

**M A S A R Y K O V A
U N I V E R Z I T A**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Dlouhodobé sledování
vlasového kortizolu u
pacientů s
psychiatrickými
poruchami**

Diplomová práce

ELIŠKA OLŠANOVÁ

Vedoucí práce: PharmDr. Katarína Kostolanská

Konzultant práce: MUDr. Elis Bartečků, Ph.D.

Biochemický ústav LF MU
obor Biochemie

Brno 2022



Bibliografický záznam

Autor: Eliška Olšanová
Přírodovědecká fakulta
Masarykova univerzita
Biochemický ústav LF MU

Název práce: Dlouhodobé sledování vlasového kortizolu u pacientů s psychiatrickými poruchami

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie

Vedoucí práce: PharmDr. Katarína Kostolanská

Konzultant práce: MUDr. Elis Bartečků, Ph.D.

Rok: 2022

Počet stran: 81

Klíčová slova: vlasový kortizol, psychiatrická porucha, hraniční porucha osobnosti, depresivní porucha, HPA osa, LC-MS, online SPE

Bibliographic record

Author: Eliška Olšanová
Faculty of Science
Masaryk University
Department of Biochemistry LF MU

Title of Thesis: Long-term monitoring of hair cortisol in patients with psychiatric disorder

Degree Programme: Biochemistry

Field of Study: Biochemistry

Supervisor: PharmDr. Katarína Kostolanská

Consultant: MUDr. Elis Bartečků, Ph.D.

Year: 2022

Number of Pages: 81

Keywords: hair cortisol, psychiatric disorder, borderline personality disorder, depressive disorder, HPA axis, LC-MS, online SPE

Abstrakt

Psychiatrické poruchy představují celosvětový problém, který zasahuje stále vyšší procento obyvatel. Hormon kortizol byl diskutován v minulosti v souvislosti s výzkumem duševních onemocnění, jelikož u pacientů jeho hladiny varíují mimo normu. Vzhledem k jeho výrazné denní fluktuaci hladin je však problematické jeho vyšetření ze standardních matric, jako jsou krev a moč. V posledních letech byla představena matrice vlasu pro stanovení kortizolu, která umožňuje retrospektivně monitorovat kortizol po dobu půl roku. Za předpokladu průměrného růstu vlasů 1 cm/měsíc, segmentace vlasového pramene by mohla poskytnout detailnější informace o vlasovém kortizolu v delším časovém úseku. Dosavadní výzkum však tento potenciál nevyužil a analyzoval vlasový kortizol převážně v jednom nebo dvou centimetrech. Proto je touto diplomovou prací diskutována segmentová analýza, stejně jako možné klinické aplikace u psychiatrických poruch. Pozornost je věnována depresivní poruše a hraniční poruše osobnosti, jejichž kohorty byly sledovány v experimentální části. Výsledky získané za pomoci preanalytické úpravy vzorků a LC-MS analýzy srovnávají koncentrace vlasového kortizolu u pacientů s depresivní a hraniční poruchou osobnosti se zdravými kontrolami. Výhody longitudinálního sledování kortizolu oproti stanovení bez segmentace byly vyhodnoceny.

Abstract

Psychiatric disorders represent worldwide problem which affects still higher percentage of population. Hormone cortisol was discussed in the past when speaking of research of mental disorders because its levels vary out of the norm in the patients. Because of its distinct daily fluctuation of content, its screening is problematic in standard matrix, such as blood or urine. In the last years, the matrix of hair was presented for a determination of cortisol, which can monitor cortisol in a retrospective way for half-year. Supposing average growth of hair 1 cm/month, the segmentation of strand of hair could provide more detailed pieces of information about hair cortisol in longer periods. Previous research, however, did not utilize the full potential and did analyze hair cortisol predominantly in one or two centimeters. Therefore, the segmental analysis is discussed in this diploma thesis as well as possible clinical applications for psychiatric disorders. The focus is given to major depressive disorder and borderline personality disorder, whose cohorts were monitored in experimental part. Results obtained with the aid of preanalytical treatment and LC-MS analysis compare concentration of hair cortisol in patients with depressive and borderline personality disorder to healthy controls. Advantages of longitudinal monitoring of cortisol compared to determination without segmentation were evaluated.

DLOUHODOBÉ SLEDOVÁNÍ VLASOVÉHO KORTIZOLU U PACIENTŮ S PSYCHIATRICKÝMI PORUCHAMI

MUNI
SCI

MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KOTLÁŘSKÁ 2, 611 37 BRNO
IČ: 00216224
DIČ: CZ00216224

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Akademický rok: 2021/2022

Ústav:	Ústav biochemie
Studentka:	Bc. et Bc. Eliška Olšanová
Program:	Biochemie
Specializace:	Biochemie

Ředitel ústavu PŘF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s názvem:

Název práce:	Dlouhodobé sledování vlasového kortizolu u pacientů s psychiatrickými poruchami
Název práce anglicky:	Long-term monitoring of hair cortisol in patients with psychiatric disorder
Jazyk závěrečné práce:	čeština

Oficiální zadání:

Cílem diplomové práce je zhodnotit význam analýzy vlasového kortizolu u dvou psychiatrických poruch: depresivní poruchy a hraniční poruchy osobnosti. U obou poruch se předpokládá, že se na jejich rozvoji podílí narušená reakce na stres a narušení aktivity hypotalamo-hypofyzárního systému. Dlouhodobé sledování kortizolismu pomocí stanovení hladin kortizolu ve vlasech se u těchto chronických a dlouhodobých poruch jeví výhodnější než konvenční stanovení plazmatického nebo močového kortizolu, které je citlivější na krátkodobé změny. Teto metoda může napomoci k poznání patofyziologie těchto poruch, monitoraci klinického stavu a predikci jeho změny. Student/ka by si osvojil/a odběr biologického materiálu, jeho zpracování a následnou analýzu pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Segmentace odebraných vzorků vlasů umožňuje retrospektivní vizualizaci hladin kortizolu; je proto ideálním kandidátem pro dlouhodobé a objektivní sledování pacientů s depresivní poruchou nebo s hraniční poruchou osobnosti.

Literatura: GREFF, Michael JE, et al. Hair cortisol analysis: An update on methodological considerations and clinical applications. *Clinical biochemistry*, 2019, 63: 1-9.

Vedoucí práce:	PharmDr. Katarína Kostolanská
Konzultant:	MUDr. Elis Bartečků, Ph.D.
Datum zadání práce:	6. 1. 2021
V Brně dne:	14. 5. 2022

Zadání bylo schváleno prostřednictvím IS MU.

Bc. et Bc. Eliška Olšanová, 14. 6. 2021
PharmDr. Katarína Kostolanská, 22. 6. 2021
RNDr. Jitka Kašparovská, Ph.D., 2. 7. 2021

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího práce s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

V Brně 18. května 2022

.....
Eliška Olšanová

Poděkování

V této části bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce, PharmDr. Kataríně Kostolanské, za její vedení, ochotu, pomoc, zpětnou vazbu a skvělý přístup. Dále bych chtěla poděkovat konzultantce diplomové práce, MUDr. Elis Bartečků, Ph.D., a Mgr. Ondřeji Pešovi, Ph.D. za pomoc se statistickým zpracováním dat a směřováním praktické části. Na závěr bych chtěla poděkovat své rodině za podporu a povzbuzování během studia i při vypracovávání této práce.

Obsah

Seznam obrázků	13
Seznam tabulek	14
Seznam pojmů a zkratk	15
1 Úvod	17
2 Teoretická část	19
2.1 Hormon kortizol a jeho význam v lidském organismu	19
2.2 Matrice pro sledování hladin kortizolu	26
2.3 Vliv narušení aktivity HPA osy na hladiny kortizolu.....	33
2.4 Klinické aplikace měření kortizolu z matrice vlasu	37
2.5 Metody stanovení vlasového kortizolu.....	43
3 Cíle práce	47
4 Materiál, metody a postup při přípravě vzorků	48
4.1 Chemikálie, standardy, přístroje	48
4.2 Odběr biologického vzorku a jeho zpracování.....	49
4.3 Analýza kortizolu pomocí online SPE LC-MS metody.....	52
4.4 Soubory vyšetřovaných pacientů.....	55
5 Výsledky	60
5.1 Srovnání vlasového kortizolu u depresivních pacientů a BPD pacientů se zdravými kontrolami	60
5.2 Longitudinální analýza vlasového kortizolu u depresivní poruchy	62
5.3 Longitudinální analýza vlasového kortizolu u hraniční poruchy osobnosti.....	64
6 Diskuze	66
7 Závěr	71

Seznam obrázků

Obrázek 1: Chemická struktura kortizolu	19
Obrázek 2: Dráha syntézy kortizolu z cholesterolu.....	20
Obrázek 3: 24hodinový profil hladin kortizolu během dne.	22
Obrázek 4: Náhled na možnosti odběru vzorku vlasů.	29
Obrázek 5: Možné cesty inkorporace kortizolu do matrice vlasu.	30
Obrázek 6: Schéma odběru vzorku.....	49
Obrázek 7: Grafické znázornění variování koncentrací methanolu v mobilních fázích na SPE a analytické koloně	53
Obrázek 8: Časová osa studie depresivní poruchy monitorující koncentraci kortizolu v organismu pacientů před začátkem a v průběhu studie.....	57
Obrázek 9: Časová osa studie BPD monitorující koncentraci kortizolu v organismu pacientů před začátkem a v průběhu studie.....	59
Obrázek 10: Srovnání logaritmů koncentrací kortizolu kontrolní skupiny, pacientů s depresivní poruchou a pacientů s BPD.....	61
Obrázek 11: Srovnání koncentrací kortizolu u vybraných depresivních pacientů se zdravými kontrolami.....	63
Obrázek 12: Srovnání koncentrací kortizolu u vybraných BPD pacientů se zdravými kontrolami.....	65

Seznam tabulek

Tabulka 1: Příprava kalibračních vzorků ze zásobního roztoku $^{13}\text{C}_3$ -kortizolu o koncentraci 50 ng/mL	50
--	----

Seznam pojmů a zkratk

ACTH	– adrenokortikotropní hormon
BPD	– hraniční porucha osobnosti
CRH	– kortikoliberin
DBT	– dialektická behaviorální terapie
EEG	– elektroencefalografie
ELISA	– heterogenní enzymová imunoanalýza
HPA osa	– hypotalamo-hypofyzární systém
I.S.	– interní standard
LC-MS	– kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LC-MS/MS	– kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LDL receptor	– nízkodenzitní lipoprotein receptor
LOD	– limit detekce
LOQ	– limit kvantifikace
MR	– magnetická rezonance
OCT	– optická koherenční tomografie
PTSD	– posttraumatická stresová porucha
SPE	– extrakce na pevné fázi

1 Úvod

Psychiatrické poruchy se řadí mezi onemocnění, která zasahují život jedince na všech jeho úrovních. V posledních letech došlo k značnému nárůstu celosvětových případů, jejichž počet v roce 2017 činil 792 milionů obyvatel, tedy přes 10 % celosvětové populace. Mezi nejčastější poruchy se zařadily úzkostné poruchy a depresivní porucha, postihující dohromady téměř 8 % celosvětové populace. V souvislosti s psychiatrickými poruchami se prokázalo vyšší užívání návykových látek, alkoholu a vyšší suicidální tendence oproti zdravé populaci (Dattani, 2021). Z tohoto důvodu je na místě věnovat psychiatrickým poruchám zvýšenou pozornost, ať už v souvislosti se včasným zachycením, případně vhodnou farmakologickou léčbou, která by mohla být pomocí vhodného biomarkeru monitorována.

Význam hormonu kortizolu v souvislosti se vznikem psychiatrických poruch byl pozorován, vzhledem k nejasnosti použití matrice, která by jeho hladiny umožnila sledovat bez ovlivnění cirkadiálním rytmem, byla budoucnost tohoto hormonu v rámci výzkumu zmíněných poruch spíše nejasná. V posledních letech však do popředí vstoupila matrice vlasu, mající značné výhody, které umožňují retrospektivně měřit kortizol až po dobu šesti měsíců v rámci jednoho vzorku. Mimo to také byla vyvinuta metoda online extrakce na pevné fázi s kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií, která umožňuje stanovit kortizol s vysokou validitou u několika desítek vzorků současně (Kostolanska et al., 2019).

