



Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Lekarski

Łukasz Cieszyński

Ocena przydatności klinicznej oznaczeń kortyzolu w ślinie i włosach

Rozprawa na stopień doktora nauka medycznych

Promotor: prof. dr hab. Krzysztof Sworczak
Katedra i Klinika Endokrynologii i Chorób Wewnętrznych

Gdańsk 2020

Składam serdeczne podziękowania **prof. dr hab. Krzysztofowi Sworczakowi**,
za wieloletni trud dzielenia się wiedzą i doświadczeniem zawodowym
oraz życzliwość przy tworzeniu pracy doktorskiej

Niniejszą pracę dedykuję mamie, babci oraz córce Weronice

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	5
WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY.....	6
STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM	7
Wstęp	7
Cele pracy	10
Materiał i metody	10
Omówienie wyników prac wchodzących w skład rozprawy	13
Wnioski	18
STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM	18
Introduction	18
Aims of the study	21
Materials and methods	21
Discussion of publication results included in the disseration	24
Conclusions	28
PIŚMIENNICTWO	29
SPIS ZAŁĄCZNIKÓW	34

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- 11bHSD2**- dehydrogenaza 11b-hydroksysteroidowa typu 2 (ang. 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type 2)
- 1mgONDST**- test hamowania nocnego z 1 mg deksametazonu (ang. over night dexamethason supression test)
- ACTH**- hormon adrenokortykotropowy (ang. adrenocorticotropic hormone)
- AIC**- kryterium informacyjne Akaikego (ang. Akaike Information Criterion)
- CAR**- wydzielania kortyzolu w odpowiedzi na przebudzenie (ang. cortisol awakening response)
- CBG**- białko wiążące kortyzol, syn. transkortyna (ang. cortisol binding globulin)
- CRH**- hormon uwalniający kortykotropinę, syn. kortykoliberyna (ang. corticotropin releasing hormon)
- DDC**- dobowy spadek stężenia kortyzolu w surowicy (ang. diurnal decrease of cortisol)
- DEX**- deksametazon (ang. dexamethasone)
- EFSC**- wolny kortyzol w ślinie pobrany w godzinach wieczornych (ang. evening saliva free cortisol)
- ELISA**- test immunoenzymosorpcyjny (ang. enzyme- linked immunosorbent assays)
- EPC**- kortyzol w surowicy oznaczony wieczorem (ang. evening plasma cortisol)
- GCS**- glikokortykosteroidy (ang. glucocorticosteroids)
- GFR**- wskaźnik filtracji kłębuszkowej (ang. glomerular filtration rate)
- HCC**- stężenie kortyzolu we włosach (ang. hair cortisol concentrations)
- HPA**- oś podwzgórzowo- przysadkowo- nadnerczowa (ang. hypothalamic–pituitary–adrenal axis)
- LC-MS/MS**- chromatografia cieczowa/ tandemowa spektrometria mas- (ang. liquid chromatography tandem- mass spectrometry)
- MPC**- kortyzolu w surowicy oznaczony rano (ang. morning plasma cortisol)
- PBS**- sól fizjologiczna buforowana fosforanami (ang. phosphate- buffered saline)
- PFC**- wolny kortyzol w surowicy (ang. plasma free cortisol)
- PTC**- całkowity kortyzol w surowicy (ang. plasma total cortisol)
- SFC**- wolny kortyzol w ślinie (ang. saliva free cortisol)
- SHBG**- białko wiążące hormony płciowe (ang. sex hormon binding globulin)
- UFC**- wolny kortyzol w moczu (ang. urine free cortisol)
- UFC24hr**- dobowe wydalanie wolnego kortyzolu z moczem (ang. urine free cortisol, 24-hours)

WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY

1. Praca pogładowa: Cieszyński Ł, Berendt-Obołończyk M, Szulc M, Sworczak K. Cushing's syndrome due to ectopic ACTH secretion. Endokrynol Pol. 2016;67(4):458-471. doi:10.5603/EP.a2016.0055.

Impact Factor: 1,341; punktacja MNiSW: 40

Liczba cytowań wg Scopus 13, wg Web of Science Core Collection 12

2. Praca badawcza: Cieszyński Ł, Jendrzewski J, Wiśniewski P, Owczarzak A, Sworczak K. Hair cortisol concentration in a population without hypothalamic-pituitary-adrenal axis disorders. Adv Clin Exp Med. 2019;28(3):369-373. doi:10.17219/acem/90038.

Impact Factor: 1,514; punktacja MNiSW: 40

Liczba cytowań wg Scopus 1, wg Web of Science Core Collection 1

3. Praca badawcza: Cieszyński Ł, Jendrzewski J, Wiśniewski P, Kłosowski P, Sworczak K. Corellation analysis of cortisol concentration in hair versus concentrations in serum, saliva and urine. Endokrynol Pol. 2020 (online). doi:10.5603/EP.a2020.0058.

Impact Factor: 1,322; punktacja MNiSW: 40

Łączna punktacja cyklu publikacji: Impact Factor: 4,177; punktacja MNiSW: 120

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

WSTĘP

Rutynowa diagnostyka endokrynologiczna pacjentów z chorobami osi podwzgórzowo-przysadkowo- nadnerczowej (HPA) obejmuje szereg oznaczeń laboratoryjnych krwi, moczu oraz śliny. Do badań tych zaliczymy profil dobowy wydzielania kortyzolu w surowicy (DDC), wydalanie wolnego kortyzolu z moczem (UFC), oznaczenia kortyzolu w ślinie oraz liczne hormonalne testy dynamiczne z zastosowaniem stymulacji, np. test z kortykoliberyną (CRH) lub hamowania, np. test z małą/ dużą dawką deksametazonu (DEX). Liczne metody oznaczeń wynikają z potrzeby uzyskania wiarygodnych wyników korelujących z obrazem klinicznym. Ich interpretacja często bywa utrudniona, ze względu na interakcje zależne od: metody oznaczeń, czynników środowiskowych, fizjologicznych wahań stężenia kortyzolu oraz obecności innych leków/ ksenobiotyków w badanej próbce. Dodatkowo szereg stanów patologicznych wtórnie oddziałuje na oś HPA. Z tego względu nie ma pojedynczego testu, którego wykonanie dałoby wiarygodny wynik, a jedynie zastosowanie co najmniej kilku z nich może stanowić podstawę właściwej diagnozy (1-3).

Piśmiennictwo dotyczące oznaczeń stężenia kortyzolu w włosach (HCC) w dużej mierze odnosi się do innych niż pierwotnie endokrynologiczne schorzenia, w tym stany depresyjno - lękowe, zdarzenia stresowe, praca zmianowa, forsowny wysiłek fizyczny, nadużywanie alkoholu, nikotynizm, przewlekłe schorzenia ogólnointernistyczne, czy stosowanie niedozwolonego doppingu (4-12). Spośród problemów endokrynologicznych mających największe znaczenie kliniczne oraz diagnostyczne w kontekście możliwych oznaczeń HCC, należy wymienić jawny i podkliniczny zespół Cushinga, chorobę Addisona, wtórną niedoczynność kory nadnerczy oraz substytucję preparatami kortyzolu/hydrokortyzonu (13-20).

Oznaczeniom kortyzolu wykonywane różnymi metodami tradycyjnie podlegają próbki krwi, moczu i śliny. Dodatkowo, najczęściej w ramach badań naukowych, sugeruje się możliwość oceny stężenia kortyzolu we włosach. Każde z tych oznaczeń ma swoją indywidualną charakterystykę oraz przydatność kliniczną.

Badanie stężenia kortyzolu w surowicy najczęściej dotyczy oznaczenia całkowitego kortyzolu (PTC), czyli związanego z białkami osocza takimi jak transkortyna (CBG), białko wiążące hormony płciowe (SHBG) czy albumina (21,22). Tym samym na te wyniki mogą wpływać inne, nie związane z pierwotnymi chorobami osi HPA, czynniki. Doustna

antykoncpcja, ciąża, czy nadczynność tarczycy, zwiększają stężenie całkowitego kortyzolu (wyniki fałszywie dodatnie), natomiast istotna hipoalbuminemia < 25 g/dl zaniża uzyskane wartości (wyniki fałszywie ujemne) (21-24). Oznaczenia wolnego kortyzolu w surowicy (PFC) nie są rutynowo wykonywane. Przyjmuje się, że wolny kortyzol stanowi od 3 do 5% PTC (23). Stężenia kortyzolu w surowicy oznacza się w godzinach porannych, wieczornych i nocnych, celem oceny m.in. DDC. Jego brak wskazywać może na endokrynopatię, z tego względu badanie to ma charakter przesiewowy, nie mniej problemem pozostaje ambulatoryjne wykonanie oznaczenia w godzinach wieczornych (czas pracy punktu pobrania krwi/laboratorium). Dodatkowo, ocena stężenia kortyzolu w surowicy stanowi podstawę rozpoznania i różnicowania endogennej hiperkortyzolemii w oparciu o różne testy hamowania z użyciem DEX, np.: test hamowania nocny z 1 mg DEX (1mgONDST), test hamowania nocny z 8 mg DEX, test hamowania z małą dawką DEX (2mg/ dzień/ 2 dni), test hamowania z dużą dawką DEX (8mg/dzień/ 2 dni). Z drugiej strony, ocena stężeń kortyzolu w surowicy możliwa jest przy zastosowaniu testów stymulacji, np.: test z Synacthenem, test z CRH, test z wazopresyną, celem diagnostyki pierwotnej jak i wtórnej niedoczynności kory nadnerczy oraz ACTH - zależnego zespołu Cushinga (3,24,25).

