noticed that in profiles of patients who were treated with those drugs the level of cortisol after secondary increase of hormone stayed on the higher level and the amplitude of its secretion was larger than before the secondary increase.

The results of the studies also allowed to state that the amplitude of the concentration of cortisol during the treatment had a direct influence on time of hospitalization. In case when the fluctuation of the concentration of the cortisol was wide, it means that the results between the concentration determined in two days were about dozen of ng/ml, the time of the hospitalization of that patients was longer than when the results between the concentration were only a few ng/ml. It was also observed that the patients with wider oscillation of the concentration of the cortisol were already hospitalized several times because of the depression.

The researches indicated also, that the patients who were treated with combined treatment and their time of the hospitalization was longer than 30 days, did not show the secondary increase of the level of cortisol, even when one of the drug, like venlafaxine and citalopram

used in monotherapy caused that effect. In some cases only a small increase of the level of cortisol was noticed.

The analysis of the results allowed to find that in some cases, in spite of therapy, the level of the cortisol did not decrease and it was still higher than the reference value. However it was noticed that the amplitude was smaller (a few ng/ml), which pointed that concentration of the cortisol got stabilized on characteristic for the patient level in response to the treatment.

Among the patients were also subjects treated with antipsychotic drugs, in that cases it was observed that that drugs caused the same effect on concentration of the cortisol as well as the typical antidepressants.

In the purpose of verification of the results of the researches, they were analyzed with the used of Cluster Analysis (CA) and Principles Component Analysis (PCA). In both cases the same matrix with 22 covariance characterizing 97 patients were used. CA demonstrated that the subjects can be divided into groups because of the changes amplitude of the cortisol concentration in saliva. One of the groups was created by patients with small amplitude of concentration of the hormone (a few ng/ml) and the values were similar to references. The next group was created by subjects without any stabilization of the secretion of the cortisol during the whole hospitalization. For this group it was very typical that all patients were already hospitalized because of the depression a few times.

The other groups were created by the subjects which had some periods of decrease of the secretion during the hospitalization. Classification in these groups depended on length of the period with lower secretion of the cortisol.

The CA also allowed to notice which drugs were used by patients from particular groups. This observation confirmed the researches as well as literature information about influence of some drugs, like clomipramine and citalopram on serotonin receptors not only in healthy subjects but also in depressed patients.

PCA demonstrated, that the most significant influence on creation of the agglomerations was a period of the hospitalization during which the level of the cortisol was similar to the referenced value. The amplitude of the changes of the concentration during the treatment was important as well. Separate group was created by the patients who had a significant decrease of the cortisol concentration and their period of hospitalization was short. Also patients who were hospitalized a few times with fluctuated level of the cortisol and without a stabilization period had created a separate group.

It was also observed that particularly patients treated with sertraline, venlafaxine and combined treatment created a characteristic concentrations, which are similar to those created by patients noticed in CA.

The results of the researches and the statistical analysis which was made according to the results of this studies demonstrated that sertralina, amitriptyline and combined treatment are the most useful in treatment for effective decrease of the secretion of the cortisol during the treatment of the depression. Moreover it was noticed, that in case of patients with good reaction on the therapy of antidepressant, independently of its mechanism of action, improvement of health state was quick. It was a reflection of decrease of the concentration of the cortisol and the short period of hospitalization.

It was also revealed that other psychotropic drugs like perazine, hydroxizine, olanzapine or ziprasidone, which are also used in the therapy of the depression had similar influence on decrease of the secretion of cortisol. Patients who were treated with antipsychotics had similar profiles of hormone level changes as those who were treated with antidepressants.

Wyniki prezentowane w rozprawie doktorskiej były częściowo przedmiotem publikacji:

w czasopismach z IF:

1. Dziurkowska E., Wesołowski M.: Evaluation of two techniques for extraction of cortisol from human saliva; *Chromatographia* 70, 769-774, 2009. IF = 1,098

w pozostałych czasopismach:

1. Dziurkowska E., Wesołowski M.: Ślina - wartościowy materiał biologiczny do oznaczania kortyzolu; *Farm. Przegł. Nauk.* 12, 21-26, 2010
2. Dziurkowska E., Wesołowski M.: Estimation of cortisol in hospitalized patients with depression; *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska. Sect. DDD Pharmacia*, 22, 59-65, 2009
3. Dziurkowska E., Zarzycki P.K.: Rola oznaczania hormonów steroidowych w ślinie w nowoczesnej diagnostyce medycznej; *Bromat. Chem. Toksykol.* 40, 403-411, 2007
4. Dziurkowska E., Zarzycki P.K.: Współczesne standardy leczenia choroby afektywnej dwubiegunowej; *Farm. Pol.* 62, 995-1005, 2006

rozdziały w książce:

1. Pankiewicz P., Majkovicz M., Dziurkowski M., Dziurkowska E., Pankiewicz Ż.: Analiza badań ankietowych dotyczących jakości życia u pacjentów z rozpoznaniem schizofrenii paranoidalnej; W: *Dobrostan i wsparcie w zdrowiu i chorobie / praca zbior. pod red. Henryka Wiktora*; Lublin, NeuroCentrum, 2008; s. 121-128
2. Pankiewicz P., Majkovicz M., Dziurkowski M., Dziurkowska E., Pankiewicz Ż.: Analiza badań ankietowych dotyczących jakości życia u pacjentów z rozpoznaniem nawracających zaburzeń depresyjnych; W: *Dobrostan i wsparcie w zdrowiu i chorobie / praca zbior. pod red. Henryka Wiktora*; Lublin, NeuroCentrum, 2008; s. 113-119

zagraniczne streszczenia zjazdowe:

1. Pankiewicz P., Majkovicz M., Dziurkowski M., Dziurkowska E., Pankiewicz Ż.: Analysis of the questionnaires about life quality of patients with depression; XIV World Congress of Psychiatry, Prague, Czech Republic, 20-25 September 2008; *Česk. Slov. Psychiatr.* 104, 1209, 2008

2. Pankiewicz P., Majkowicz M., Dziurkowski M., Dziurkowska E., Pankiewicz Ż.: Analysis of the questionnaires about life quality of patients with paranoid schizophrenia; XIV World Congress of Psychiatry, Prague, Czech Republic, 20-25 September 2008; Česk. Slov. Psychiatr. 104, 1285, 2008

krajowe streszczenia zjazdowe:

1. Dziurkowska E., Wesołowski M.: Oszacowanie poziomu kortyzolu w ślinie pacjentek hospitalizowanych z powodu depresji; W: Materiały II Ogólnopolskiego Sympozjum "Nowoczesne techniki badawcze w ocenie jakości produktów leczniczych", Lublin, 24-25 września 2009; s. 54
2. Dziurkowska E., Wesołowski M.: Wpływ wybranych leków przeciwdepresyjnych na wydzielanie kortyzolu; W: XXIII Konferencja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Gdańsku, Wydział Farmaceutyczny AMG w obszarach badawczych farmacja - kosmetyki - biotechnologia, Gdańsk, 21-22 maja 2009; s. 34
3. Konieczna L., Plenis A., Kowalski P., Dziurkowska E.: Determination of cortisol in human plasma by high-performance liquid chromatography method with ultraviolet detection; W: 19th International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis, Gdańsk, Poland June 8-12, 2008; s. 115
4. Dziurkowska E., Konieczna L., Plenis A.: The determination of cortisol in human saliva; W: 19th International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis, Gdańsk, Poland, June 8-12, 2008; s.204
5. Plenis A., Konieczna L., Kowalski P., Dziurkowska E.: A validated HPLC-UV method for the determination of corticosterone in human plasma and its application to metabolomic studies; W: 19th International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis, Gdańsk, Poland, June 8-12, 2008; s. 284
6. Dziurkowska E., Konieczna L., Plenis A.: Oznaczanie kortyzolu w ślinie metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej; W: XX Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego "Farmacja XXI wieku - wyzwania i nadzieje", Katowice, 25-28 września 2007; streszczenia: T. 2; s. 522
7. Dziurkowski M., Pankiewicz P., Majkowicz M., Dziurkowska E., Pankiewicz Ż.: Poglądy i odczucia na temat choroby u pacjentów z rozpoznaniem nawracających zaburzeń depresyjnych: wyniki badań ankietowych; XLII Zjazd Psychiatrów Polskich:

Miejsce psychiatrii wśród nauk medycznych, Szczecin, 14-16 czerwca 2007;
Psychiatr. Pol. 41, 221-22, 2007

8. Dziurkowski M., Dziurkowska E.: XXI wiek - ewolucja czy rewolucja w obrazie schizofrenii paranoidalnej?; XLII Zjazd Psychiatrów Polskich "Miejsce psychiatrii wśród nauk medycznych", Szczecin, 14-16 czerwca 2007; Psychiatr. Pol. 41, 222, 2007