Z důvodu heterogenity psychiatrických poruch a symptomů u jednotlivých pacientů, zvláště s depresivní poruchou, se však otázka výzkumu a snahy o generalizaci výsledků dosud značně komplikovala (Dattani, 2021). Z tohoto důvodu bylo a je na místě stanovit způsob analýzy, který by umožnil

ÚVOD

psychiatrické poruchy v souvislosti s hladinami kortizolu vhodně sledovat. V této práci se proto zaměřím na potenciál stanovení kortizolu v matrici vlasu pomocí segmentové analýzy.

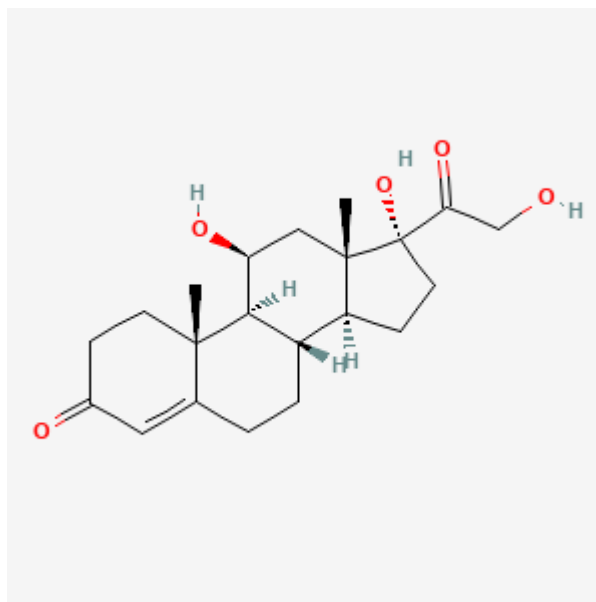
V teoretické části představím hormon kortizol, poruchy jeho sekrece a metody, jimiž lze změřit jeho hladiny s využitím matrice vlasu. Uvedu také výzkumy, které se vlasovým kortizolem v souvislosti s hraniční poruchou osobnosti a depresivní poruchou zabývaly. V praktické části zmíním výzkumy, z nichž byly analyzovány vzorky vlasů od pacientů se zkoumanými poruchami, a představím metodu zpracování a analýzy vzorků pomocí online extrakce na pevné fázi a kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Výsledné hladiny kortizolu budou porovnány pomocí box plot zobrazení a segmentové analýzy.

2 Teoretická část

2.1 Hormon kortizol a jeho význam v lidském organismu

Hormon kortizol, také známý jako stresový hormon, je organickou sloučeninou steroidní povahy. Řadí se do skupiny glukokortikoidů a zastává v organismu dvě hlavní funkce: stimuluje glukoneogenezi v játrech, přičemž zabráňuje vstřebávání glukózy do tkání, aby bylo zajištěno dostatečné dodání glukózy do centrálního nervového systému, ale také stimuluje protizánětlivé a protistresové procesy. Má taktéž slabší mineralokortikoidní aktivitu (Britannica, n.d.).

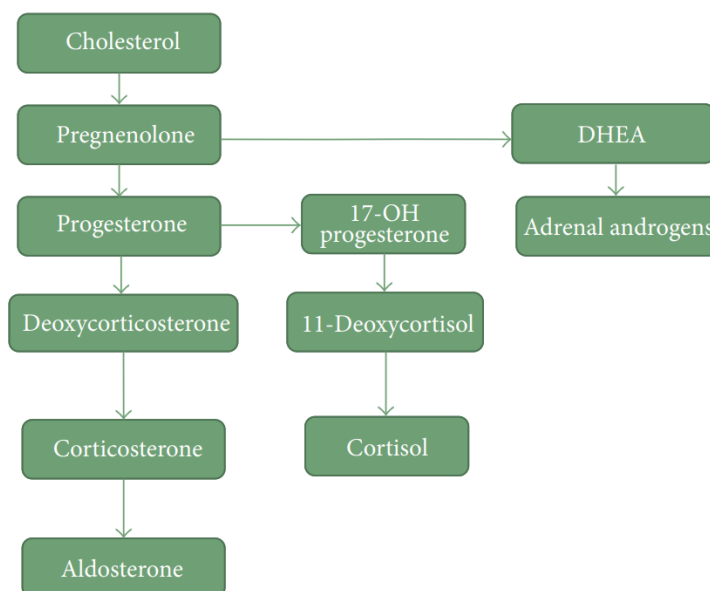
Kortizol, také označovaný jako hydrokortizon, je znám pod chemickým vzorcem $C_{21}H_{30}O_5$. Na Obrázku 1 je zobrazena jeho chemická struktura ([PubChem \(nih.gov\)](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cortisol)).



Obrázek 1: Chemická struktura kortizolu ([PubChem \(nih.gov\)](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cortisol))

Syntéza kortizolu probíhá v *zona fasciculata* kůry nadledvin. Adrenokortikotropní hormon (dále ACTH) vyplavený z adenohipofýzy za působení kortikoliberinu (dále CRH) a vasopresinu z hypotalamu (Cheer & Trainer, 2014) navyšuje koncentraci nízkodenzitního lipoprotein receptoru (dále LDL receptoru) a aktivitu cholesterol desmolasy, která řídí konverzi cholesterolu na pregnenolon a je také krokem, který ovlivňuje finální rychlost syntézy kortizolu (Angelousi, A., Margioris, A. N., & Tsatsanis, 2020).

Vzniklý pregnenolon je následně přeměněn na progesteron působením 3-B-hydroxysteroidu. Následnou konverzí pomocí 17-hydroxylasy vzniká 17-OH progesteron. Enzym 21-hydroxylasa dále přemění 17-OH progesteron na 11-deoxykortizol. Poslední krok přeměny 11-deoxykortizolu na kortizol je stimulován 11-hydroxylasou (Tomas et al., 2013). Na Obrázku 2 je celý proces znázorněn.



Obrázek 2: Dráha syntézy kortizolu z cholesterolu (Tomas et al., 2013).

Vzniklý kortizol se může v krevním séru nacházet buď v aktivní, případně inaktivní formě. Obecně je v séru 75 % kortizolu vázáno na plazmové proteiny (kortikosteroid vázající globulin a transkortin). Dalších 15 % je vázáno na albumin, zbylých 10 % zůstává ve volné formě. Právě volný, nevázaný kortizol je biologicky aktivní (Pletnikov, M., & Waddington, 2016).

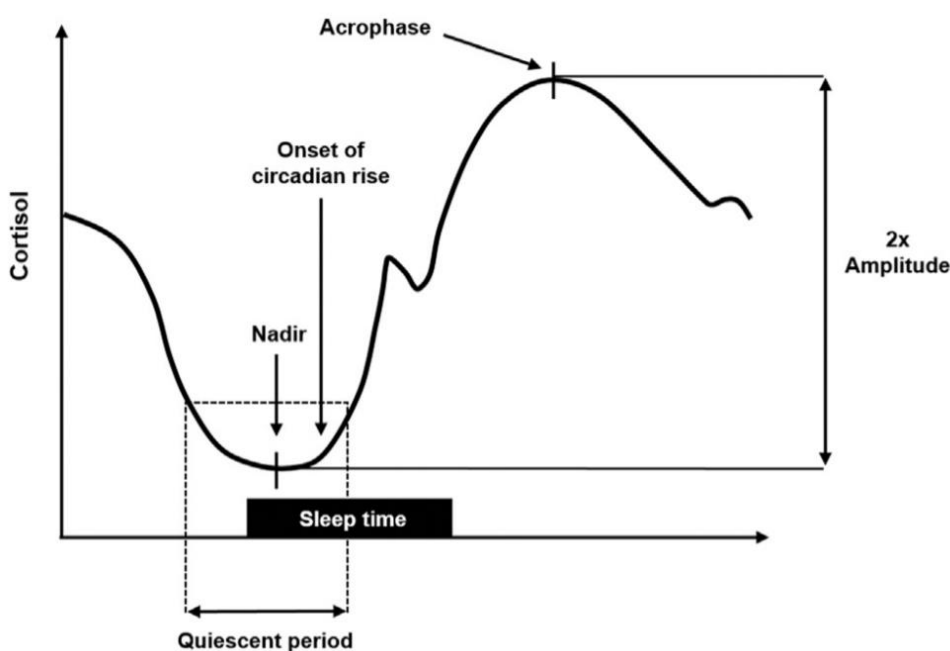
Konverze kortizolu do inaktivní formy kortizonu probíhá v pankreatu a ledvinách za působení 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenasy 2, naopak konverze na aktivní formu může probíhat ve většině tkání za přítomnosti 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenasy 1 (Ramamoorthy et al., 2017).

V případě, že je jako matrice pro měření kortizolu zvoleno krevní sérum, může se analýza zkomplikovat právě z důvodu kolísání hladin zmíněných proteinů, na které se kortizol váže. Během nefrotického syndromu či cirhózy jater je ovlivněn albumin, a tudíž dochází k problémům s měřením (Cheer & Trainer, 2014). Pokud pacientka prochází těhotenstvím, hladina plazmového transkortinu se u ní zvyšuje, což vede k větší vazbě volného kortizolu a vyšší sekreci ACTH. Tím pádem dochází k navyšování koncentrace volného kortizolu, dokud se jeho koncentrace nenavrátil na optimální hodnotu 15 %. Proto, že je v krevním séru měřen celkový kortizol (volný i vázaný), jsou pozorovány zvýšené hladiny kortizolu u těhotných žen či žen pobírajících hormonální antikoncepci, i když neprochází zvýšeným stresem (Pletnikov, M., & Waddington, 2016).

Hladiny ACTH a kortizolu jsou silně závislé na cirkadiálním rytmu, ale spánkový cyklus včetně spánkové deprivace může tyto hladiny silně ovlivnit. Je například prokázáno, že při probuzení se hladina ACTH a kortizolu značně navyšuje, a to i v případě vychýleného spánkového rytmu. V lidském organismu se z hlediska poměru koncentrace ACTH a kortizolu obecně vyskytuje výrazně vyšší množství kortizolu než ACTH (v organismu je poměr

ACTH:kortizol 1:7). Stimuly, které navyšují sekreci ACTH, také navyšují hladiny kortizolu, ale tvorba kortizolu je výrazně vyšší (Squire, 2009).

Pokud je spánkový cyklus udržován v optimálních podmínkách, je vylučování kortizolu poměrně schematické. Na Obrázku 3 je zobrazen náhled na sekreci kortizolu během dne v závislosti na spánkovém cyklu. Nejnižších hladin je dosahováno v časných stádiích spánkového cyklu (Hirotzu et al., 2015), u navozené spánkové deprivace v laboratorních podmínkách však bylo pozorováno systematické navýšení nejnižších hladin kortizolu během dne. I během stárnutí bylo pozorováno navýšení nejnižších hladin kortizolu, čímž některé teorie vysvětlují spánkovou deprivaci provázející stárnutí (Squire, 2009).



Obrázek 3: 24hodinový profil hladin kortizolu během dne. Nejnižší hodnoty kortizolu (nadir) jsou pozorovány během časných stádií spánkového cyklu (většinou kolem půlnoci). Sekrece kortizolu a ACTH se dále po 2 až 3 hodinách spánku prudce

zvyšuje a dosahuje vysokých hodnot těsně před probuzením. Nejvyšší hodnoty kortizolu (acrophase) je dosaženo v dopoledních hodinách, kolem 9. hodiny ráno. Během dne dále hladiny kortizolu postupně klesají, přičemž jejich nejzásadnější pokles nastává během spánku (Hirotsu et al., 2015).

Navýšení kortizolu je dále spojené s příjmem potravy, expozicí rannímu světlu a jiným stimulům (Squire, 2009). Hladina kortizolu je také ovlivňována konzumací alkoholu, stravou, nikotinem, hladinou glukózy v krvi, cvičením, akutním poraněním či hladinou kyslíku v krvi (Greff et al., 2019a). Mimo to bylo zjištěno, že stresové podmínky spouští aktivaci paraventriculárního jádra hypotalamu, která vede k další sekreci kortizolu mimo daný cirkadiální rytmus (Pletnikov, M., & Waddington, 2016).