Oznaczenie kortyzolu w ślinie dotyczy frakcji wolnej (SFC), której obecność w tym materiale jest efektem dyfuzji biernej wolnego kortyzolu z krwi. Dodatkowo część kortyzolu ulega w śliniankach konwersji do kortyzonu przy udziale dehydrogenazy 11b-hydroksysteroidowej typu 2 (11bHSD2). Z tego względu stężenia SFC są wielokrotnie niższe od rutynowo oznaczanego PTC. Przyjmuje się, że SFC stanowi tylko ok. 50 - 70% nie oznaczanego rutynowo PFC (26). Pobranie próbki śliny do analizy możliwe jest przez pacjenta, tym samym nie wymaga zaangażowania personelu medycznego/specjalistycznego sprzętu (redukcja kosztów, metoda nieinwazyjna). Dodatkowo, kortyzol w ślinie jest stabilny w temperaturze pokojowej przez okres ok. 7 dni, co pozwala na samodzielne pobranie próbki nie tylko w godzinach porannych, ale także wieczornych, czy nawet nocnych (ocena rytmu wydzielania, oznaczenie o północy). Wszystko to sprawia, że ocena kortyzolu w ślinie jest bardzo dobrym badaniem przesiewowym w kierunku np. hiperkortyzolemii endogennej, a bezstresowe pobranie materiału pozwala zminimalizować ewentualny wpływ na oś HPA (27,28). Należy pamiętać o właściwym sposobie pobierania próbki, tzn., nie myciu zębów bezpośrednio przed pobraniem, przepłukaniu ust wodą na 30 min. przed zabezpieczeniem materiału, oraz optymalnie pozyskaniu śliny przy użyciu dedykowanego zestawu np. słomki i saliwetki. Sprawą dyskusyjną pozostaje czas w którym powinna być pobrana próbka, tzn., po

przebudzeniu, +30min. po przebudzeniu (problem wydzielania kortyzolu w odpowiedzi na przebudzenie, CAR), wieczorem, czy o północy.

Podobnie jak w przypadku śliny, ocena stężenia kortyzolu w moczu dotyczy frakcji wolnej. Z reguły przeprowadza się zbiórkę moczu w okresie 12- godzin lub 24- godzin, tym samym ocenie podlega wydalanie kortyzolu (ilość). Ilość wydalanego kortyzolu z moczem, również jest istotnie zmniejszona w związku z nerkową aktywnością 11 β HSD2 (29). W przeszłości UFC było postrzegane jako podstawowe badanie w ocenie przesiewowej (złoty standard), aktualnie wykorzystywane jest jako badanie pomocnicze, min. w testach hamowania z małą i dużą dawką DEX. Do trudności w ocenie UFC należy zaliczyć możliwość uzyskania nierzetelnych wyników, ze względu na częstą interferencję oznaczeń z innymi lekami/ czy metabolitami glikokortykosteroidów (GCS), jak np. prednizolon, metylprednizolon, spironolakton, DEX, kortyzon, 17-hydroksyprogesteron, czy karbamazepina. Dodatkowo, dużym problemem jest wiarygodność przeprowadzonej zbiórki moczu przez pacjenta, co w oczywisty sposób rzutuje na ostateczny wynik oznaczenia UFC. W przypadku zaburzeń funkcji nerek, z wskaźnikiem filtracji kłębuszkowej (GFR) < 30ml/min., należy uwzględnić możliwość uzyskania wyniku fałszywie ujemnego. Ze względu na powyższe niedogodności, zamiast oceny UFC sugeruje się oznaczenie wskaźnika kortyzol/ kreatynina w pojedynczej próbce moczu (30).

Pomiar HCC wydaje się stanowić dobrą alternatywę dla dotychczas stosowanych oznaczeń laboratoryjnych, przede wszystkim, dzięki zniwelowaniu wahań dobowych wydzielania kortyzolu. Ze względu na przeciętny wzrost włosa 1 cm/miesiąc, uzyskane wyniki odnoszą się do średniego stężenia kortyzolu we krwi w okresie ostatnich tygodni, miesięcy czy lat (w zależności od długości pobranej próbki) (31-33). Obecność kortyzolu w włosach, podobnie jak i innych hormonów steroidowych jest najpewniej wynikiem dyfuzji biernej wolnego kortyzolu z krwi do macierzy włosa w trakcie jego tworzenia w cebulce. Innym możliwym wytłumaczeniem pochodzenia kortyzolu w badanym materiale jest jego obecność w pocie oraz łoju (sebum). Tym samym jego stężenie zależy może od dodatkowych czynników, takich jak płeć (stymulacja wytwarzania potu/ łoju przez androgeny), wiek (wolniejszy wzrost włosa wraz z wiekiem), ewentualne farbowanie włosów (możliwe wypłukiwanie kortyzolu przez stosowane środki chemiczne, interferencja w oznaczeniach), aktywność fizyczna, zwyczaje higieniczne (wpływ częstości mycia włosów), czy ekspozycja na światło słoneczne (11,34-41). Dodatkową korzyścią wynikającą z oceny HCC jest nieinwazyjne pobranie materiału do badań, oraz możliwość jego przechowywania bez obróbki przez dłuższy czas w temperaturze pokojowej.

Oznaczenia HCC najczęściej realizowane są w oparciu o metody immunologiczne, np. test immunoenzymosorbcyjny (ELISA) oraz chromatograficzne, np. chromatografia cieczowa/tandemowa spektrometria mas (LC-MS/MS) (37,42-47). Oznaczenia kortyzolu w włosach zapoczątkował Raul w pracy z 2004 roku (46). Grupa badana liczyła 44 ochotników dobranych na podstawie kwestionariusza. Zakres HCC określono na 5- 91 pg/mg, a oznaczenia wykonano z zastosowaniem LC-MS/MS. Od tego czasu, szereg publikacji dotyczących oznaczeń kortyzolu w włosach oparto w większości na grupie badanej dobranej na podstawie parametrów demograficznych i antropometrycznych (34). Wiarygodność dotychczasowych wyników oznaczeń HCC jest ograniczona, ze względu na heterogenne grupy badane, różną metodologię oznaczeń, ocenę porównawczą bez wstępnej diagnostyki laboratoryjnej w kierunku normokortyzolemii oraz braku powszechnie przyjętych wartości referencyjnych HCC.

CELE PRACY

Celem pierwszego etapu pracy było określenie normy stężenia kortyzolu w włosach w populacji osób zdrowych, poddanych wstępnej diagnostyce w kierunku normokortyzolemii, z wykorzystaniem powszechnie stosowanych badań laboratoryjnych. Aby ocenić normy stężenia kortyzolu w włosach zbadano homogeną grupę pacjentów, dzięki czemu wykluczono szereg czynników wpływających na oś podwzgórzowo-przysadkowo- nadnerczową. Dodatkowo zaprezentowano metodologię pozyskania/ ekstrakcji kortyzolu z włosów przy użyciu łatwo dostępnych odczynników i przyrządów laboratoryjnych.

Celem drugiego etapu była próba oceny ewentualnej korelacji oznaczeń kortyzolu w surowicy, moczu, ślinie oraz włosach. Na tej podstawie poddano dyskusji możliwą przydatność oznaczeń kortyzolu w ślinie i włosach w aspekcie klinicznym.

MATERIAŁ I METODY

Do badania włączono łącznie 138 pacjentów, hospitalizowanych w Klinice Endokrynologii i Chorób Wewnętrznych, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, przyjętych planowo celem oceny hormonalnej przypadkowo wykrytego guza nadnerczy. Wszyscy uczestnicy badania podpisali świadomą zgodę na udział w projekcie. Badanie zostało zaaprobowane przez komisję bioetyczną działającą przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym. Pracę badawczą rozpoczęto w 2016 roku, zakończenie zbierania materiału miało miejsce w 2018 roku.

W ramach pierwszego etapu do badania włączono 88 ochotników, u których na podstawie wywiadu wykluczono stosowanie GCS w okresie poprzedzającego roku oraz choroby mogące mieć wpływ na wyniki oznaczeń, w szczególności: depresję, alkoholizm, ostre/ przewlekłe choroby zapalne oraz jawne enokrynopatie pierwotnie lub wtórnie zaburzające oś HPA. W ramach rutynowej diagnostyki laboratoryjnej wykonano oznaczenie: ACTH w surowicy o godzinie 8.00, kortyzolu w surowicy o godzinie 8.00 (MPC) i 20.00 (EPC), dobowe wydalanie wolnego kortyzolu z moczem (UFC24hr) oraz test hamowania 1mgONDST. W toku dalszej selekcji, do projektu włączono 44 pacjentów, u których stwierdzono prawidłowe stężenie: ACTH (norma: < 46 pg/ml), MPC (norma: 101 - 535 nmol/L), EPC (norma: 79 - 478 nmol/L), zachowany DDC (EPC < MPC o 50% lub więcej), prawidłowe wydalanie UFC24hr (norma: 12- 486 nmol/ 24h) oraz supresją stężenia kortyzolu teście 1mgONDST (norma: < 50 nmol/L). W ten sposób uzyskano jednorodną grupę osób badanych, która została następnie zakwalifikowana do oznaczeń HCC.

Włosy do badania pobierano z okolicy tylnej części szczytu głowy, poprzez odcięcie jałowym skalpelem tuż przy skórze pacjenta, w orientacyjnej ilości 100 - 200 sztuk, w warunkach gabinetu zabiegowego. Tak pobrany materiał zabezpieczono w suchej kopercie do czasu dalszej analizy. Następnie odcięto fragment przy cebulkowy włosów długości 1 cm, po zważeniu do dalszej obróbki użyto 20 mg materiału.

Ocena przed analityczna została wykonana w Zakładzie Żywienia Klinicznego i Dietetyki, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Obróbka włosów przed właściwą analizą polegała na ich umieszczeniu w plastikowym pojemniku o objętości 10 ml i przepłukaniu przy użyciu 2 ml metanolu. Następnie włosy zostały poddane inkubacji w środowisku metanolu w temp. 50 st. C przez 24 godziny, po uprzednim umieszczeniu w pojemniku plastikowym o objętości 5 ml. Kolejnym etapem było zlanie uzyskanego ekstraktu do pojemnika o objętości 3 ml i jego odparowanie. Tak uzyskany materiał został zalany solą fizjologiczną buforowaną fosforanami (PBS) w ilości 250 μ L i pozostawiony przez 1 godzinę przed wykonaniem ostatecznego oznaczenia laboratoryjnego. Oznaczenie każdej próbki wykonano dwukrotnie (dublet oznaczeń).

W ramach oceny statystycznej sporządzono standardowe statystyki opisowe. Zgodność z rozkładem normalnym oceniano poprzez analizę histogramów. Część zmiennych zależnych, przed włączeniem do analiz parametrycznych, zostało poddanych transformacji logarytmicznej. Analizie poddano średnią arytmetyczną HCC z dwóch oznaczeń. Wyniki oznaczeń HCC zostały przedstawione jako ilość kortyzolu w przeliczeniu na 1 mg włosów (pg/mg), zależnie od stężenia kortyzolu w analizowanej objętości roztworu (250 μ L) i

inkubowanego materiału (20 mg). Porównania w podgrupach oceniano przy użyciu testu t Studenta lub testu U Manna-Whitneya. Do oceny związku pomiędzy wiekiem a HCC wykorzystano regresję wieloczynnikową (ogólny model liniowy). Oceniany model uwzględniał także płeć oraz interakcję pomiędzy wiekiem a płcią. Za istotne statystycznie przyjęto wartości współczynnika $p < 0.05$. Wszystkie obliczenia i ryciny do publikacji sporządzono przy pomocy komputera osobistego oraz pakietu statystycznego STATA w wersji 13.1 (StataCorp, Texas, USA).

W drugim etapie do badania włączono 50 ochotników z negatywnym wywiadem w kierunku endokrynopatii skutkujących zaburzeniami osi HPA. Dodatkowo, na podstawie wywiadu, podobnie jak w pierwszym etapie, z badania wykluczono wszystkich pacjentów leczonych GCS z jakiegokolwiek przyczyny w okresie ostatniego roku. W ramach oceny laboratoryjnej pobrano tego samego dnia krew o godzinie 8.00 i 20.00, celem wykonania oznaczeń MPC oraz EPC. Ponadto, zrealizowano pod nadzorem medycznym zbiórkę moczu na UFC24hr. Pozyskane próbki krwi oraz moczu zostały przekazane niezwłocznie do laboratorium celem wykonania oznaczeń. Pobranie śliny dokonano przy użyciu dedykowanego zestawu oraz zgodnie z zasadami właściwego pobrania materiału o godzinie 20.00 (EFSC). Tak uzyskany materiał zamrożono w temperaturze -32 st. C i przechowano do czasu wykonania oznaczeń. Po zabezpieczeniu materiału na MPC, EPC, UFC24hr i EFSC, jako wykluczający udział w badaniu, wykonano test przesiewowy w kierunku hiperkortyzolemii (1mgONDST). Ostatecznie do badania włączono 41 ochotników, u których stężenie kortyzolu w teście z 1mgONDST określono na < 50 nmol/l, a pozostałe wyniki oznaczeń laboratoryjnych kortyzolu w krwi i moczu mieściły się w granicach normy. Wartości referencyjne poszczególnych oznaczeń oraz technika pobrania próbki włosów i ekstrakcji kortyzolu była identyczna jak w 1 etapie. Oznaczenia kortyzolu w ślinie i włosach wykonano dwukrotnie, a obliczeniom poddano średnią wartość uzyskanych wyników.

Celem unifikacji uzyskanych wyników, w odróżnieniu od pierwszego etapu pracy, wszystkie oznaczenia zostały przedstawione w formacie SI.

W ramach analizy statystycznej, przeprowadzono ocenę zgodności z rozkładem normalnym przy użyciu wzrokowej oceny wykresów kwantyl-kwantyl. Sporządzono rutynowe statystyki opisowe zmiennych. Porównania między-grupowe dokonano z użyciem testu t Studenta lub testu U Manna-Whitneya. Korelacje oceniano metodą rang Spearmana (ρ). W celu przeprowadzenia analizy wieloczynnikowej dopasowano ogólny model liniowy. Niektóre zmienne poddano transformacji przed włączeniem do tego modelu. Za poziom istotności statystycznej przyjęto $p < 0.05$. Ze względu na eksploracyjny charakter pracy nie stosowano

korekt na porównania wielokrotne. Czyszczenie danych, analizę, ryciny do publikacji wykonano przy użyciu komputera osobistego i oprogramowania RStudio (RStudio Inc., Boston, USA, ver. 1.2.1335).

Wszystkie oznaczenia laboratoryjne zostały wykonane w Centralnym Laboratorium Klinicznym, Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Gdańsku. Do oznaczeń MPC, EPC, 1mgONDST, EFSC i HCC użyto komercyjnych zestawów ELISA o oznaczeniu RE52611 (Cortisol IBL International, Hamburg, Germany). Zgodnie z informacją producenta reakcję krzyżową określono na 30% dla prednizonu, 7% dla 11- deoksy- kortyzolu, 4.2% dla kortyzonu, 2.5% dla prednizonu, 1.4% dla kortykosteronu, oraz < 1% dla pozostałych zbadanych substancji. Granica wykrywalności użytego zestawu wynosi 0.138 nmol/L, przy czułości analitycznej wyznaczonej na poziomie 0.828 nmol/L. Powtarzalność i odtwarzalność wyników pomiaru określono odpowiednio na 7.3% dla stężeń 7,452 nmol/L i 8.8% dla stężeń 14,904 nmol/L (ślina) oraz 9.9% dla stężeń 49,68 nmol/L ug/dl i 20% dla stężeń 41,4 nmol/L (surowica). Oznaczenia UFC24hr wykonano dedykowanym zestawem tego samego producenta o oznaczeniu RE52241. Reakcję krzyżową określono na 18.7% dla 11- alfa dezoksykortyzolu, 10.8% dla kortyzonu, 2.4% dla kortykosteronu oraz < 0.1% dla pozostałych oznaczonych substancji. Deklarowana powtarzalność wynosi 7%, a odtwarzalność wyników oznaczeń <9%.

OMÓWIENIE WYNIKÓW PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY

Publikacja pt. ``Cushing's syndrome due to ectopic ACTH secretion``

W powyższej pracy pogładowej przedstawiono szereg trudności diagnostycznych jakie mogą mieć miejsce w diagnostyce endogennej hiperkortyzolemii. Szczegółowo omówiono rutynowo wykonywane badania laboratoryjne, których mnogość wynika z charakterystyki opisaney endokrynopatii. Celem poszerzenia wiedzy i możliwości diagnostycznych, zaproponowano poniższe prace oryginalne, które uwzględniły nowe oznaczenia kortyzolu w polskiej populacji. W dalszej części przedstawiono krótkie streszczenie omawianej pracy.

Zespół objawów klinicznych: podmiotowych i przedmiotowych, które wynikają z hiperkortyzolemii określa się mianem zespołu Cushinga. Nadmiar kortyzolu w organizmie może mieć źródło egzo lub endogenne. Powszechnie uważa się, że najczęstszą przyczyną jest terapia GCS w dawkach farmakologicznych, większych niż substytucyjne, z powodu różnych chorób, na przykład tkanki łącznej. Jedną z możliwych przyczyn zespołu Cushinga jest ektopowe, czyli poza przysadkowe wydzielanie ACTH, przez nowotwór łagodny lub złośliwy.

Od czasu pierwszego opisu w 1963 roku, etiologia ektopowego wydzielania ACTH uległa istotnej zmianie, poza drobnokomórkowym rakiem płuca opisano inne nowotwory, których częstość znacząco wzrosła. Symptomatologia zespołu Cushinga w przebiegu ektopowego wydzielania ACTH najczęściej odpowiada objawom hiperkortyzolemii spotykanym u chorych z powodu innej przyczyny. Podejrzenie kliniczne zespołu Cushinga wymaga weryfikacji laboratoryjnej. Nie ma swoistego, pojedynczego badania, które by potwierdziło zespół Cushinga w przebiegu ektopowego wydzielania ACTH, z tego względu należy posiłkować się szeregiem testów. Połączenie wielu badań laboratoryjnych, w tym inwazyjnych, sprawia, że czułość rozpoznania ektopowego wydzielania ACTH sięgnąć może 100%, przy swoistości 98%. W przypadku lokalizacji ogniska pierwotnego leczenie operacyjne jest postępowaniem optymalnym. Radykalne leczenie można zastosować u 40% chorych, z czego około 80% udaje się wyleczyć.

Publikacja pt. ``Hair cortisol concentration in a population without hypothalamic-pituitary-adrenal axis disorders``

Wielkość populacji, dane demograficzne i oceniane parametry osi HPA przedstawiono w Tabeli 1. Z ocenianych parametrów, DDC był statystycznie niższy u kobiet niż u mężczyzn ($p = 0,031$). Uważamy jednak, że ta różnica nie jest istotna klinicznie. Nie stwierdziliśmy istotnych statystycznie różnic między innymi ocenianymi zmiennymi, takimi jak MPC, EPC, UFC24hr, czy 1mgONDST. Wyniki oznaczeń HCC mieściły się w zakresie od 2 pg/mg do 51,63 pg/mg, przy wartości średniej określonej na 7,73 pg/mg. Różnica w HCC między mężczyznami i kobietami była nieistotna statystycznie ($p = 0,767$). Szczegółowa charakterystyka wyników HCC przedstawiono w Tabeli 2. Przeanalizowaliśmy również związek między wiekiem a HCC. Współczynnik regresji liniowej dla wieku nie był istotny statystycznie ($p = 0,847$). Podobnie współczynniki regresji dla płci oraz dla płci i wieku również nie były istotne statystycznie ($p = 0,815$). Uważamy ponadto, że wyższe maksymalne HCC u kobiet ($n=31$, HCC= 51,63 pg/mg) w porównaniu z mężczyznami ($n=13$, HCC= 17,06 pg/mg) jest najpewniej wynikiem zbyt małej populacji mężczyzn i nie wynika z innych czynników. Większość opublikowanych prac nie wskazuje na różnicę w HCC u kobiet i mężczyzn.