Kortizol je známý zvláště pro svoji zásadní úlohu ve fyziologické odpovědi na stres, která je spuštěna skrze aktivaci kortizolu hypotalamo-hypofyzárním systémem (dále HPA osa). HPA osa sestává ze série komunikačních drah mezi hypotalamem, hypofýzou a nadledvinami. Ve chvíli, kdy hypotalamus přijme informaci o možné hrozbě v okolí, je k nadledvinám vyslán signál skrze hypofýzu. Následuje uvolnění řady hormonů, mezi kterými jsou zastoupeny kortizol a katecholaminy (noradrenalin a adrenalin) (Ramachandran, 2012).

Výsledkem odpovědi na stres jsou fyziologické změny v organismu, které se projevují zvýšenou respirací, vysokým srdečním rytmem a vysokou hladinou krevní glukózy. Kortizol také posiluje aktivitu katecholaminů vzhledem k jejich schopnosti řízení konstriktce cév, což zajistí udržování potřebné hladiny krevního tlaku (Britannica, n.d.; Pletnikov, M., & Waddington, 2016).

Výše popsané stresové reakce vyvolané působením kortizolu slouží k tomu, aby byl organismus připravený reagovat na dané ohrožení poplachovou reakcí (fight-or-flight). Oproti katecholaminům může kortizol projít

hematoencefalickou bariérou a působit také během aktivní stresové odpovědi. Bylo prokázáno, že kortizol působí nejen na fyziologické úrovni, ale ovlivňuje i psychologické a behaviorální projevy (Ashton, 2017; Pletnikov, M., & Waddington, 2016; Ramachandran, 2012).

V případě, kdy je organismus konfrontován se stresorem, dochází mimo jiné i k vychýlení rovnováhy. Kortizol umožňuje udržení homeostáze tím, že ovlivňuje řadu procesů v lidském těle: podporuje anabolické procesy v játrech, ale i katabolické procesy (proteolýzu a lipolýzu) ve svalech a ve vazivové, tukové a lymfoidní tkáni (Greff et al., 2019a; Pletnikov, M., & Waddington, 2016). Dané ovlivňování procesů proteolýzy, lipolýzy a glukoneogeneze je možné zvláště díky tomu, že jakožto hormon steroidní povahy může kortizol procházet skrze cytoplazmatickou membránu. Po průchodu do buňky se váže na receptor (který je v jeho nepřítomnosti vázán na Hsp90 protein) a Hsp90 protein uvolní z vazby. Komplex kortizol-receptoru je následně dopraven do jádra, kde ovlivní genovou transkripci proteinů, které v daných procesech hrají klíčovou roli (Ramamoorthy et al., 2017).

Kortizol postupně stimuluje vylučování glukózy z jater a přijímání glukózy svaly a dalšími tkáněmi, takže ve finále dochází k navýšení glukózy v krvi. Cílem kortizolu je totiž mobilizovat energetické zásoby (glycerol, mastné kyseliny, aminokyseliny), aby bylo v organismu dostatečné množství energie, zvláště ve formě glukózy, pro fungování srdeční a mozkové tkáně. Aby byly tyto procesy vybalancovány, další hormony, např. inzulin, jsou vylučovány (Pletnikov, M., & Waddington, 2016).

Glukokortikoidy mimo výše popsané reakce inhibují také zánětlivé procesy ve tkáních. Kortizol má silné protizánětlivé a imunosupresivní účinky, které se projevují inhibicí prozánětlivých cytokinů (interleukinů IL-1, 2, 6, 8 a 12 a tumor nekrotizujícího faktor alfa) a potlačováním účinků T buněk (Stalder

& Kirschbaum, 2012), ale také blokáci syntézy kyseliny arachidonové, která je prekurzorem mnohých mediátorů zánětu (např. prostaglandinů). Kortizol dále snižuje produkci oxidu dusnatého a celkově zabraňuje lokální zánětlivé odpovědi (Pletnikov, M., & Waddington, 2016). Samotná sekrece glukokortikoidů je však také stimulována prozánětlivými cytokiny. Bylo zjištěno, že souvislost mezi glukokortikoidy a cytokiny je často spjatá s řadou zánětlivých, autoimunitních i alergických projevů v organismu (Stalder & Kirschbaum, 2012).

V neposlední řadě také kortizol reguluje aktivitu hypotalamu a hypofýzy pomocí mechanismu negativní zpětné vazby, a inhibuje tak sekreci ACTH (Pletnikov, M., & Waddington, 2016).

2.2 Matrice pro sledování hladin kortizolu

V souvislosti se změnami v sekreci kortizolu v dlouhodobém měřítku se zkoumá možná spojitost mezi chronickým stresem a rozvojem onemocnění imunitního systému. Předpokládá se, že dlouhodobé sledování kortizolu by mohlo napomoci tuto možnou korelaci sledovat a vysvětlit. Doposud používané matrice pro měření kortizolu však přinášely spíše informace o aktuálním stavu hladin kortizolu v organismu (Stalder & Kirschbaum, 2012). V následující kapitole budou představeny matrice, které jsou běžně používané pro měření kortizolu, ale i matrice, které by mohly přinést poznatky o dlouhodobém ukládání kortizolu v organismu.

2.2.1 Konvenční matrice

Kortizol je malá molekula (molekulární hmotnost je 362.46 g/mol), která je vysoce rozpustná v tucích. Nevázaný kortizol může snadno projít lipidovými dvojvrstvami buněk a dopravit se tak do různých tělních tekutin, jako např. slin, krve, moči a potu. Bylo zjištěno, že hladiny kortizolu měřené ve slinách odpovídají volnému kortizolu v krvi. Kortizol se totiž do slin dopravuje mechanismem pasivní difúze, a tudíž jeho hladiny nezávisí na transportních mechanismech jako u jiných látek (Fink, 2007).

Rutinními matricemi pro stanovení hladiny kortizolu v organismu byly doteď výše zmíněné vzorky krevního séra, slin či moči. Tento typ matric umožňuje stanovení aktuálních hladin kortizolu v těle (v případě stanovení z plazmy či slin), případně sledování sekrece kortizolu po dobu kratší než 24 hodin (v případě stanovení z moči). Výhodou těchto stanovení bývá analýza aktuálního stavu kortizolu v lidském těle, která však pro dlouhodobé stanovení není vhodná, a to primárně z důvodu mnoha vlivů, které na sekreci kortizolu mohou působit a mezi něž se řadí mimo cirkadiánní rytmus i pulzní

sekrece kortizolu, konzumace alkoholu, nikotin, akutní stres, příjem potravy, případně i cvičení (Stalder & Kirschbaum, 2012; Wester & Rossum, 2015). Mezi další problematické aspekty zmíněných matric se řadí jejich skladování, dané vzorky je totiž potřeba zamrazit (Russell et al., 2012).

Z krátkodobého hlediska však právě vzorky slin a krevního séra poskytují poznatky o hladině kortizolu v daném čase, jsou proto vhodné pro měření akutních změn v organismu. V případě, kdy je ovšem snaha pokrýt dlouhodobé sledování kortizolu za použití těchto matric, je třeba vzít v potaz cirkadiánní rytmus. Jedním z řešení, které bývá v souvislosti s tímto realizováno, je odbírání vzorků slin a jejich analýza několikrát denně, jedná se však o poměrně komplexní a náročné řešení, které nelze aplikovat pro rozsáhlá měření u více subjektů (Russell et al., 2012).

U zmíněných matric se mimo problémy s vlivy, které mohou měnit hladiny kortizolu ve vzorcích, setkáváme i s dalšími komplikacemi, které mohou měření ztížit, a to primárně u krevního séra. Potíž je v tomto případě v zastoupení kortizolu ve volné i vázané formě v dané matrici. Zatímco v jiných matricích je měřen pouze volný, nevázaný kortizol, u krevního séra je zachycen celkový kortizol jak ve formě volné, tak i ve formě vázané na protein. To může představovat problém při situacích, kdy jsou hladiny proteinů vázajících kortizol (např. globulinu) vychýlené oproti normálu. Děje se tak např. během těhotenství, nebo u žen, které mají nasazenou hormonální antikoncepci. V takovém případě dochází k navýšení globulinu, a tím i hladin celkového kortizolu v séru, i když je koncentrace volného kortizolu ve stále stejných hodnotách (Russell et al., 2012).

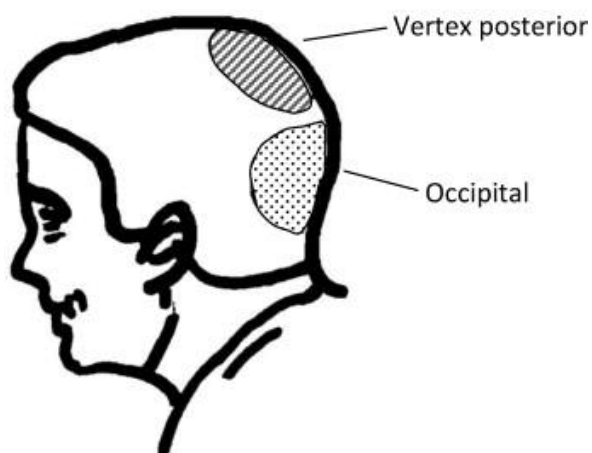
Další komplikací při výběru matrice krevního séra je invazivnost metody. Při odběru krevního séra hrozí vyvolání stresu, který může hodnoty kortizolu uměle navýšit (Russell et al., 2012).

Ze jmenovaných matric jsou sliny zdánlivě nejvhodnější pro sledování aktuálních hladin kortizolu v organismu, a to hned z několika důvodů. Kortizol ve slinách koreluje s koncentrací volného kortizolu v séru, a tudíž odpadá problém při stanovování v případě, kdy jsou hladiny proteinů vázajících kortizol vychýlené oproti normálu. Další výhodou je neinvazivnost odběru vzorku. V případě vzorků moči je invazivnost o něco vyšší, ale stále poměrně nízká, navíc se zde měří vzorky odebrané během 24 hodin, čímž se zabrání znehodnocení analýzy vlivem diurnálního rytmu (Russell et al., 2012).

2.2.2 Vlasový kortizol jako biochemický marker

Jak bylo zmíněno výše, měření sekrece kortizolu z dlouhodobého hlediska v krvi, moči či slinách je ztíženo kvůli variování hladiny kortizolu, které je způsobené zvláště cirkadiánními rytmy. Již roku 2000 však byla uvedena jiná možnost měření kortizolu, a to ve vlasech pacientů (Wennig, 2000).

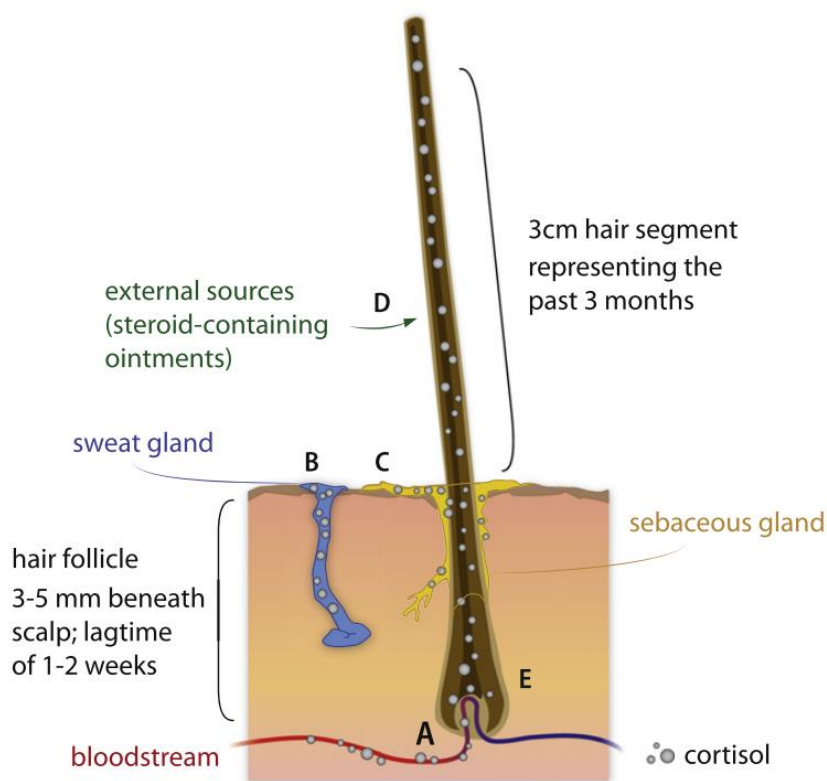
Vlasy jsou tvořeny ve vlasovém folikulu, který se nachází 3-4 mm pod povrchem kůže. Během období aktivního růstu vlasů dochází k velkému dělení keratinocytů a pigment produkujících melanocytů v oblasti vlasové cibulky. Tyto buňky jsou posouvány vlasovým folikulem nad pokožku v keratinizované, zpevněné formě. Rychlost růstu vlasů variuje mezi jedinci v závislosti na jejich pohlaví, věku či rase, ale obecně se pohybuje kolem 1 cm/měsíc. Nejnižší variabilita rychlosti růstu je pozorována u vlasů v oblasti *posterior vertex* a *occipital*, a je proto nejvhodnější pro odběr vzorků (zobrazeno na Obrázku 4) (Lebeau et al., 2011; Stalder & Kirschbaum, 2012).



Obrázek 4: Náhled na možnosti odběru vzorku vlasů. *Posterior vertex* a *occipital* pozice jsou nejvhodnější pro odběr vzorku vlasů díky nízké variabilitě růstu v této oblasti (Lebeau et al., 2011).

Samotná inkorporace kortizolu do vlasů může probíhat čtyřmi způsoby, které jsou znázorněny na Obrázku 5. Za dominantní dráhu je považována pasivní difúze kortizolu z krevních kapilár do rostoucích vlasů. Mezi další možné, minoritní dráhy, se řadí také inkorporace pasivní difúzí z potu či mazu do již keratinizovaných vlasů. V těchto případech se jedná o inkorporaci volného kortizolu.

Další možnou variantou je inkorporace kortizolu skrze vnější aplikaci mastí obsahujících kortizol, případně i nedávno diskutovaný způsob inkorporace skrze přímou tvorbu kortizolu ve vlasovém folikulu. Množství takto uloženého vlasového kortizolu je však zanedbatelné.



Obrázek 5: Možné cesty inkorporace kortizolu do matrice vlasu. Mezi možné varianty se řadí A) pasivní difúze kortizolu z krve, B) pasivní difúze kortizolu z potu, C) pasivní difúze kortizolu z kožního mazu, D) aplikace kortizolu z vnějšího zdroje (např. masti s obsahem kortizolu), E) případně lokální tvorba kortizolu v místě vlasového folikulu (oproti A-D je zde kortizol ve výrazně nižším množství) (Stalder & Kirschbaum, 2012).

Ukládání sloučenin a jejich metabolitů v průběhu růstu vlasů již dlouho umožňovalo použití této matrice ve forenzních vědách a toxikologii pro měření látek, jejichž známky zůstávaly ve vzorcích měsíce až roky. Mimo to vzorky vlasů umožnily retrospektivní sledování vývoje hladin těchto látek v organismu. V rámci forenzních věd a toxikologie se matrice používaly primárně ke stanovení exogenních látek v organismu, nejčastěji

environmentálních toxinů či drog. V poslední době se však větší zájem obrátil k možné kvantifikaci endogenních látek ukládaných do vlasů (Russell et al., 2012).

Matrice vlasů umožňují měřit chronický stres a monitorovat období nejvyššího vystavení organismu stresoru, mnohdy totiž není možné kortizol měřit v danou chvíli. Pomocí matric vlasů lze případně měřit i období, kdy organismus nebyl stresoru prozatím vystaven. V obou případech se tak děje pomocí retrospektivního náhledu, kdy hladiny kortizolu v 1 cm vlasů nejbližší pokožce hlavy odpovídají hladinám v posledním měsíci, centimetr dále odpovídá měsíci předtím. Tímto způsobem lze postupovat až k délce několika centimetrů, které odpovídají několika měsícům (Russell et al., 2012). Je však na místě uvést, že matrice vlasů je vhodná pro sledování hladin kortizolu retrospektivně po dobu minimálně 1 až 4 měsíců, pro denní sledování aktuálního stavu kortizolu v organismu je vhodnější použití vzorků slin (Sugaya et al., 2020).

Výhodou měření kortizolu ve vlasech je neinvazivnost odběru v porovnání s dříve zmíněnými typy matric, hladiny kortizolu ve vlasech tak nejsou ovlivněny případným vyvolaným stresem během odběru, jelikož je již kortizol začleněn ve vzorku (Russell et al., 2012). Pro analýzu je používán značený standard, přičemž stačí zpracovat přibližně 6 mg vlasů, takže odběr není u pacienta viditelný (Binz et al., 2016). Mimo to je zabráněno znehodnocení výsledků vlivem cirkadiálního rytmu, jelikož se vzorky analyzují za minimálně jeden celý měsíc. Další výhodou, zvláště oproti matici krevního séra, je to, že hladiny kortizolu měřené ve vzorku vlasů (odpovídající volnému kortizolu v séru) nejsou ovlivněny aktuální hladinou kortizol vázajícího globulinu (Russell et al., 2012).

Skladování vzorků je oproti předchozím zmíněným matricím velmi nenáročné. Vlasy je možné skladovat při pokojové teplotě, kortizol totiž ve vzorcích zůstává stabilní i po dobu několika let. (Russell et al., 2012).

Jedna z komplikací, která byla u tohoto typu matrice pozorována, je postupný pokles koncentrace kortizolu od proximálního k distálnímu konci. V koncové oblasti jsou vlasy mnohdy více oslabovány vlivem UV záření (Li et al., 2012), vysoké frekvence mytí vlasů, používání kosmetických produktů, případně i věku participanta (Stalder et al., 2017). V takových případech může docházet k postupnému poklesu kortizolu v koncových oblastech přirozeně. Pokles může být dán také zvýšeným efektem vymývání (wash-out) v distálních částech, který je umocněný výše zmíněnými vlivy. Takto oslabené distální konce jsou následně náchylnější k vymytí kortizolu isopropanolem. Daný efekt v některých případech nebyl pozorován u měření, při nichž vzorky nebyly promyty isopropanolem (Stalder & Kirschbaum, 2012).

Další nevýhodou měření kortizolu v matrici vlasů je dosavadní neexistence referenčních hodnot, ke kterým by bylo možné experimentální hodnoty vztahovat. Doposud existuje jediná laboratoř (Rocky Mountain Analytical (<https://rmlab.com/?myProvince=other>)), která umožňuje vlasový kortizol testovat. To je do budoucna výzvou v souvislosti se zkoumáním vzorků vlasů jakožto použitelných matric pro měření dlouhodobého kortizolu (Russell et al., 2012).

Mimo zmíněné matrice je v poslední době diskutována také matrice nehtů jakožto alternativa k matrici vlasů. V tomto případě jsou však předkládány možné problémy spojené s různou rychlostí růstu nehtů, která může být ovlivněna environmentálními faktory (Russell et al., 2012).

2.3 Vliv narušení aktivity HPA osy na hladiny kortizolu

HPA osa je jedním z nejdůležitějších neuroendokrinních kontrolních mechanismů v případě výskytu fyziologického stresu (Dey & Noguchi, 2017). Právě v souvislosti se zvýšenou mírou stresu, který v moderních dějinách zasahuje stále vyšší procento populace, se pozornost začala v posledních letech obracet k výzkumům stresu a stresových odpovědí.

Stresor, který vyvolá stres, může být fyzicky přítomný či pozorovaný, psychologický či fyziologický. Aby organismus kompenzoval efekty působení stresoru, přizpůsobuje se pomocí řady fyziologických projevů, mezi něž se řadí např. modulace krevního tlaku, srdečního rytmu, procentuálního zastoupení tuků v těle, případně změny koncentrací chemických látek, např. kortizolu, katecholaminů, ale i glukózy, fibrinogenu, či tumor nekrotizujícího faktoru alfa) (Russell et al., 2012).

Souhrnně se snaha kompenzovat stres nazývá alosterická zátěž a nese s sebou řadu energetických požadavků. I když je původně alosterická zátěž vyvíjena z adaptivních důvodů pro udržení homeostáze v těle, z dlouhodobého hlediska může představovat riziko pro případné rozvinutí chronických onemocnění, mezi něž se řadí psychické poruchy, hypertenze, riziko kardiovaskulárních chorob, obezity, diabetes mellitus 2. typu, či astma (Russell et al., 2012).

Pro stanovení chronického stresu donedávna chyběl marker i matrice, které by umožnili chronický stres pozorovat. Mezi biomarkery akutního stresu se tradičně řadí katecholaminy, ale nyní se přidal i více sledovaný kortizol (Russell et al., 2012), který nachází využití také v analýze dlouhodobého stresu.

Mezi systémy, které hrají zásadní úlohu v regulaci stresové odpovědi prostřednictvím kortizolu a které mohou být případně zasaženy, a ovlivnit tak působení samotného kortizolu, se řadí HPA osa (Dey & Noguchi, 2017). V případě výskytu stresoru tělo reaguje aktivací sympatických nervů, které jsou zodpovědné za reakci fight-or-flight, přičemž amygdala přijímá signál a vyhodnocuje relevantní odpověď. V případě potřeby posílá signál dále do hypotalamu, který následně aktivuje další sympatické nervy vedoucí k nadledvinám. Z nadledvin jsou uvolněny katecholaminy (např. epinefrin), které zrychlí srdeční rytmus a rytmus dýchání. Při přetrvání stimulu hypotalamus dále aktivuje osu HPA, což vede k sekreci kortizolu z kůry nadledvin (Hakamata et al., 2017; Lee, D.J., Kim, E, Choi, 2015).

HPA osa v odpověď reguluje reakci na fyziologický stres, ale také potřebným způsobem energetický metabolismus. Cílem jeho působení je udržet stálý poměr mezi energetickým příjmem a energetickým výdejem v závislosti na signálech, které přicházejí z míst periferních energetických zásob. Na základě toho, jaké signály přicházejí, působí HPA osa na endokrinní systém. Ten dále prostřednictvím rozličných peptidových hormonů ovlivňuje příjem potravy, metabolismus i energetickou homeostázu (Dey & Noguchi, 2017).

Právě uvolnění kortizolu, který tuto homeostázu pomáhá udržet, je řízeno HPA osou. CRH je uvolňován paraventriculárním jádrem hypotalamu a dále působí na adenohipofýzu, ve které se tímto spouští sekrece ACTH. ACTH dále působí na nadledviny, ve kterých se začne uvolňovat kortizol. Samotný kortizol má inhibiční účinky vůči sekreci ACTH a CRH, a to pomocí mechanismu negativní zpětné vazby (Ramamoorthy et al., 2017).

Ve chvíli, kdy je v organismu nahromaděn přebytek energie, je bráněno příjmu nových zdrojů energie, energetický výdej je navýšen a zásoby tuku jsou mobilizovány. V případě nedostatku energie systém naopak stimuluje příjem

potravy, snižuje energetický výdej a podporuje produkci glukózy v játrech, dokud není dosaženo metabolické homeostáze (Dey & Noguchi, 2017).

V případě, kdy osa HPA nefunguje správným způsobem, je ovlivněna i sekrece kortizolu. Variace kortizolu může vést k hypokortizolismu či hyperkortizolismu (jedná se o endokrinní poruchy), ale může vést i k možnému narušení metabolismu, zánětů, kardiovaskulárních chorob apod. (Wester & Rossum, 2015).

Hyperkortizolismus je spojován s Cushingovým syndromem, který může být ACTH-dependentní či independentní povahy. V případě závislosti na ACTH může být hyperkortizolismus vyvolán tumorem hypofýzy, případně jiným endokrinním tumorem. V těchto případech ACTH stimuluje zvýšenou produkci kortizolu v kůře nadledvin. Pokud je nadprodukce nezávislá na ACTH, bývá to většinou způsobeno přijímáním zvýšeného množství kortikosteroidů z léčebných důvodů (Raff & Carroll, 2015). Projevy Cushingova syndromu mohou být diabetes mellitus, hypertenze, nárůst tukové tkáně či osteoporóza (Lila et al., 2011).

V případě, kdy je kortizol produkován ve sníženém množství, hovoříme o tzv. Addisonově chorobě, která bývá spuštěna buď v souvislosti s ACTH, případně nezávisle na ACTH. Pokud zde není spojitost, nejčastější příčinou je autoimunitní adrenalitida (zánět kůry nadledvin), případně zhoubné bujení, které snižují sekreci kortizolu. Pokud je nižší sekrece spojená s ACTH, pak je nejčastějším důvodem právě nižší sekrece ACTH z adenohipofýzy, případně nižší sekrece CRH z hypotalamu (Michels, A., & Michels, 2014; Neary & Nieman, 2011; Nicolaides, N. C., Chrousos, G. P., & Charmandari, 2017; Wojcik, M., Ruszala, A., Janus, D., & Starzyk, 2019).