Oznaczenie HCC jest procesem wieloetapowym, począwszy od właściwego pobrania próbki włosów, następnie ekstrakcji kortyzolu na etapie przed analitycznym, a ostateczną oceną laboratoryjną przy użyciu jednej z referencyjnych metod. Każdy z wymienionych etapów ma istotny wpływ na wynik końcowy, z tego względu poszczególne fazy, biorąc pod uwagę

dostępne piśmiennictwo poddano licznym analizom. Wybór ilości włosów pobranych od osoby badanej w niniejszej pracy w głównej mierze był wynikiem kompromisu pomiędzy potrzebą pozyskania jak największej ilości materiału, a względami estetycznymi, szczególnie wśród populacji żeńskiej. W dostępnych opracowaniach, ilość materiału poddanego analizie waha się w przedziale od 2.5 mg do 150 mg, za najczęściej badaną próbkę uznaje się 10- 20 mg (6,7,43,44,48). Za optymalną lokalizację do pobrania włosów przyjmuje się tylną część szczytu głowy, ze względu na możliwą osobniczą zmienność stężenia oznaczanej substancji dochodzącą do 24% w zależności od miejsca pobrania próbki, co wykazano w przypadku oznaczeń leków/ ksenobiotyków (49). Inkubacja pobranych włosów w całości (fragmenty 1cm), w porównaniu do włosów poddanych wstępnej obróbce mechanicznej (sproszkowanie) w młynkach laboratoryjnych, paradoksalnie skutkuje uzyskaniem większych stężeń kortyzolu, co wykazano w jednej z prac opisującej metodologię oznaczeń HCC (50). Innym istotnym zagadnieniem jest określenie stopnia ekstrakcji kortyzolu z pobranych próbek włosów. W jednej z prac wykazano, że ilość kortyzolu uzyskanego po inkubacji w środowisku metanolu, wynosi mniej niż 100% (stopień odzysku), w porównaniu do bardziej skomplikowanej metody przy użyciu metanolu i acetonu (50). Nie mniej, większość publikacji wskazuje na metanol jako referencyjne środowisko do oznaczeń HCC (4,34,51). Wybór metody oznaczeń, wskazuje na przewagę metody immunologicznej (ELISA) w zakresie czułości uzyskanych wyników, co przy powszechnej dostępności tej metody i łatwości jej realizacji, czyni ją szczególnie przydatną (50,52). Niezależnie, wykazano bardzo dobrą korelację samych oznaczeń kortyzolu we włosach, pomiędzy różnymi laboratoriami, zarówno metodą ELISA oraz LC-MS/MS (52).

W przeciwieństwie do dotychczas przeprowadzanych badań, za unikalne w przedstawionej pracy należy uznać charakterystykę grupy badanej. Dzięki wielu oznaczeniom laboratoryjnym wykonanym na etapie kwalifikacji, uzyskano homogenną grupę osób z normokortyzolemią. Tym samym wpływ parametrów antropometrycznych i demograficznych (np. płeć, waga, kolor włosów, rasa) na oś HPA został istotnie ograniczony. Efektem tego było zmniejszenie liczebności grupy badanej z wyjściowo 88 ochotników, z których ostatecznie do oznaczeń HCC zakwalifikowano 44 (najczęstszą przyczyną wykluczenia było nieprawidłowe DCC i 1mgONDST).

Publikacja pt. ``Corellation analysis of cortisol concentration in hair versus concentrations in serum, saliva and urine``

Wyniki poszczególnych oznaczeń wśród zbadanych 41 ochotników miały rozkład normalny dla: wieku (p- 0.5999), MPC (p- 0.3008), EPC (p- 0.3725), UFC24hr (p- 0.6905) oraz rozkład inny niż normalny dla: ACTH (p- 0.1217), 1mgONDST (p- 0.2741), EFSC (p- 0.9886), HCC (p- 0.1873). Charakterystykę zbiorczą grupy badanej przedstawiono w Tabeli 2. Zgodnie z analizą korelacji Spearmana nie stwierdzono istotnych zależności pomiędzy ocenianymi parametrami, a uzyskane wyniki wynoszą odpowiednio: HCC vs ESC ($\rho=0.1005$, $p=0.532$), HCC vs MPC ($\rho=0.04419$, $p=0.7838$), HCC vs EPC ($\rho=-0.2071$, $p=0.1938$), HCC vs UFC24hr ($\rho=0.1793$, $p=0.262$). W celu przeprowadzenia analizy wieloczynnikowej dopasowano ogólny model liniowy. Zmienną zależną było stężenie kortyzolu we włosach. Zmienne niezależne do modelu dobierano metodą krokową na podstawie kryterium informacyjne Akaikego (AIC). Nie udało się dopasować istotnego statystycznie modelu regresji liniowej.

Wyniki naszej pracy nie wskazują na istotną korelację pomiędzy poszczególnymi oznaczeniami. Biorąc pod uwagę dostępne piśmiennictwo, najczęściej porównywane jest oznaczenie kortyzolu w surowicy z śliną i moczem. Szereg prac wskazuje na silną zależność pomiędzy kortyzolem w surowicy (w naszym badaniu zdefiniowane jako MPC oraz EPC), a oznaczeniem kortyzolu w ślinie (w naszym badaniu EFSC), m.in. dzięki symultanicznej zależności wydzielania kortyzolu do krwi przez nadnercza i kortyzolu z krwi do śliny (22,53-57). Z drugiej strony, w pracach poświęconych badaniom u ludzi, korelacje oznaczeń kortyzolu w włosach z innymi zmiennymi można ocenić na słabe lub ewentualnie umiarkowane (58,59). Ze względu na główny mechanizm obecności kortyzolu w włosach (dyfuzja bierna wolnego kortyzolu z krwi), w teorii dobre korelacje powinny dotyczyć oznaczeń frakcji wolnych. W zależności od publikacji, istotną statystycznie korelację wykazano m.in. dla HCC i UFC oraz HCC i SFC (48,58-61). Uzyskane wyniki w niniejszej pracy są z kolei zgodne z szeregiem innych prac oceniających zależności pomiędzy HCC, a przygodnym stężeniem kortyzolu w ślinie i surowicy (48,61,62).

W opinii autora pomimo postępu medycznego, diagnostyka laboratoryjna, w tym oznaczenia kortyzolu, stanowią ułomną próbę przeniesienia skomplikowanych procesów biologicznych *in vivo* na relatywnie proste modele matematyczne/ statystyczne oparte na badaniach *in vitro*. Efektem tego jest mnogość oznaczeń kortyzolu w różnych materiałach biologicznych oraz szereg testów dynamicznych wykorzystywanych w diagnostyce, np. endogennej hiperkortyzolemii. Stanowi to swoisty ewenement w diagnostyce zaburzeń endokrynologicznych. Przyczyn tego problemu oczywiście jest wiele.

Jak wiadomo, kortyzol wydzielany jest w sposób pulsacyjny, podlega rytmom dobowym, ujemne i dodatnie sprzężenia zwrotne zależą od czynników wprost nie związanych z funkcjami biologicznym człowieka, a liczne warianty genetyczne określające wrażliwość receptora na kortyzol warunkują osobniczą zmienność uzyskanych wyników liczbowych i stanu klinicznego pacjenta (22). Efektem tego może być błędna interpretacja wykonanych oznaczeń i nieprawidłowa diagnoza (3,24). Kolejny problem to szereg możliwych błędów przedanalitycznych, które w mniejszym lub większym stopniu wpływają na ostateczny wynik, szczególnie w przypadku bardziej złożonych oznaczeń, np. HCC. W opinii autora ten element może skutkować powstaniem istotnych nieprawidłowości, a jednocześnie utrudniać szersze rozpowszechnienie oznaczeń HCC. Kolejnym problemem podnoszonym przez wielu autorów jest brak dostatecznej walidacji badań poświęconych ocenie korelacji HCC z innymi oznaczeniami kortyzolu, ze względu na małą liczbę badań, analizę modeli zwierzęcych, najczęściej porównanie HCC w grupie o spodziewanym niskim i wysokim stężeniu kortyzolu, brak odniesienia klinicznego oraz wykorzystanie oznaczeń o niskiej czułości (48,63,64).

W odróżnieniu od większości prac, przedstawiony protokół kwalifikacji ochotników do badania oparty jest, podobnie jak w wcześniej omawianej publikacji, na wstępnej ocenie stężenia kortyzolu w rutynowo wykonywanych oznaczeniach laboratoryjnych śliny, krwi i moczu. Dzięki temu wyeliminowano szereg czynników zewnętrznych mających wpływ na oś HPA takich jak status socjalno-bytowy, parametry antropometryczne, czy stan emocjonalny (65-68). Wpływ wymienionych czynników jest niepodważalny, a ich realne uwzględnienie w interpretacji wyników trudne (69). Nie mniej, zrealizowane w niniejszej pracy oznaczenia dotyczą różnych przedziałów czasowych: minuty/ godziny (krew, ślina), godziny/ dni (mocz), dni/miesiące (włosy), co w naturalny sposób może nie odzwierciedlać zmienność stężenia/iłości kortyzolu w organizmie człowieka. Z tego względu, w ramach kwalifikacji uwzględniono stan kliniczny pacjenta (wywiad) w okresie ostatniego 1 roku przed włączeniem do badania.

Wybór metody oznaczeń laboratoryjnych w niniejszej pracy, w głównej mierze podyktowany był łatwością, dostępnością i kosztem jej wykonania (ELISA versus LC-MS/MS). Dodatkowo, oznaczenie kortyzolu w ślinie w godzinach wieczornych było podyktowane brakiem oceny tego parametru w dostępnym piśmiennictwie w chwili zbierania materiału.