Mezi projevy Addisonovy choroby se řadí únava, snížená tělesná hmotnost, hypotenze a zvýšená pigmentace kůže. Mezi možné formy léčby se řadí substituční terapie hydrokortizonem (Nicolaidis, N. C., Chrousos, G. P., & Charmandari, 2017).

Mimo zmíněné oblasti může dysfunkce HPA osy vést k narušení spánkového cyklu a mít řadu vážných následků. V případě nadbytku glukokortikoidů totiž dochází k nárůstu hladin glukózy a inzulinu (Hirotsu et al., 2015), ale také k poklesu adiponektinu, hormonu, který má významné protektivní účinky vůči inzulinové rezistenci, rozvoji diabetes mellitus a aterosklerózy, ale také rozvoji obezity a kardiovaskulárních nemocí (Achari & Jain, 2017).

Hormon melatonin a jiné, produkované osou HPA, upravují cyklus bdění a spánku. V případě dysfunkce HPA osy dochází k narušení spánkového cyklu, stejně tak však nedostatek spánku může ovlivnit HPA osu a vést k její hyperaktivaci (Hirotsu et al., 2015).

2.4 Klinické aplikace měření kortizolu z matrice vlasu

Nerovnovážná sekrece kortizolu, ať už ve směru hyperprodukce, případně hypoprodukce, je spjatá s dysfunkcí HPA osy, přičemž výsledné vychýlení z rovnováhy vypovídá o poruchách jednotlivých složek HPA osy, což se projevuje Cushingovým syndromem, případně Addisonovou chorobou (Michels, A., & Michels, 2014; Raff & Carroll, 2015). Mimo primární projevy zmíněných chorob se může dysfunkce HPA osy v dlouhodobém měřítku promítat do poruch spánkového cyklu (Hirotsu et al., 2015) a kardiovaskulárních onemocnění (Achari & Jain, 2017).

S výrazně vyšším záchytem duševních poruch v posledních letech začaly vznikat snahy o využití měření kortizolu z matrice vlasů pro potřeby výzkumu v oblasti duševního zdraví. Bylo zjištěno, že právě dysfunkce HPA osy bývá provázána s těmito typy poruch, a proto by její zkoumání mohlo napomoci většímu pochopení principů rozvinutí a léčby duševních poruch (Koumantarou Malisiova et al., 2021). V následujících odstavcích představím dosavadní poznatky z výzkumů depresivní poruchy, hraniční poruchy osobnosti a dalších typů duševních poruch, které byly v souvislosti s dysfunkcí HPA osy zkoumány.

2.4.1 Depresivní porucha

Depresivní porucha je jednou z nejzastoupenějších duševních poruch na světě. Vyznačuje se depresivní, smutnou náladou, sníženým zájmem o aktivity, pocity viny či neschopnosti, sníženou energií a pozorností, změnou ve stravování, poruchami spánku a suicidálními myšlenkami (Malhi, G. S., & Mann, 2018). Riziko rozvinutí této poruchy během života bylo stanoveno na 25 % u žen a 12 % u mužů, přičemž převažující šance rozvinutí jsou nižší v rozvojových zemích. Depresivní porucha se váže s celou řadou jiných

onemocnění, jako je diabetes mellitus, kardiovaskulární onemocnění a různé typy nádorových onemocnění (Psarraki et al., 2021).

Bylo prokázáno, že stres může ovlivnit rozvinutí deprese. U jedinců, kteří byli v dětství týráni či zanedbáváni, bylo zjištěno vyšší riziko rozvinutí deprese v dospělosti, stejně tak další stresující události jako ztráta blízkých či ztráta práce byly taktéž spojovány s rozvinutím deprese (Psarraki et al., 2021).

Právě abnormalita fungování HPA osy zpracovávající stresové podněty byla pozorována u depresivních poruch. Dle fungování HPA systému je možné určitým způsobem odlišit dva typy depresivních poruch: melancholickou depresi (s vyšší hladinou kortizolu) a atypickou depresi (s hypoaktivitou HPA osy a nižšími, případně běžnými hladinami kortizolu). V porovnání s kontrolami však rozdíly mezi těmito typy depresivních poruch a kontrolami nebyly signifikantní. Vysvětlením mohou být vágní definice pojmů, které mohou být často zavádějící (Koumantarou Malisiova et al., 2021; Psarraki et al., 2021).

U studie depresivní poruchy s ženskými participanty byly zjištěny signifikantně nižší hladiny vlasového kortizolu (33.6 ± 23.3 pg/mg) oproti zdravým kontrolám (60.2 ± 33.8 pg/mg). Na druhou stranu však byla u žen pozorována vyšší hladina kortizolu v séru (Pochigaeva et al., 2017).

Bylo pozorováno, že vyšší hladiny kortizolu se vyskytují u jedinců s první depresivní epizodou, u jedinců s přetrvávajícími epizodami byla hladina obdobná jako u kontrol. V souvislosti s traumatem z dětství se zkoumal kortizol u aktuálně depresivních a dlouhodobě depresivních pacientů. Vyšší hladiny kortizolu byly nalezeny u aktuálně depresivních, stejné hladiny u kontrol a dlouhodobě depresivních pacientů (Psarraki et al., 2021). Jiná studie však hovoří o obdobných hodnotách vlasového kortizolu u atypické (ač v ní přetrvává smutná nálada a nezájem, radostné události jedince mohou zlepšit stav

jedince), non-atypické deprese a zdravých jedinců (přibližně 7.8 až 8.7 ± 4.5 pg/mg) (Herane-Vives et al., 2018).

U jiné studie bylo zjištěno, že vlasový kortizol byl u depresivních pacientů o 50 % vyšší než u kontrol a nijak nekoreloval s počtem či délkou předešlých epizod, ani s intenzitou depresivní poruchy (Dettenborn et al., 2012).

U žen s poporodní depresí byly pozorovány nižší hladiny vlasového kortizolu a vyšší depresivní skóre před i po porodu v poměrně konstantních hodnotách oproti kontrolám. Ač se hladiny kortizolu po porodu snížily u všech participantů, u kontrol bylo toto snížení signifikantnější. Studie s poměrně vysokou přesností byla schopná určit, zda pacientka bude trpět poporodní depresí na základě prenatální hladiny kortizolu (Jahangard et al., 2019).

Většina studií hovoří o málo signifikantním rozdílu kortizolu ve vlasech mezi kontrolami a depresivními jedinci, některé o vyšší či nižší hladině. Rozdíly mohou být dány heterogenitou skupin, rozdílem v dané epizodě, kterou pacient prochází (zda jde o první či přetrvávající epizody), melancholickou či atypickou depresí či komorbiditou s jinými onemocněními. Další vysvětlení může být dáno hyperaktivitou HPA systému u depresivních poruch, která může být korigována organismem, takže pacient ve výsledku vychází s běžnými hladinami kortizolu (Psarraki et al., 2021).

Rozdíly ve výsledcích studií mohou být mimo to dány věkem, pohlavím (u mužů je běžně vyšší hladina kortizolu), medikací (léky proti bolesti i antidepresiva ovlivňují hladiny kortizolu), wash-out efektem, různou rychlostí růstu vlasů, různými analytickými metodami (kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií, heterogenní enzymová imunoanalýza), ale i faktem, že většina studií je spíše případová. Více vhodné by pro zkoumání této problematiky byly longitudinální studie (Psarraki et al., 2021).

2.4.2 Hraniční porucha osobnosti

Hraniční porucha osobnosti je vážná duševní porucha, která postihuje 2 % populace a která se vyznačuje nestabilitou v rámci kontroly impulzivního chování, emoční regulace, narušeným sebe-pojetím a mezilidskými vztahy. U této duševní poruchy je poměrně vysoká morbidita daná riskantním chováním a suicidálními tendencemi, které hraniční poruchu osobnosti doprovázejí. Impulzivní chování u tohoto typu pacientů je mnohdy ovlivněno působením stresových událostí, kdy např. sebepoškozovací tendence mají za cíl uvolnit stres. Proto je akutní stres významným činitelem v rizikovém chování pacientů. Uvažuje se o možné roli dysfunkce HPA osy, která by v rozvoji této duševní poruchy mohla sehrávat roli (Bourvis et al., 2017).

V rámci analýzy kortizolu byla provedena měření primárně z matric slin u žen s hraniční poruchou osobnosti, kdy byla naměřena snížená hladina kortizolu oproti kontrolám (Aleknaviciute et al., 2016). Stejného výsledku dosáhla i jiná studie (Duesenberg et al., 2019), ovšem v literatuře se vyskytly i rozdílné závěry. V jednom z výzkumů byly nalezeny hladiny kortizolu u žen zvýšené, u mužů naopak snížené (Inoue et al., 2015).

Některé studie, zaměřující se na analýzu kortizolu z matrice moči, přinesly poznatky o zvýšení hladin kortizolu u žen s hraniční poruchou osobnosti (Wingenfeld, 2007). V případě komorbidity s posttraumatickou stresovou poruchou byly tyto hladiny nižší oproti pacientům s posttraumatickou stresovou poruchou (Southwick, 2003).

Z hlediska krevního séra byly zjištěny vyšší hladiny kortizolu u žen, které trpěly hraniční poruchou osobnosti, ale zároveň prožily v dětství týrání (Rinne et al., 2002).

V rámci matrice vlasů byl realizován výzkum u žen s hraniční poruchou osobnosti, kdy byly ve vzorcích analyzovány testosteron a kortizol. V rámci kortizolu nebyly nalezeny signifikantní rozdíly mezi kontrolou a pacienty, naopak testosteron byl u pacientů signifikantně vyšší oproti kontrolám (Dettenborn et al., 2016).

2.4.3 Další aplikace

Mimo výše zmíněné duševní poruchy byly taktéž za pomoci analýzy kortizolu zkoumány další typy duševních poruch a duševních traumat. U pacientů s generalizovanou úzkostnou poruchou byla pozorována primárně vyšší hladina krevního kortizolu a kortizolu ve slinách v ranních hodinách, postupem ale došlo ke snížení (Mantella et al., 2008). Ve vlasových vzorcích hladina kortizolu u pacientů s generalizovanou úzkostnou poruchou nebyla signifikantně odlišná oproti kontrolám (Steudte-Schmiedgen et al., 2017). Dle přehledového článku se výsledky u panické úzkostné poruchy a obsedantně kompulzivní poruchy v různých biologických vzorcích lišily (Koumantarou Malisiova et al., 2021), komorbidní úzkostná a depresivní porucha však vedly k navýšení kortizolu ve vzorcích vlasů (Gerritsen et al., 2019).

Hirt et al. (2019) zkoumali, zda rané zkušenosti týrání z dětství souvisejí s hodnotou vlasového kortizolu a rozvinutím schizofrenie či psychózy. Ač se hodnoty mezi skupinou zdravých kontrol, chronických schizofreniků a schizofreniků s jednou či dvěma hospitalizacemi příliš nelišily, bylo pozorováno, že jedinci s ranou zkušeností týrání (kolem 11 roku života) měli nižší hodnoty kortizolu. Vlasový kortizol byl naopak pozorován ve zvýšené podobě u pacientů s psychózou, kteří se vyznačovali intolerancí vůči určitým léčivům. Obecně však lze říct, že aktivita HPA systému ve spojitosti s těmito

duševními poruchami je pozorována, ale v jakém konkrétním směru (hypo či hyperaktivita) je stále otázkou.

Jedinci, kteří se pokusili o sebevraždu, měli signifikantně nižší hladinu kortizolu (Melhem et al., 2017), stejně tak i jedinci s traumatem z dětství (Steudte et al., 2013). Tato snížená hladina se však projevila až v dospělosti. Mimo to bylo prokázáno, že konzumace heroínu snižuje aktivitu HPA osy. Jedinci v léčení však měli vyšší hladiny kortizolu oproti kontrolám (Yang et al., 2016).

Závěrem by bylo možné shrnout, že ač jsou výsledky velmi nekonzistentní, shodují se v jedné skutečnosti: v obdobích bezprostředně po tísní či utrpení pacienta (a ve spojení s prvními stádii či epizodami duševní poruchy) byly pozorovány vyšší hladiny vlasového kortizolu. Kromě depresivních pacientů s první epizodou se stejný trend vyskytoval také u jedinců s první epizodou bipolární poruchy a psychózy. U posttraumatické stresové poruchy (dále PTSD) taktéž bylo pozorováno zvýšení kortizolu krátce po traumatizující události, ovšem následné snížení po delší době. Toto konstantní snížení bylo u PTSD pozorováno ve všech biologických vzorcích. V rámci popsaných průběhů se předpokládá tzv. „dose-response model“, který by daný vývoj mohl vysvětlit (Koumantarou Malisiova et al., 2021).

2.5 Metody stanovení vlasového kortizolu

Pro analýzu kortizolu v matrici vlasů se postupně ustanovily optimalizované postupy, a to jak v části preanalytické úpravy vzorků, tak v části samotné analýzy. Ač preanalytická část bývá poměrně stejnorodě ustanovena ve většině případů, u analytické části se setkáváme se dvěma hlavními diskurzemi, které budou rozebrány v následujících podkapitolách.

2.5.1 Preanalytická úprava vzorků

Pro odstříhnutí vzorku vlasů se běžně volí *posterior vertex* pozice, přičemž je snaha odstříhnout vzorky co nejbližší pokožce hlavy. Cílem je zachovat předpoklad, že obsah kortizolu v 1 cm vlasů ve směru proximálním od pokožky hlavy odpovídá hladině kortizolu za 1 měsíc (Lee, D.J., Kim, E, Choi, 2015).

V rámci úpravy vzorků byly realizovány řady srovnání, aby optimalizovaná metoda byla co nejúčinnější z hlediska extrakce. Mezi jedním z diskutovaných postupů byla otázka počátečního zpracování vzorků. Byly provedeny a srovnány postupy, kdy vlasové vzorky výzkumníci rozemleli a poté srovnali účinnost s klasicky nastříhanými vzorky vlasů. U rozemletých vzorků se ukázala být extrakce účinnější, ale ne výrazně. Kvůli složitosti a časové náročnosti dodatečného kroku rozemletí se tento postup u vědecké veřejnosti neujal (Gao et al., 2013).

Následující krok pročištění vzorků byl zařazen kvůli odstranění mazu a potu z vlasů, které mnohdy obsahují dodatečný kortizol. Aby se tak zabránilo nadhodnocení hladin kortizolu, ale také se částečně smazaly rozdíly v účastnících prováděné péči o vlasy, vzorky bývají promývány, a to nejčastěji isopropanolem (Gerritsen et al., 2019; Greff et al., 2019a; Herane-Vives et al., 2018). V některých případech však bývá místo isopropanolu používána voda a následně aceton (Binz et al., 2016). Vzorky poté schnou po dobu 12-48 hodin

(Gao et al., 2013; Gerritsen et al., 2019; Greff et al., 2019a; Herane-Vives et al., 2018; Noppe et al., 2015) (v případě vody a acetonu 4 hodiny (Binz et al., 2016)).

Extrakční kroky se liší v závislosti na použitém typu analýzy, ale v zásadě obsahují počáteční krok extrakce methanolem a následnou inkubaci této směsi po dobu 16-20 hodin. V případě stanovení heterogenní enzymovou imunoanalýzou (dále ELISA) se navíc tento krok doplňuje předcházejícím rozemletím vzorků pomocí skleněných či keramických kuliček (Greff et al., 2019a; Herane-Vives et al., 2018; Noppe et al., 2015). V některých publikacích je také zmíněna dodatečná centrifugace směsi po extrakci methanolem (Binz et al., 2016; Gao et al., 2013; Herane-Vives et al., 2018; Noppe et al., 2015).

Po extrakci je ze vzorků odstraněn methanol pomocí většinou využívané evaporace dusíkem při 35-65 °C, případně vzácněji pomocí vakuové centrifugy (Herane-Vives et al., 2018).

Posledním krokem je rekonstituce vzorků, která je prováděna v destilované vodě (Gao et al., 2013), fosfátovém pufru (Greff et al., 2019b) či komerčně dostupných rozpouštědlech u ELISA metody (Herane-Vives et al., 2018), 2% methanolu (Noppe et al., 2015), případně ve směsi methanol-voda (Binz et al., 2016).

2.5.2 Imunochemické stanovení ELISA

ELISA stanovení se donedávna řadilo mezi intenzivně používané metody analýzy kortizolu. Metoda využívá interakce protilátky se stanovovaným analytem, přičemž samotná protilátka je imobilizována na pevné fázi, kterou může představovat polystyren, polyvinyl či polypropylen. Aby došlo k interakci mezi protilátkou a analytem, využívá se různých enzymů, které vytvářejí

v případě pozitivní reakce barevnou odezvou (v případě beta galaktosidasy je nutné použít fluorimetr, aby se změna, která je mimo viditelné spektrum, zachytila). Samotná reakce pak trvá přibližně 30 až 60 minut (Aydin, 2015).

V rámci stanovení ELISA metodou existuje několik typů této analýzy, které lze v zásadě rozdělit do dvou skupin, a to na homogenní a heterogenní imunochemické stanovení. Nejpoužívanější v rámci stanovení kortizolu je kompetitivní ELISA metoda, která je založená na použití dvou typů protilátek (Greff et al., 2019b).

Výhodou ELISA metody je její nízká cena, jednoduchost a schopnost analyzovat vysoké množství vzorků v krátkém čase (Noppe et al., 2015). Problém však představuje častá zkřížená reaktivita steroidních analytů s protilátkami, kdy dochází k umělému nadhodnocování výsledků (Gao et al., 2013). Mimo to metoda neumožňuje v jedné analýze stanovit více látek současně (Noppe et al., 2015). ELISA stanovení proto začíná být postupně opouštěno zvláště kvůli nízké specificitě a spolehlivosti, které mnohdy provázejí analýzu steroidních látek pomocí tohoto typu metody (Gao et al., 2013).

2.5.3 Hmotnostní spektrometrie LC-MS

Kvůli problémům výše zmíněným se vědecká veřejnost pokusila nalézt vhodnější způsob analýzy vlasových vzorků. Tím se stala kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (dále LC-MS), případně kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (dále LC-MS/MS), od kterých se do té doby ustupovalo kvůli vysoké finanční náročnosti analýzy, ale i nemožnosti nastavit tato stanovení v masivním měřítku analýzy více vzorků (Noppe et al., 2015). Navíc tyto metody musely být doplněny o preanalytický krok čištění pomocí extrakce na pevné fázi (dále SPE), který

umožnil odstranit kontaminanty z matrice vlasů a citlivěji zachytit hladiny kortizolu (Gao et al., 2013).

Zmíněné překážky pro masivní analýzy vzorků byly postupně řešeny, přičemž byly představeny první validace metody analýzy vlasů pro stanovení steroidních hormonů (Noppe et al., 2015). Zvláště Gao et al. (2013) představili nový způsob online SPE LC-MS/MS analýzy, který umožnil z časového hlediska výrazně zkrátit dobu analýzy na 9 minut/vzorek (do té doby vycházela na 50 minut/vzorek).

Principem LC-MS (případně LC-MS/MS) analýzy je oddělení molekul analytu pomocí kapalinové chromatografie a následná konverze těchto molekul do ionizovaného stavu. Ta je většinou prováděna pomocí ionizace elektro-sprejem. Následně jsou ionty a produkty rozpadu těchto iontů analyzovány za pomoci poměru hmotnosti ku náboji těchto iontů (m/z) v hmotnostním spektrometru. Varianta MS/MS navyšuje citlivost metody. Nevýhodou metody je počáteční vysoká cena, která se pojí s pořízením spektrometru. Na druhou stranu je výhodou této metody vysoká citlivost a možnost stanovit více analytů současně (Pitt, 2009).

3 Cíle práce

Cílem diplomové práce bylo zhodnotit význam analýzy vlasového kortizolu u dvou psychiatrických poruch: depresivní poruchy a hraniční poruchy osobnosti, a to za pomoci online SPE LC-MS analýzy. Cílem bylo zachytit potenciální trendy vývoje kortizolu jak z hlediska samotných typů psychiatrických poruch, tak z hlediska vývoje měřeného hormonu v delším časovém měřítku (3 až 6 měsíců).

4 Materiál, metody a postup při přípravě vzorků

4.1 Chemikálie, standardy, přístroje

Chemikálie a standardy

Deionizovaná voda (ze zařízení Mili-Q system na ultračistou vodu) (Millipore, MA, USA)

Zásobní roztok $^{13}\text{C}_3$ -kortizolu (2,3,4- $^{13}\text{C}_3$) (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Sigma Aldrich (Švýcarsko))

Deuterovaný D_8 -kortizon (2,2,4,6,6,9,12,12- D_8) (Sigma Aldrich (Švýcarsko))

Isopropanol (Sigma Aldrich (Švýcarsko))

Kyselina mravenčí (Sigma Aldrich (Švýcarsko))

Methanol (LC-MS) (Sigma Aldrich (Švýcarsko))

Zásobní roztok $^{13}\text{C}_3$ -kortizolu byl zředěn v methanolu na koncentraci 50 ng/mL. Deuterovaný interní standard (dále I.S.) (D_8 -kortizon) byl připraven ve finální koncentraci 100 ng/mL. Zásobní roztok i I.S. (D_8 -kortizon) byly skladovány při teplotě $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Přístroje

Zařízení na ultračistou vodu Mili-Q system (Millipore, MA, USA)

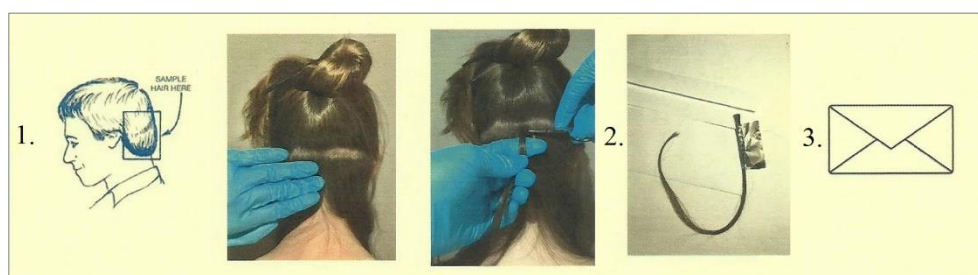
Minitřepačka IKA MS2 Minishaker Vortexer (Německo)

Analytická váha Sartorius Research (Německo)

4.2 Odběr biologického vzorku a jeho zpracování

Pramen vlasů byl pro účely stanovení kortizolu odebrán jak u zdravých kontrol, tak u jedinců s hraniční poruchou osobnosti a depresivní poruchou. Testování jedinci podepsali informovaný souhlas.

Odběr vzorků při preanalytické fázi byl prováděn proškolenými pracovníky dle kritérií vydaných Society of Hair Testing (Cooper et al., 2012), kteří dané prameny vlasů, odstřižené z *posterior vertex* pozice co nejbližší vlasové pokožky a zajištěné z proximální strany proti rozpadnutí, skladovali na suchém a tmavém místě při pokojové teplotě do doby převzetí vzorků. Postup preanalytické fáze je vizuálně shrnut na Obrázku 6.



Obrázek 6: Schéma odběru vzorku. 1. Pramen vlasů byl odebrán z *posterior vertex* pozice co nejbližší pokožky hlavy. 2. Pramen byl zajištěn alobalou proti rozpadnutí. 3. Vzorek byl následně uložen do obálky a skladován na suchém, tmavém místě při pokojové teplotě do doby zpracování a analýzy vzorku

Extrakce kortizolu ze vzorku vlasů byla provedena na základě již vyvinuté, validované a optimalizované metody (Kostolanska et al., 2019). Pramen vlasů byl z proximální strany segmentován po 1 cm do mikrozkušavek typu Eppendorf (1.5 mL). Počet segmentů se pohyboval od jednoho po šest, a to podle délky pramenu. Dané dělení po 1 cm segmentech zajistilo retrospektivní sledování vlasového kortizolu vždy 1 měsíc (až 6 měsíců) zpětně.