WNIOSKI

Wyniki badania wskazują na możliwość wykonania oznaczeń kortyzolu w włosach u wszystkich pacjentów, pod warunkiem uzyskania odpowiedniej ilości materiału. Ekstrakcja kortyzolu z włosów w środowisku metanolu jest łatwa do realizacji w pracowni wyposażonej w podstawowy sprzęt. Dostępne komercyjnie zestawy ELISA charakteryzują się wysoką czułością i swoistością, mimo niskiego progu detekcji kortyzolu w badanym materiale.

Oznaczenia kortyzolu w przedstawionej pracy, zostały wykonane u ochotników bez zaburzeń osi HPA, co zweryfikowano wykonując wcześniej odpowiednie badania laboratoryjne rutynowo wykonywane w praktyce klinicznej. Tym samym, badana grupa choć nieliczna, była homogenna pod względem statusu hormonalnego. Norma stężenia kortyzolu w włosach w moich badaniach została określona na 2 pg/mg do 51,63 pg/mg. Przedstawione wyniki można uznać za punkt odniesienia do przeprowadzenia dalszych badań u chorych z nad i niedoczynnością kory nadnerczy.

Uważamy, że jeśli korelacja oznaczeń kortyzolu w surowicy, moczu i ślinie, a w włosach miała by być silna, to pomimo małej liczebności grupy, uzyskane wyniki wskazałyby na taką zależność. Nie mniej, wyniki naszej pracy nie wskazały na istotną statystycznie korelację pomiędzy HCC vs MPC, EPC, UFC i EFSC w grupie pacjentów bez zaburzeń w osi HPA. Praca ta, ze względu na porównanie w jednej publikacji wyników oznaczeń kortyzolu w włosach, ślinie, krwi oraz w moczu może zostać również uznana za unikalną.

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

INTRODUCTION

Routine endocrine diagnostics for patients with hypothalamic–pituitary–adrenal axis (HPA) disorders include series of blood, urine, and saliva tests. These include diurnal decrease of serum cortisol (DDC), urine free cortisol (UFC), saliva cortisol, and several hormonal dynamic tests using stimulation, such as the corticotropin releasing hormone (CRH) stimulation test, or inhibition, e.g. the low/high dose dexamethasone (DEX) suppression test. Numerous methods of cortisol assessment come from the necessity of collecting reliable results that correlate with a clinical picture. Their interpretation is often impeded due to the variation in the method of determination, environmental factors, physiological variations in cortisol levels, drugs/xenobiotics in the tested sample, and pathological conditions secondarily affecting the

HPA axis. For this reason, there is no single test that will produce a credible result, and therefore, at least a few of these must be performed to provide the basis for a proper diagnosis (1-3).

Publications related to hair cortisol concentrations (HCC) mainly refer to non-primary endocrine disorders, including depressive-anxiety disorders, stressful events, shift work, physical exertion, alcohol abuse, smoking, chronic illnesses, or doping control (4-12). Among the most relevant endocrine disorders in the context of HCC assays, Cushing's syndrome, Cushing's subclinical syndrome, Addison's disease, secondary adrenal insufficiency, and cortisol/hydrocortisone substitution should be listed (13-20).

Cortisol concentration is routinely measured in blood, urine, and saliva samples. It has been recently showed that cortisol could be also detected in hair samples. Cortisol measurements in different samples have their own individual characteristics and clinical utility.

The determination of serum cortisol mostly refers to its total fraction (serum total cortisol, STC), including cortisol bound to plasma proteins like transcortin (cortisol binding globulin, CBG), but also to sex hormone binding globulin (SHBG) and albumin (21,22). Hence, non-primary HPA- related factors may influence the laboratory measurements. Oral contraception, pregnancy or hyperthyroidism increase STC level (false positive results), while significant hypoalbuminaemia <25 g/dl lowers STC concentration (false negative results) (21-24). Serum free cortisol (SFC) measurement is not routinely performed. It is assumed that SFC constitutes about 3-5% of the total cortisol fraction (23). Serum cortisol levels are tested in the morning, evening and night hours, in order to assess DDC. The absence of circadian cortisol rhythm is one of the first manifestations of endogenous hypercortisolemia. Therefore, circadian cortisol measurement is one of the first line tests in the HPA disorders assessment. However, determination of cortisol concentrations at night might be difficult for outpatient departments due to work hours of laboratories. Serum cortisol is also assessed in dexamethasone suppression test, Synacthen stimulation test, CRH or vasopresin stimulation tests used in the diagnosis and differentiation of cortisol level disorders (3,24,25).

The determination of cortisol in saliva reflects its free fraction (free salivary cortisol, FSC), because its presence in saliva is the result of passive diffusion of SFC from the blood into saliva. Same amount of cortisol is converted to cortisone in the salivary glands by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 β HSD2). Therefore, FSC concentrations are lower than serum cortisol. It is assumed that FSC constitutes about 50-70% of SFC (26). A saliva sample collection is stress free non-invasive procedure, it does not require the involvement of medical personnel, hence, it is cost effective and minimizes the impact of stress-induced

hypercortisolemia related to hospitalization and invasive derivation of blood samples. Furthermore, cortisol in saliva is stable at room temperature for up to 7 days, which allows to take a sample at any time of the day and night. This in turn allows to easily analyzing the circadian rhythm of cortisol. All this makes the assessment of cortisol in saliva as a very good screening test for cortisol level deviation (27-28).

In the past, UFC was recognized as the main test (gold standard) in cortisol secretion disorder assessment. Currently it is used as a complementary assay. Similar to salivary cortisol, UFC concentrations are also significantly reduced due to the renal activity of 11 β HSD2 (29). Difficulties in assessing UFC include frequent interference of determinations with drugs or glucocorticosteroids (GCS) metabolites, such as prednisolone, methylprednisolone, spironolactone, dexamethasone, cortisone, 17-hydroxyprogesterone, or carbamazepine. In addition, patients' self-urine collection is not always properly performed, which in turn might affect UFC results. In patients with renal failure (the glomerular filtration rate (GFR) <30ml/min), it is possible to obtain false negative results. Due to these disadvantages, instead of UFC assessment it has been suggested to measure the cortisol:creatinine ratio in a single urine sample (30).

Measurement of the HCC seems to be a good alternative to the laboratory tests used thus far, primarily by being independent of the circadian rhythm of cortisol. Due to the average hair growth of 1 cm per month, the results are related to the average blood cortisol levels over the past weeks, months or years depending on the length of a hair sample (31-33).

The presence of cortisol in hair, as well as other steroid hormones, is most probably a result of the passive diffusion of free cortisol from blood to the hair matrix during its formation in a hair follicle. Another possible explanation for the presence of cortisol in hair is its presence in sweat and sebum. Hence, its concentration may depend on additional factors such as gender (stimulation of sweat and sebum production by androgens), age (slower hair growth with age), hair dyeing (possible flushing out of cortisol by chemicals, interference with a HCC assay), physical activity, hygienic habits (influence of hair wash frequency), or exposure to sunlight (11, 34-41). The additional benefits of the HCC assessment are its non-invasive sample collection procedure, and the possibility of sample storage at room temperature for a longer period of time, without prior processing.

Hair cortisol concentration measurement is most often based on immunological methods, such as the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or the liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (37, 42-47). The measurements of HCC in humans were initiated by Raul in 2004 (46). The analyzed population in his study

consisted of 44 volunteers recruited based on a questionnaire. The cortisol amount in the samples was from 5 to 91 pg/mg, and the HCC measurement was done by chromatography. Since the first report, a number of publications analyzing the HCC measurement have taken into account the different populations of subjects that were recruited based on demographic and anthropometric factors (34). The reliability of the HCC measurement is limited due to the heterogeneity of analyzed populations, various methodologies of assays, comparative assessment without initial laboratory diagnostics regarding blood cortisol concentrations, and the lack of commonly accepted HCC reference values.

AIMS OF THE STUDY

The aim of the first stage of study is an attempt to determine the hair cortisol norm in the population of healthy people undergoing initial diagnosis for normocortisolemia with the commonly used laboratory tests. In order to assess reference ranges of hair cortisol concentration, the homogeneous group of patients without HPA axis disorders was proposed. Additionally, we presented the methodology of obtaining and extracting cortisol from hairs taking commonly available laboratory techniques.

The aim of the second stage of the study was to investigate the correlation between hair cortisol concentrations and standard cortisol measurements. On this basis, the possible usefulness of cortisol determinations in saliva and hairs in clinical practice was discussed.

MATERIALS AND METHODS

We included 138 patients that were hospitalized in the Department of Endocrinology and Internal Medicine, Medical University of Gdansk for the evaluation of hormone levels in the course of an incidental adrenal tumor. All participants signed a written informed consent to participate in the study. The study was approved by the Bioethical Committee of the Medical University of Gdansk. The enrollment into the project was performed from 2016 till 2018 year.

As part of the first stage of the study, we included 88 volunteers. Due to protocol, we excluded patients taking GCS during the preceding year and those with conditions likely to affect the results of the tests, in particular: depression, alcoholism, acute/chronic inflammatory disease, and primary or secondary HPA disorders. The routine diagnostic protocol consisted of the measurement of: morning plasma ACTH at 8 a.m., morning plasma cortisol (MPC) at 8 a.m., evening plasma cortisol (EPC) at 8 p.m., 24 hour urinary free cortisol excretion

(UFC24hr), and the 1 mg overnight dexamethasone suppression test (1mgONDST). In the final selection process, 44 patients were enrolled in the study, all with reference levels of: ACTH (reference: <46 pg/ml), MPC (reference: 101-535 nmol/l), EPC (reference: 79-478 nmol/l), UFC24hr (reference: 12-486 nmol/24hr), a regular DDC (reference: EPC<MPC more than 50%), and proper suppression of cortisol after 1mgONDST (reference: <50 nmol/l).