MATERIÁL, METODY A POSTUP PŘI PŘÍPRAVĚ VZORKŮ

Nastříhané vzorky byly dvakrát manuálně promyty 1 mL isopropanolu a protřepávány po dobu 1 minuty. Po následném odčerpání isopropanolu byly vzorky přeneseny do digestoře, kde byly ponechány po dobu nejméně 24 hodin k úplnému vysušení. Spolu se vzorky vlasů byly stejným postupem pročištěny i vzorky vlasů odstřižené z distálního konce minimálně 20 cm dlouhých vlasů, odebraných zdravé kontrole a sloužících jakožto autentická matrix pro pozdější přípravu kalibračních vzorků.

Vysušené vzorky byly na analytické váze zváženy s přesností na 0.01 mg ve skleněných zkumavkách. Hmotnost vzorků se pohybovala v rozmezí 8 ± 3 mg. Pro potřeby kalibrace byly taktéž naváženy do skleněných zkumavek vzorky z distálního konce vlasů, a to o hmotnosti přibližně 8 mg. K naváženým vzorkům (s výjimkou vzorků pro potřeby kalibrace) bylo následně přidáno 1800 μL methanolu a 10 μL I.S. (D_8 -kortizon) o koncentraci 100 ng/mL.

Kalibrační vzorky byly připraveny ze zásobního roztoku $^{13}\text{C}_3$ -kortizolu o koncentraci 50 ng/mL (Tabulka 1).

Tabulka 1: Příprava kalibračních vzorků ze zásobního roztoku $^{13}\text{C}_3$ -kortizolu o koncentraci 50 ng/mL

Objem [μL] odebraný ze zásobního roztoku $^{13}\text{C}_3$ -kortizolu (50 ng/mL)	Doplnění do 1 mL methanolem [μL]	Výsledná koncentrace $^{13}\text{C}_3$ -kortizolu [ng/mL]
100	900	5
40	960	2
20	980	1
10	990	0,5

Do čtyř skleněných zkumavek s nastříhanými konečky vlasů o přibližné hmotnosti 8 mg bylo následně přidáno 100 μL standardního roztoku o koncentracích 5, 2, 1 a 0.5 ng/mL $^{13}\text{C}_3$ -kortizolu. Do každé bylo dále napipetováno 1700 μL methanolu a 10 μL I.S. (D_8 -kortizon).

Skleněné zkumavky se vzorky a kalibračními vzorky byly uzavřeny a inkubovány po dobu 18 hodin v laboratoři. Následující den byla směs přenesena do mikrozkušavek typu Eppendorf (2 mL) a ofukována v digitální suché lázni při 40 °C dusíkem.

Po odpaření methanolu byly vzorky i kalibrační vzorky rekonstituovány v 500 μL 20% methanolu. Směs v mikrozkušavkách byla vortexována po dobu 15 vteřin a následně přenesena do skleněných vialek o objemu 1 mL k LC-MS analýze.

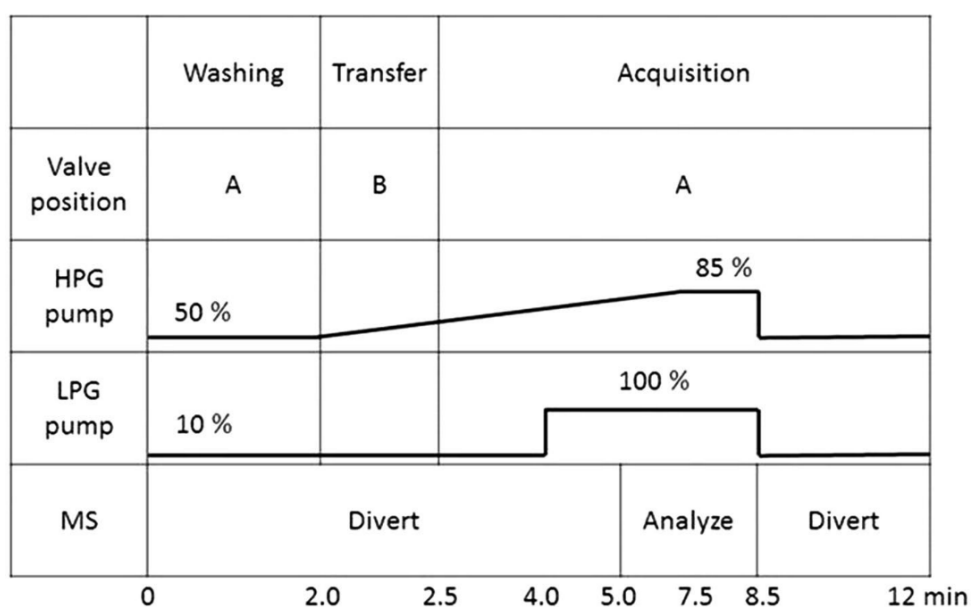
4.3 Analýza kortizolu pomocí online SPE LC-MS metody

Analýza kortizolu z matrice vlasu byla provedena na základě již optimalizované metody analýzy kortizolu pomocí online SPE LC-MS (Kostolanska et al., 2019). Optimalizovaná metoda vycházela ze studie, která navrhla použít pro potřebu stanovení kalibrační přímky konečky vlasů, v nichž je obsah kortizolu minimální, spolu s přidávanými známými koncentracemi značeného $^{13}\text{C}_3$ -kortizolu, který vykazuje stejné vlastnosti v rámci zobrazení LC-MS metodou. Bylo tak zabráněno možnému znehodnocení v případě vyšší koncentrace kortizolu v konečcích vlasů, jelikož se měřený kortizol ve vzorcích vztahoval ke kalibraci značeného kortizolu, který přirozeně ve vlasech přítomný není (Binz et al., 2016).

Online SPE LC-MS metoda využívala Dionex Ultimate 3000RS (ThermoScientific, CA, USA) modul doplněný o binární vysokotlakou gradientní pumpu a kvartérní nízkotlakou gradientní pumpu propojenou s autosamplerm a kolonovým termostatem s obousměrným ventilem. Záchytná SPE kolona sestávala z upevněného držáku kolony (Phenomenex, CA, USA) a dvou kusů SecurityGuard™ cartridge (2×4 mm, C18, Phenomenex, CA, USA) (Kostolanska et al., 2019).

Analýza vzorků probíhala následujícím způsobem: nízkotlaká pumpa po dobu 2 minut při pokojové teplotě vháněla 50 μL analyzovaného vzorku na SPE kolonu za pomoci 10% methanolu ve vodě rychlostí 1 mL/min. Po uplynutí této doby došlo k přestupu přečištěného vzorku na analytickou kolonu ($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $2.7 \mu\text{m}$ C18 Ascentis, Phenomenex, CA, USA) umístěnou za ochrannou kolonou (C18, 2×2 mm, Phenomenex, CA, USA). Obě kolony byly udržovány při teplotě 20 ± 0.1 °C. Vysokotlaká pumpa po dobu 12 minut rychlostí 0.2 mL/min vháněla analyt v mobilní fázi 50% methanolu a 0.1% kyseliny mravenčí ve vodě (Kostolanska et al., 2019).

50% methanol mobilní fáze byl v dané koncentraci udržován po dobu 2 minut, během následujících 7.5 minut došlo k postupnému zakoncentrování na 85 %. Daná koncentrace byla ustálena po dobu 1 minuty a vrátila se zpět na hodnotu 50 % za 1.5 minuty. Mezi 4 a 8.5 minutami zároveň proběhla regenerace SPE kolony za pomoci 100% methanolu, koncentrace se poté vrátila na původních 10 %. Na Obrázku 7 je pro lepší přehlednost celý proces graficky znázorněn (Kostolanska et al., 2019).



Obrázek 7: Grafické znázornění variování koncentrací methanolu v mobilních fázích na SPE a analytické koloně (Kostolanska et al., 2019).

Analytická kolona byla napojena na Bruker EVOQ Qube triple quadrupole hmotnostní spektrometr (Německo) operující v módu negativní ionizace vyhřívaným elektrosprejem při teplotě 350 °C. Negativní ionizace umožnila pracovat s adukty kyseliny mravenčí a kortizolu (kortizonu) s negativním nábojem s méně interferencemi a vyšší specificitou. Jako kolizní plyn byl použit argon.

Koncentrace analytů byla určena z kalibrace značeného $^{13}\text{C}_3$ -kortizolu (Binz et al., 2016) s korekcí na I.S. (D_8 -kortizon). Limit detekce (dále LOD) 3:1 (signál:šum) a limit kvantifikace (dále LOQ) 10:1 (signál:šum) byly nastaveny optimalizovanou metodou (Kostolanska et al., 2019). Referenční interval pro potřeby této práce a analýzu jednotlivých skupin depresivních pacientů a pacientů s hraniční poruchou osobnosti (Obrázek 11 a 12) byl v rámci optimalizované metody nastaven na 4.85 ± 3.37 pg/mg (medián $\pm 2x$ směrodatná odchylka) na základě měření vzorků vlasů 114 zdravých kontrol (Kostolanska et al., 2019).

4.4 Soubory vyšetřovaných pacientů

V rámci diplomové práce byly testovány dvě kohorty jedinců spadající pod různé realizované studie. Níže budou popsány jednotlivé studie a charakteristiky jedinců, kteří se daných výzkumů účastnili.

4.4.1 Depresivní pacienti

Studie Strukturální a funkční koreláty kognitivního deficitu u pacientů s depresivní symptomatologií a jeho dopady na kvalitu života (afECT-COG) se zabývala narušením kognitivních funkcí (paměť, pozornost, učení), které je typické u depresivních poruch. Studie do svého výzkumu zahrnula pacienty s depresivní poruchou a pacienty s depresivní fází u bipolární poruchy.

Vstupními kritérii pro pacienty s depresivní poruchou byl věk 18-65 let, přítomnost alespoň středně těžké depresivní fáze v rámci bipolární afektivní poruchy (F31), depresivní epizody (F32) či periodické depresivní poruchy (F33) a informovaný souhlas účastníka. Mezi vylučující kritéria se řadilo těhotenství, organická porucha ovlivňující funkci mozku, komorbidní psychiatrická porucha, IQ < 70, či nespolupracující pacient.

U pacientů s depresivní poruchou byla zvolena vhodná farmakoterapeutická léčba (medikace a elektrokonvulzivní terapie či repetitivní transkraniální magnetická stimulace doprovázené medikací), po jejíž stabilizaci byli účastníci podrobeni jednotlivým vyšetřením popsaným níže.

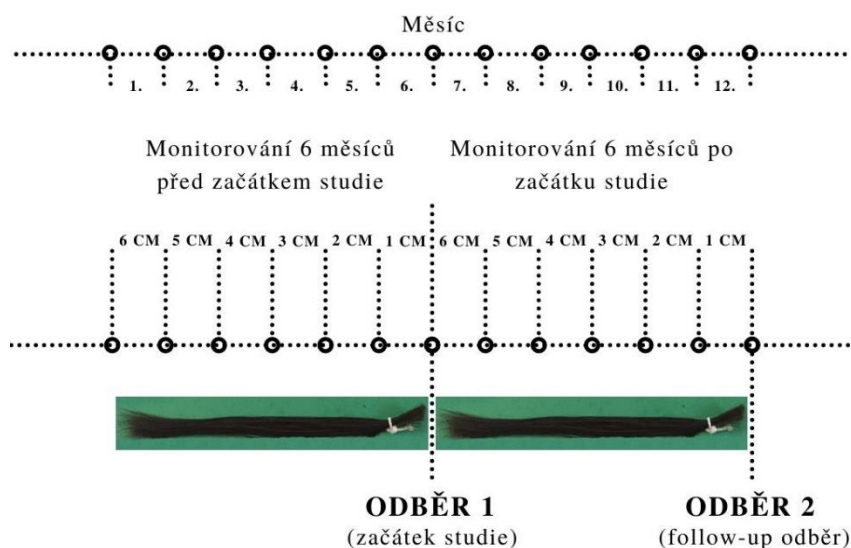
Účastníci studie byli požádáni o vyplnění dotazníků a škál. Následně byli podrobeni psychologickému vyšetření a odběru krve za účelem zjištění přítomnosti proteinů akutní fáze, nervových růstových faktorů, molekul známek nízkého zánětu a proteinů ze skupiny adipokinů. Dále byli podrobeni vyšetření za pomoci neurozobrazovacích metod (magnetické rezonance (dále MR) a

elektroencefalografie (dále EEG)) a optické koherenční tomografie (dále OCT).