A hair sample was collected in the examination room from the posterior vertex area of the head by using a sterile scalpel to cut as close as possible to the scalp for an approximate quantity of 100-200 hair strands. The obtained sample was stored in a dry envelope until further analysis. Next, 1 cm segments of the hair strands were cut away near their follicles, and following weighing, exactly 20 mg of the sample was used in the study. The preparation of the hair samples was performed at the Department of Clinical Nutrition and Dietetics, Medical University of Gdansk. First, the hair samples were placed into a 10 ml plastic tube, and flushed with 2 ml of methanol. Next, they were transferred into 5 ml tubes and incubated at 50°C in 1 ml of methanol for 24 hours. The extract was then transferred into a 3 ml tube, after which it was evaporated. Finally, the residue was dissolved in 250 µL of phosphate buffered saline (PBS) by incubation for 1 hour. For each sample, the cortisol concentration was measured twice, and the average value was used in the statistical analysis.

Standard descriptive statistics were prepared. Conformity to a normal distribution was assessed by a histogram analysis. Some of the dependent variables underwent a logarithmic transformation before they were included in the parametric analysis. The arithmetic mean of the two HCC assessments was analyzed. The results of HCC are presented as pg/mg according to the cortisol concentration in the analyzed volume of the solution (250 µL) based on the amount of incubated hair (20 mg). Comparisons in subgroups were evaluated using the t-test or the Mann-Whitney U test. The multivariate regression (general linear) analysis was used to evaluate the relationship between age and the HCC. The regression model also included gender and analyzed the interaction between age and sex. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. All calculations and figures were made using a personal computer and the STATA Statistical Package 13.1 (StataCorp, Texas, USA).

As part of the second stage of the study, fifty adult volunteers with a negative history of endocrine disorders were enrolled into the study. Subjects treated with GCS over the past year prior to the enrollment were excluded from the study. Whole blood (3 ml) was collected at 8.00 a.m. and 8:00 p.m. the same day to assess MSC and evening ESC, respectively. In order to assess the daily excretion of UFC, 24 h urine collection under medical supervision was done, and 5 ml of urine sample was immediately sent for analysis. Saliva collection was carried out

using a dedicated kit at 8 p.m. (evening free saliva cortisol, EFSC). The obtained material was frozen at -32°C and stored for further analysis. After collecting samples for MSC, ESC, UFC24hr, and EFSC, 1mgONDST was performed. Eventually, 41 volunteers were included into the study, whose cortisol concentration in the 1mgONDST were $<50\text{ nmol/l}$, and cortisol levels in serum, saliva and urine were within reference ranges. The technique of hair sampling and cortisol extraction as well as reference values of determinations were identical to those in the 1st stage. Cortisol measurements in saliva and hair were done twice and arithmetic average values were used in statistical analysis. In order to unify the obtained results, the HCC values and others determination were presented in SI format.

The assessment of variable distribution was performed by using the quantile-quantile plots. The t-test and the Mann-Whitney U test were used for comparisons between subgroups. Correlations were analyzed by the Spearman test. The general linear model was fitted to perform multivariate analysis. Some variables were transformed before inclusion into the linear model. Values of $p<0.05$ were considered to be statistically significant. R Studio software (RStudio Inc., Boston, USA, ver. 1.2.1335) was employed for the statistical analysis.

All cortisol assessments were performed in the Central Clinical Laboratory of the Medical University of Gdansk, Poland. Commercial ELISA kit (IBL International GmbH, Hamburg, Germany, catalog number RE 52611) was used for the MSC, ESC, EFSC and HCC measurements. According to the manufacturer's data, cross-reactivity was determined to be 30% for prednisolone, 7% for 11-desoxycortisol, 4.2% for cortisone, 2.5% for prednisone, 1.4% for corticosterone, and $<1\%$ for other test substances. The detection threshold was set at 0.138 nmol/l , with functional sensitivity set at 0.828 nmol/l . The intra and interassay coefficient of variation was determined at 7.3% for concentrations 7.452 nmol/l and 8.8% for concentrations 14.904 nmol/l (saliva), and 9.9% for concentrations 49.68 nmol/l and 20% for concentrations 41.4 nmol/l (serum). UFC determinations were made with the set from the same manufacturer (IBL International GmbH, Hamburg, Germany, catalog number RE52241). In UFC measurements, cross-reactivity was determined at 18.7% for 11-alpha-desoxycortisol, 10.8% for cortisone, 2.4% for corticosterone and $<0.1\%$ for the other substances. The declared intra assay variation was 7%, and inter assay variation $<9\%$.

DISCUSSION OF PUBLICATION RESULTS INCLUDED IN THE DISSERTATION

Publication titled ``Cushing's syndrome due to ectopic ACTH secretion``

A review of ``Cushing's syndrome due to ectopic ACTH secretion`` presents a number of diagnostic difficulties that may occur in the diagnosis of endogenous hypercortisolemia. Routine laboratory tests, the multitude of which are due to the characteristics of the described endocrinopathy, are discussed in detail. In order to broaden the knowledge and diagnostic possibilities, the following original papers were proposed, which included a new cortisol determinations in the Polish population. Summary of the article is presented below.

Cushing's syndrome is defined as a constellation of clinical signs and symptoms occurring due to hypercortisolism. Cortisol excess may be endogenous or exogenous. The most common cause of Cushing's syndrome is GCS therapy with supraphysiological (higher than in the case of substitution) doses used in various diseases (e.g. autoimmune). One possible Cushing's syndrome cause is ectopic (extra-pituitary) ACTH secretion by benign or malignant tumours. Since its first description in 1963, aetiology has changed, i.e. as well as small cell lung cancer, higher incidence in other malignancies has been reported. Ectopic ACTH secretion symptoms are usually similar to hypercortisolism symptoms due to other causes. A clinical suspicion of Cushing's syndrome requires laboratory investigations. There is no single and specific laboratory test for making a Cushing's syndrome diagnosis, and therefore multiple dynamic tests should be ordered. A combination of multiple laboratory noninvasive and invasive tests gives 100% sensitivity and 98% specificity for EAS diagnosis. If the EAS is caused by localised malignancy, surgery is the optimal treatment choice. Radical tumour excision may be performed in 40% of patients, and 80% of them are cured of the disease.

Publication titled ``Hair cortisol concentration in a population without hypothalamic-pituitary-adrenal axis disorders``

The size of the population, demographic data, and evaluated parameters of the pituitary adrenal axis are presented in Table 1. The diurnal decrease in cortisol levels was significantly lower in females than in males ($p=0.031$). However, we consider that difference not to be clinically significant. There were no statistically significant differences between the other variables. The results of HCC ranged from 2 pg/mg up to 51.63 pg/mg. The difference in the

HCC between males and females was not statistically significant ($p=0.767$). The detailed characteristics of the the HCC results are presented in Table 2. We also analyzed the relationship between age and the HCC. The linear regression coefficient for age was not significant ($p=0.847$). Regression coefficients for gender, and gender and age interactions were also not statistically significant ($p=0.815$). We believe that higher maximal HCC in females ($n=31$, $HCC=51.63$ pg/mg) vs. males ($n=13$, $HCC=17.06$ pg/mg) is possibly be due to a small male population tested and it is not related to other factors. Most of the studies exclude sex as potential confounding factor in the adults participants.

Hair cortisol concentration assessment is a multistep process, starting with proper hair sampling, followed by extraction of cortisol at the pre-analytical stage and final laboratory evaluation using one of the reference methods. Each of these steps may have a significant impact on the final result. Hence, the various phases of the HCC assessment have been subjected to evaluation in numerous studies. In our study, the number of collected hair strands from a given individual was greatly a result of a compromise between the need to obtain as much material as possible and aesthetical issues, especially among the female population. In most of the studies, the amount of analyzed hair sample ranges from 2.5 mg to 150 mg, with the most widely used amount of 10-20 mg (6,7,43,44,48). The optimum site for hair sampling is the vertex posterior area of the head due to the possible individual variation of the cortisol concentration reaching up to 24% depending on the site of collection as demonstrated by drugs and xenobiotics studies (49). Incubation of a total hair sample (1cm fragments), compared to milled hair paradoxically results in higher cortisol concentrations as shown in one of the works describing HCC methodology (50). The extraction of cortisol by using a methanol solution is one of the most commonly used methods (4,34,51). Analyses of various methods of the HCC determination indicate the advantage of the ELISA in regard to the sensitivity of the cortisol measurement (50,52). This assay is very useful due to its widespread availability as well as its ease of implementation. The correlation between HCC measurement with ELISA and LC-MS/MS in inter-laboratory comparisons have been found to be strong (52). The essential problem in the HCC analysis is to determinate the degree of cortisol extraction from hair sample. Generally, we assumed close to 100% cortisol recovery by methanol extraction, which might not to be fully true based on the latest reports. One of the publications has demonstrated higher extraction efficiency by methanol and acetone over methanol alone (50). However, most of the published works used cortisol extraction by methanol as a reference method.

Unlike previous studies, our work focus on the deep characteristics of the examined population. The recruited volunteers may be regarded as a reference group because of the

extensive screening for regular levels of cortisol. Thanks to the recruitment protocol, the impact of anthropometric and demographic parameters possibly affecting the HPA axis during hair collection (e.g. sex, body weight, hair color, race) has largely been excluded. The issues outlined in Material and methods section meant that only 44 patients out of 88 met the final inclusion criteria based on the study protocol (incorrect DDC and 1mg ONDST were the most common reasons for exclusion). An interview that excluded the enrollment of patients with primary or secondary HPA disorders in the period >1 year prior to sampling further strengthens our results since analyzed hair samples reflected an average cortisol concentration of past month only.

Publication titled ``Corellation analysis of cortisol concentration in hair versus concentrations in serum, saliva and urine``

The values had a normal distribution for: age ($p=0.5999$), MSC ($p=0.3008$), ESC ($p=0.3725$), and UFC24hr ($p=0.6905$). A non-normal distribution was detected for: 1mgONDST ($p=0.2741$), EFSC ($p=0.9886$), and HCC ($p=0.1873$). HCC ranged from 0.3036 to 2.65 nmol/mg, and the average value was 0.8125 ± 0.4834 nmol/mg. The characteristic of the studied group is presented in the Table II. No significant correlations were found between HCC and EFSC ($\rho=0.1005$, $p=0.532$), HCC and MSC ($\rho=0.04419$, $p=0.7838$), HCC and ESC ($\rho=-0.2071$, $p=0.1938$), and HCC and UFC ($\rho = 0.1793$, $p = 0.262$). The general linear model was fitted to perform multivariate analysis. The dependent variable was the concentration of cortisol in the hair. Independent variables for the model were selected by the step method based on the AIC (Akaike Information Criterion) values. However a statistically significant linear regression model could not be fitted.

Several publications have indicated a strong relationship between serum cortisol and salivary cortisol (22,53-57). It is a result of the simultaneous cortisol secretion into the blood by the adrenal glands and subsequent cortisol diffusion from blood into saliva. Hence, salivary cortisol correlates with cortisol concentrations in blood in a given time point. On the other hand, correlations of HCC with cortisol concentrations in blood, urine or saliva have been assessed as moderate or weak (58,59). Our results have showed no correlation between HCC and cortisol concentrations in saliva, urine, and blood. The passive diffusion of free cortisol from the blood into hair bulb is the main mechanism of cortisol presence in hair. Thus, HCC reflects the average concentration of serum cortisol over a given period of time depending of hair length used for analysis. Indeed, statistically significant correlations between HCC and multi-point

measurements of urine and salivary cortisol have been reported (48,58-61). Our results are in turn consistent with a number of studies assessing the relationship between HCC and single point cortisol measurement in saliva and serum where such correlations were weak or absent (48,61,62). In our opinion, despite a progress in laboratory diagnostics including cortisol assays, it is still challenging to transfer complex regulation of cortisol production in vivo to relatively simple statistical models based on laboratory tests. Cortisol is secreted in a pulsating manner subject to circadian rhythms, negative and positive feedback may depend on exogenous factors, and numerous genetic variants determining the sensitivity of the cortisol receptor, which in turn, might alter its level and impact on clinical manifestations (22). This may lead to misinterpretation of laboratory results and incorrect diagnosis (3,24). Another problem raised by many other authors is the lack of sufficient validation of studies assessing the correlation of HCC with other biological samples (48,63,64). Additionally, possibility of pre-analytical errors, especially for more complex determinations such as HCC should be also taken into account. For instance, the impact of substances used in hair care has not been fully evaluated. Interestingly, we did not see any difference in HCC between males and females despite the fact that the latter population likely use more frequently e.g. hair bleach.

Unlike other studies, our enrollment protocol was based on a preliminary assessment of cortisol levels in routine laboratory determinations of saliva, blood and urine. Therefore, a number of external factors affecting the HPA axis have been eliminated, such as social status, anthropometric parameters or emotional state (65-68). The impact of these factors is prominent (69). Assessed cortisol levels reflected various time intervals: minutes and hours (blood, saliva), hours and days (urine), days and months (hair). Such wide time slot of determination of cortisol concentrations may better reflect the variability of its concentrations in analyzed individuals. Additionally, we assessed the patients' clinical status during the last year before enrollment into the study. The studied group was not large, however, it was homogeneous in terms of hormonal status.

CONCLUSIONS

The results of the study indicate the possibility of using the HCC measurement in all subjects under the condition of receiving a sufficient hair sample. Cortisol extraction using a methanol medium is easy to perform in a basic equipped laboratory. Commercial ELISA assays have high sensitivity and specificity with a very low cortisol detection threshold.

The study was conducted on a homogeneous group of participants that did not display corticotropic axis disorders. The HCC ranged from 2 pg/mg up to 51.63 pg/mg. The cortisol hair measurement may be a new diagnostic tool in clinical practice. Further research on the HCC may contribute to the improvement of the diagnosis and the treatment of patients with HPA axis diseases. The results obtained in the presented work may be used as reference for further research.

However, the studied population is small, it is very carefully selected and represents individuals with no disorders of the HPA axis which is a major advantage of our study. We believe that if the correlation across saliva, blood and hair cortisol was strong it would be displayed even in a relatively small populations. Indeed, our data are consistent with other studies showing no such correlations. Due to the comparison of the results of cortisol determination in one publication, it can also be considered as unique.

PIŚMIENNICTWO

1. Isidori AM, Kaltsas GA, Pozza C, et al. The ectopic adrenocorticotropin syndrome: clinical features, diagnosis, management, and long-term follow-up. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(2), 371-377.
2. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(5), 1526-1540.
3. Cieszynski L, Berendt-Obołonczyk M, Szulc M, et al. Cushing's syndrome due to ectopic ACTH secretion. *Endokrynolo Pol.* 2016; 67(4), 458-464.
4. Stalder T, Kirschbaum C. Analysis of cortisol in hair—state of the art and future directions. *Brain Behav Immun.* 2012; 26(7), 1019-1029.
5. D'Anna-Hernandez KL, Ross RG, Natvig CL, et al. Hair cortisol levels as a retrospective marker of hypothalamic–pituitary axis activity throughout pregnancy: comparison to salivary cortisol. *Physiol Behav.* 2011; 104(2), 348-353.
6. Vanaelst B, Michels N, De Vriendt T, et al. Cortisone in hair of elementary school girls and its relationship with childhood stress. *Eur J Pediatr.* 2013; 172(6), 843-846.
7. Kamps AW, Molenmaker M, Kemperman R, et al. Children with asthma have significantly lower long-term cortisol levels in their scalp hair than healthy children. *Acta Paediatr.* 2014; 103(9), 957-961.
8. Kirschbaum C, Tietze A, Skoluda N, et al. Hair as a retrospective calendar of cortisol production—increased cortisol incorporation into hair in the third trimester of pregnancy. *Psychoneuroendocrinology.* 2009; 34(1), 32-37.
9. Stalder T, Kirschbaum C, Heinze K, et al. Use of hair cortisol analysis to detect hypercortisolism during active drinking phases in alcohol-dependent individuals. *Biol Psychol.* 2010; 85(3), 357-360.
10. Veldhorst MA, Noppe G, Jongejan MH, et al. Increased scalp hair cortisol concentrations in obese children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99(1), 285-290.
11. Dettenborn L, Muhtz C, Skoluda N, et al. Introducing a novel method to assess cumulative steroid concentrations: increased hair cortisol concentrations over 6 months in medicated patients with depression. *Stress.* 2012; 15(3), 348-353.
12. Vives AH, De Angel V, Papadopoulos A, et al. The relationship between cortisol, stress and psychiatric illness: New insights using hair analysis. *J Psychiatr Res.* 2015; 70, 38-49.
13. Thomson S, Koren G, Fraser LA, et al. Hair analysis provides a historical record of cortisol levels in Cushing's syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2010; 118(02), 133-138.
14. Staufenbiel SM, Andela CD, Manenschijn L, et al. Increased hair cortisol concentrations and BMI in patients with pituitary-adrenal disease on hydrocortisone replacement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015; 100(6), 2456-2462.

- 15.**Manenschijn L, Koper JW, van den Akker ELT, et al. A novel tool in the diagnosis and follow-up of (cyclic) Cushing's syndrome: measurement of long-term cortisol in scalp hair. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97(10), E1836-E1843.
- 16.**Gow R, Koren G, Rieder M, et al. Hair cortisol content in patients with adrenal insufficiency on hydrocortisone replacement therapy. *Clin Endocrinol.* 2011; 74(6), 687-693.
- 17.**Wester VL, Reincke M, Koper JW, et al. Scalp hair cortisol for diagnosis of Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2017; 176(6), 695-703.
- 18.**Manenschijn L, Quinkler M, van Rossum EFC. Hair cortisol measurement in mitotane-treated adrenocortical cancer patients. *Horm Metab Res.* 2014; 46(04), 299-304.
- 19.**Noppe G, Rossum EFC, Vliegenthart J, et al. Elevated hair cortisol concentrations in children with adrenal insufficiency on hydrocortisone replacement therapy. *Clin Endocrinol.* 2014; 81(6), 820-825.
- 20.**Hodes A, Lodish MB, Tirosh A, et al. Hair cortisol in the evaluation of Cushing syndrome. *Endocrine.* 2017; 56(1), 164-174.
- 21.**Cyrańska-Chyrek E, Szczepanek-Parulska E, Stajgis P, et al. Distinct clinical picture of Cushing's syndrome in a patient with Morris' syndrome- first literature report. *Endokrynol Pol.* 2020; 70(1); 96-97, doi: 10.5603/EP.a2019.0042.
- 22.**Levine A, Zagoory-Sharon O, Feldman R, et al. Measuring cortisol in human psychobiological studies. *Physiol Behav.* 2007; 90(1): 43-53.
- 23.**Gatti R, Antonelli G, Prearo M, et al. Cortisol assays and diagnostic laboratory procedures in human biological fluids. *Clin Biochem.* 2009; 42(12): 1205-1217, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2009.04.011.
- 24.**Abdulateef DS, Mahwi TO. Assessment of hair cortisol in euthyroid, hypothyroid, and subclinical hypothyroid subjects. *Endocrine.* 2019; 63(1), 131-139, doi: 10.1007/s12020-018-1743-9.
- 25.**Nieman LK, Biller BM, Findling JW, et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* (2008); 93(5), 1526-1540, doi: 10.1210/jc.2008-0125.
- 26.**Meulenberg PMM, Hofman JA. The effect of oral contraceptive use and pregnancy on the daily rhythm of cortisol and cortisone. *Clin Chim Acta.* 1990; 190(3): 211-221.
- 27.**Stalder T, Kirschbaum C, Kudielka BM, et al. Assessment of the cortisol awakening response: expert consensus guidelines. *Psychoneuroendocrinology.* 2016; 6: 3 414-432, doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.10.010.
- 28.**Fries E, Dettenborn L, Kirschbaum C. The cortisol awakening response (CAR): facts and future directions. *Int J Psychophysiol.* 2009; 72(1): 67-73, doi: 10.1016/j.ijpsycho.2008.03.014.

- 29.**Hellman L, Nakada F, Zumoff, B, et al. Renal capture and oxidation of cortisol in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1971; 33(1): 52-62.
- 30.**Viardot A, Huber P, Puder JJ, et al. 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(10): 5730-5736.
- 31.**Wennig R. Potential problems with the interpretation of hair analysis results. *Forensic Sci Int.* 2000; 107(1), 5-12.
- 32.**Balíková M. Hair analysis for drug abuse. Plausibility of interpretation. *Biomed Pab Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005; 149(2), 199.
- 33.**LeBeau MA, Montgomery MA, Brewer JD. The role of variations in growth rate and sample collection on interpreting results of segmental analyses of hair. *Forensic Sci Int.* 2011; 210(1), 110-116.
- 34.**Staufenbiel SM, Penninx BW, Rijke YB, et al. Determinants of hair cortisol and hair cortisone concentrations in adults. *Psychoneuroendocrinology.* 2015; 60, 182-194.
- 35.**Feller S, Vigl M, Bergmann MM, et al. Predictors of hair cortisol concentrations in older adults. *Psychoneuroendocrinology.* 2014; 39, 132-140.
- 36.**Stalder T, Steudte S, Miller R, et al. Intraindividual stability of hair cortisol concentrations. *Psychoneuroendocrinology.* 2012; 37(5), 602-610.
- 37.**Manenschijn L, Koper JW, Lamberts SW, et al. Evaluation of a method to measure long term cortisol levels. *Steroids.* 2011; 76(10), 1032-1036.
- 38.**Grass J, Kirschbaum C, Miller R, et al. Sweat-inducing physiological challenges do not result in acute changes in hair cortisol concentrations. *Psychoneuroendocrinology.* 2015; 53, 108-116.
- 39.**Wester VL, van der Wulp NR, Koper JW, et al. Hair cortisol and cortisone are decreased by natural sunlight. *Psychoneuroendocrinology.* 2016; 72, 94-96.
- 40.**Hoffman MC, Karban LV, Benitez P, et al. Chemical processing and shampooing impact cortisol measured in human hair. *Clin Invest Med.* 2014; 37(4), E252.
- 41.**Hamel AF, Meyer JS, Henchey E, et al. Effects of shampoo and water washing on hair cortisol concentrations. *Clin Chim Acta.* 2011; 412(3), 382-385.
- 42.**Gow R, Thomson S, Rieder M, et al. An assessment of cortisol analysis in hair and its clinical applications. *Forensic Sci Int.* 2010; 196(1), 32-37.
- 43.**Gao W, Xie Q, Jin J, et al. HPLC-FLU detection of cortisol distribution in human hair. *Clin Biochem.* 2010; 43(7), 677-682.

- 44.**Noppe G, Rijke YB, Dorst K, et al. LC-MS/MS-based method for long-term steroid profiling in human scalp hair. *Clin Endocrinol.* 2015; 83(2), 162-166.
- 45.**Bévalot F, Gaillard Y, Lhermitte MA, et al. Analysis of corticosteroids in hair by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr Biomed Sci Appl.* 2000; 740(2), 227-236.
- 46.**Raul JS, Cirimele V, Ludes B, et al. Detection of physiological concentrations of cortisol and cortisone in human hair. *Clin Biochem.* 2004; 37(12), 1105-1111.
- 47.**Cirimele V, Kintz P, Dumestre V, et al. Identification of ten corticosteroids in human hair by liquid chromatography–ionspray mass spectrometry. *Forensic Sci Int.* 2000; 107(1), 381-388.
- 48.**Sauvé B, Koren G, Walsh G, et al. Measurement of cortisol in human hair as a biomarker of systemic exposure. *Clin Invest Med.* 2007; 30(5), 183-191.
- 49.**Tanada N, Kashimura S, Kageura M, et al. Utility of caffeine analysis for forensic hair discrimination. *Nihon Hoigaku Zasshi.* 1998; 52: 233-7.
- 50.**Slominski R, Rovnaghi CR, Anand KJ. Methodological considerations for hair cortisol measurements in children. *Ther Drug Monit.* 2015; 37(6), 812-820.
- 51.**Wester VL, Rossum EF. Clinical applications of cortisol measurements in hair. *Eur J Endocrinol.* 2015; 173(4), M1-M10.
- 52.**Russell E, Kirschbaum C, Laudenslager ML, et al. Toward standardization of hair cortisol measurement: results of the first international interlaboratory round robin. *Ther Drug Monit.* 2015; 37(1), 71-75.
- 53.**Umeda T, Hiramatsu R, Iwaoka T, et al. Use of saliva for monitoring unbound free cortisol levels in serum. *Clin Chim Acta.* 1981; 110(2-3): 245-253.
- 54.**Poll EM, Kreitschmann-Andermahr I, Langejuergen Y, et al. Saliva collection method affects predictability of serum cortisol. *Clin Chim Acta.* 2007; 382(1-2): 15-19.
- 55.**Hellhammer DH, Wust S, Kudielka BM. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology.* 2009; 34(2): 163-171, doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.10.026.
- 56.**Gozansky WS, Lynn JS, Laudenslager ML, et al. 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(3): 336-341.
- 57.**Arafah BM, Nishiyama FJ, Tlaygeh H, et al. Measurement of salivary cortisol concentration in the assessment of adrenal function in critically ill subjects: a surrogate marker of the circulating free cortisol. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92(8): 2965-2971.

- 58.**Short SJ, Stalder T, Marceau K, et al. Correspondence between hair cortisol concentrations and 30-day integrated daily salivary and weekly urinary cortisol measures. *Psychoneuroendocrinology*. 2016; 71: 12-18, doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.05.007.
- 59.**Shirtcliff EA, Allison AL, Armstrong JM, et al. Longitudinal stability and developmental properties of salivary cortisol levels and circadian rhythms from childhood to adolescence. *Dev Psychobiol*. 2012; 54(5), 493-502. doi: 10.1002/dev.20607.
- 60.**Xie Q, Gao W, Li J, et al. Correlation of cortisol in 1-cm hair segment with salivary cortisol in human: hair cortisol as an endogenous biomarker. *Clin Chem Lab Med*. 2011; 49(12): 2013-2019, doi: 10.1515/CCLM.2011.706.
- 61.**Vanaelst B, Huybrechts I, Bammann K, et al. Intercorrelations between serum, salivary, and hair cortisol and child-reported estimates of stress in elementary school girls. *Psychophysiology*. 2012; 49(8): 1072-1081, doi: 10.1111/j.1469-8986.2012.01396.x.
- 62.**Stedte S, Kolassa IT, Stalder T, et al. Increased cortisol concentrations in hair of severely traumatized Ugandan individuals with PTSD. *Psychoneuroendocrinology*. 2011; 36(8): 1193-1200, doi: 10.1016/j.psyneuen.2011.02.012.
- 63.**Stalder T, Stedte-Schmiedgen S, Alexander N, et al. Stress-related and basic determinants of hair cortisol in humans: A meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*. 2017; 77: 261-274, doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.12.017.
- 64.**Davenport MD, Tiefenbacher S, Lutz CK, et al. Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques. *Gen Comp Endocrinol*. 2006; 147(3): 255-261.
- 65.**Iglesias S, Jacobsen D, Gonzalez D, et al. Hair cortisol: A new tool for evaluating stress in programs of stress management. *Life Sci*. 2015; 141: 188-192, doi: 10.1016/j.lfs.2015.10.006.
- 66.**Russell E, Koren G, Rieder M, et al. Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology*. 2012; 37(5): 589-601, doi: 10.1016/j.psyneuen.2011.09.009.
- 67.**Karlen J, Ludvigsson J, Frostell A, et al. Cortisol in hair measured in young adults-a biomarker of major life stressors?. *BMC Clin Pathol*. 2011; 11(1): 12, doi: 10.1186/1472-6890-11-12.
- 68.**Wosu AC, Gelaye B, Valdimarsdottir U, et al. Hair cortisol in relation to sociodemographic and lifestyle characteristics in a multiethnic US sample. *Ann Epidemiol*. 2015; 25(2): 90-95, doi: 10.1016/j.annepidem.2014.11.022.
- 69.**Dettenborn L, Tietze A, Kirschbaum C, et al. The assessment of cortisol in human hair: associations with sociodemographic variables and potential confounders. *Stress*. 2012; 15(6):578-588, doi: 10.3109/10253890.2012.654479.

SPIS ZAŁĄCZNIKÓW

Załącznik nr 1.

Publikacja nr 1: Cieszyński Ł, Berendt-Obołończyk M, Szulc M, Sworzak K. Cushing's syndrome due to ectopic ACTH secretion. *Endokrynol Pol.* 2016;67(4):458-471. doi:10.5603/EP.a2016.0055.

Załącznik nr 2.

Publikacja nr 2: Cieszyński Ł, Jendrzejewski J, Wiśniewski P, Owczarzak A, Sworzak K. Hair cortisol concentration in a population without hypothalamic-pituitary-adrenal axis disorders. *Adv Clin Exp Med.* 2019;28(3):369-373. doi:10.17219/acem/90038.

Załącznik nr 3.

Publikacja nr 3: Cieszyński Ł, Jendrzejewski J, Wiśniewski P, Kłosowski P, Sworzak K. Corellation analysis of cortisol concentration in hair versus concentrations in serum, saliva and urine. *Endokrynol Pol.* 2020 (online). doi:10.5603/EP.a2020.0058.

Załącznik nr 4,

Potwierdzenie przyjęcia do publikacji pracy nr 3 ``Corellation analysis of cortisol concentration in hair versus concentrations in serum, saliva and urine``