Prioritní částí studie pro účely diplomové práce byl odběr vlasů pro stanovení kortizolu, který probíhal na Psychiatrické klinice Fakultní nemocnice Brno, odkud byly vzorky v papírových obálkách přeneseny na Biochemický ústav LF MU. Zde byly uloženy při pokojové teplotě bez přístupu světla až do doby zpracování a analýzy.

Odběru vlasů se zúčastnili pacienti hospitalizovaní na Psychiatrické klinice Fakultní nemocnice Brno, přičemž z této skupiny byli vyřazeni jedinci, kterým byly uměle podávány kortikoidy (v těchto případech by byly pozorovány nadhodnocené výsledky koncentrací kortizolu, které by neodpovídaly výskytu kortizolu v organismu). Ve výsledku jsem v laboratoři zpracovala vzorky vlasů od 22 pacientů (jeden vzorek byl vyřazen), nastříhané po 1 cm na 1-6 cm podle délky vlasů. Celkově bylo zpracováno a zanalyzováno 99 segmentů ze série prvotních odběrů. Do budoucna je naplánováno zpracování a zanalyzování vzorků ze série follow-up odběrů po 6 měsících. Celkově tedy budou pacienti pozorováni po dobu 12 měsíců v případě modelové délky vlasů větší než 6 cm.

Vzhledem k tomu, že se zmíněné studie účastnili muži v poměrně vyšším zastoupení než v rámci studie s hraniční poruchou osobnosti, bylo možné nastříhat vzorky vlasů kvůli kratší délce v některých případech pouze na 1-3 cm. Proto tedy u těchto pacientů nebyl kortizol retrospektivně sledován po dobu 6 měsíců. Na Obrázku 8 je graficky znázorněno sledování kortizolu v organismu pacientů (s modelovým příkladem vlasů o minimální délce 6 cm), které analýza vlasových vzorků umožnila.



Obrázek 8: Časová osa studie depresivní poruchy monitorující koncentraci kortizolu v organismu pacientů před začátkem a v průběhu studie. Odběr 1 je proveden na začátku studie a umožňuje retrospektivně sledovat (dle délky vlasů) až 6 měsíců před začátkem terapie míru zastoupení kortizolu v organismu. Odběr 2, provedený 6 měsíců po začátku studie, umožní monitorovat efekt terapie. Celkově je sledován roční vývoj kortizolu v organismu pacienta.

4.4.2 Pacienti s hraniční poruchou osobnosti

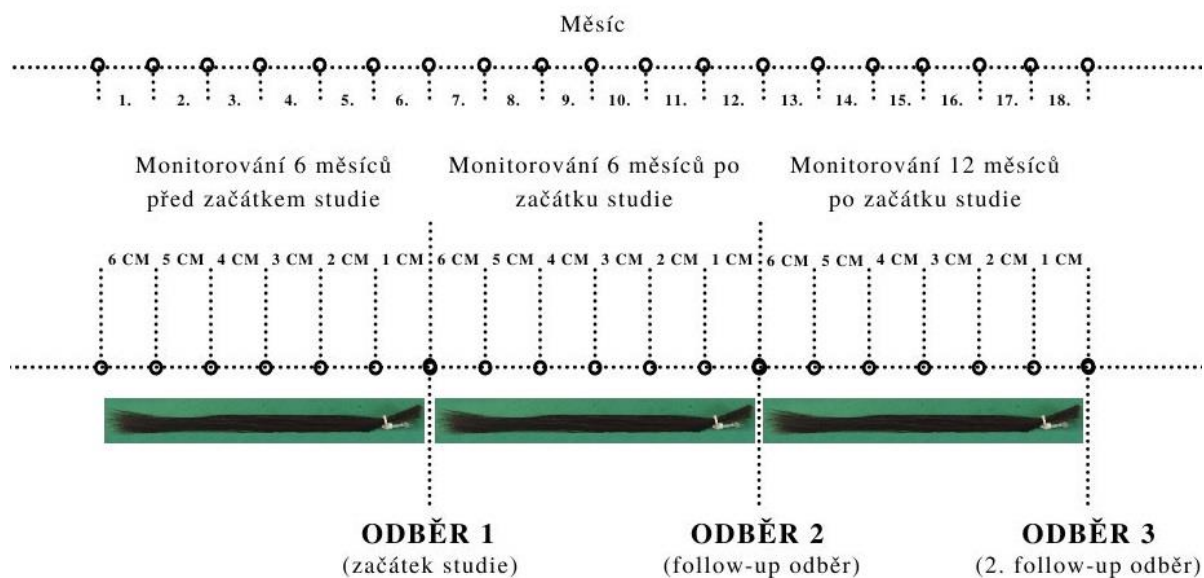
Studie Neurální mechanismy dialektické behaviorální terapie u pacientů s hraniční poruchou osobnosti zkoumala možný přínos léčby hraniční poruchy osobnosti (dále BPD) pomocí dialektické behaviorální terapie (dále DBT) v rámci 12týdenního komplexního programu. Do studie byly zařazeny následující skupiny účastníků: pacienti s BPD účastníci se programu a kontrolní skupina pacientů s BPD neúčastníci se programu. Obě skupiny byly podrobeny odběru vzorku vlasů za účelem stanovení kortizolu a vyšetření pomocí neurovizuálních metod (MR a EEG).

Odběr vzorků vlasů probíhal před MR a EEG vyšetřením ve výzkumném centru CEITEC, odkud byly následně vzorky v papírových obálcích přeneseny na Biochemický ústav LF MU. Zde byly uloženy do doby zpracování a analýzy při pokojové teplotě a bez přístupu světla.

Vylučujícím kritériem pro zařazení účastníka do studie bylo podávání kortikoidů, které by se projevilo ve výsledcích zvýšenou hladinou kortizolu, jež by neodpovídala reálné hladině kortizolu v organismu. Doposud bylo shromážděno 31 účastníků (8 ze skupiny nepodstupující terapii, 23 ze skupiny podstupující terapii). Jeden vzorek ze skupiny nepodstupující terapii byl vyřazen. Podle délky vlasů jsem vzorky nastříhala po 1 cm na 1-6 cm. Dohromady jsem zpracovala a zanalyzovala 171 segmentů ze série prvotních odběrů. Do budoucna jsou naplánovány dva follow-up odběry vždy po 6 měsících, studie tedy bude monitorovat účastníka studie po dobu 18 měsíců v případě modelové délky vlasů větší než 6 cm.

Na Obrázku 9 je graficky znázorněno sledování kortizolu v organismu pacientů (v případě modelového příkladu vlasů o minimální délce 6 cm), které analýza vzorků umožnila.

MATERIÁL, METODY A POSTUP PŘI PŘÍPRAVĚ VZORKŮ



Obrázek 9: Časová osa studie BPD monitorující koncentraci kortizolu v organismu pacientů před začátkem a v průběhu studie. Odběr 1 je proveden na začátku studie a umožňuje retrospektivně sledovat (dle délky vlasů) až 6 měsíců před začátkem terapie míru zastoupení kortizolu v organismu. Odběry 2 a 3, provedené vždy 6 měsíců po předchozím odběru, umožňují monitorovat efekt terapie. Celkově je tak sledován vývoj kortizolu v organismu po dobu 18 měsíců.

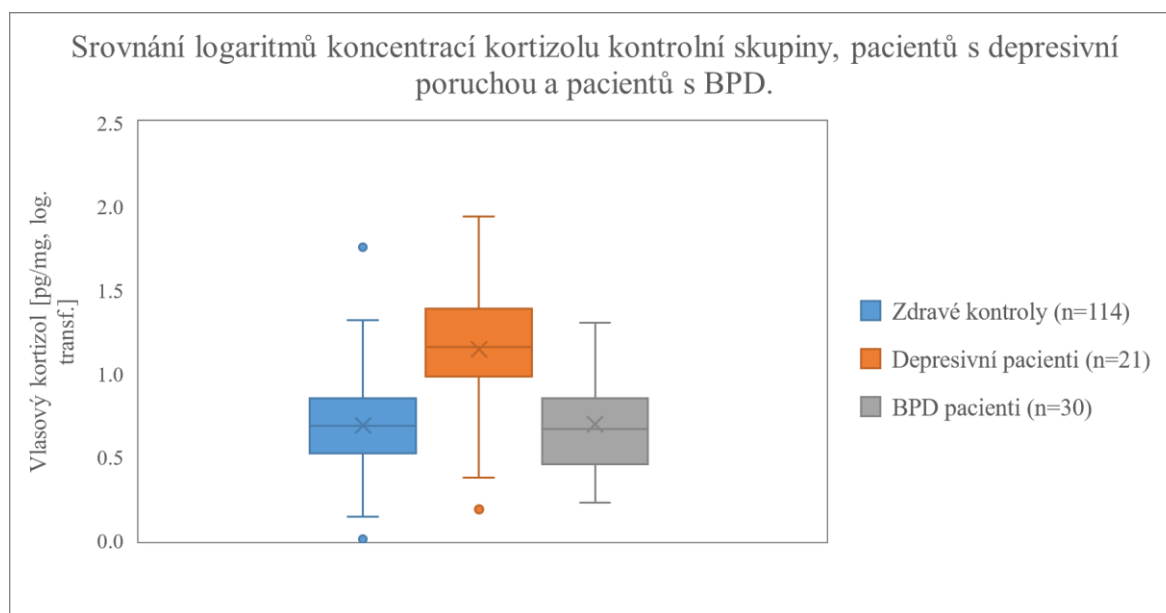
5 Výsledky

5.1 Srovnání vlasového kortizolu u depresivních pacientů a BPD pacientů se zdravými kontrolami

Pro zobrazení případného rozdílu mezi skupinami zkoumaných pacientů byly koncentrace kortizolu v prvním centimetru vlasů porovnány se zdravými kontrolami. Kontrolní skupina byla shromážděna již v rámci předchozí optimalizace metody, a proto bylo zajištěno, že budou vzorky vlasů podrobeny srovnatelnému postupu zpracování a analýzy pomocí LC-MS. Pro kontrolní skupinu bylo vybráno 114 participantů (74 žen a 40 mužů ve věku 19-27 let) z řad dobrovolníků (Kostolanska et al., 2019).

Vzhledem k tomu, že koncentrace kortizolu nekopírují normální rozdělení (výzkumy se shodují na spodní hranici 1-5 pg/mg, horní hranice však u zdravých kontrol jednoznačně nebyla stanovena a mnohdy variuje, což je znakem nenormálního rozdělení), byla data transformována na data parametrická pomocí logaritmické transformace.

Medián koncentrace v prvním centimetru vlasů byl spočítán po logaritmické transformaci a následné retransformaci výsledků. Výsledná hodnota koncentrací pro dané skupiny činila 4.85 ± 1.84 pg/mg u kontrolní skupiny, 13.90 ± 2.48 pg/mg u skupiny depresivních pacientů a 4.94 ± 1.86 pg/mg u skupiny pacientů s BPD (medián \pm směrodatná odchylka). Již z těchto výsledků bylo patrné, že intervaly koncentrací u zdravých kontrol a pacientů s BPD se překrývají, zatímco hodnoty koncentrací u depresivních poruch jsou jednoznačně vyšší. Na Obrázku 10 je srovnání koncentrací kortizolu u zdravých kontrol, depresivních pacientů a pacientů s BPD graficky znázorněno.



Obrázek 10: Srovnání logaritmů koncentrací kortizolu kontrolní skupiny, pacientů s depresivní poruchou a pacientů s BPD.

Z grafického znázornění je patrné, že i přes přítomnost odlehklých hodnot jsou koncentrace kortizolu u zdravých kontrol konzistentněji zastoupeny v rámci box zobrazení oproti BPD a depresivním pacientům. U kontrolní skupiny lze dále pozorovat menší rozptyl hodnot ve spodní hranici výsledků oproti horní hranici. U skupiny depresivních pacientů je rozptyl do spodní i horní hranice srovnatelný, u pacientů s BPD je opět patrný trend spodní hranice-nižší rozptyl jako u kontrolní skupiny.

Mimo rozptyly hodnot lze pozorovat překryv intervalů koncentrací u zdravých kontrol a pacientů s BPD, jak bylo již zmíněno výše. Samotné grafické znázornění však neumožňuje analyzovat možné trendy vývoje kortizolu ve vlasech po delší dobu, což právě retrospektivní sledování pomocí segmentace umožňuje.

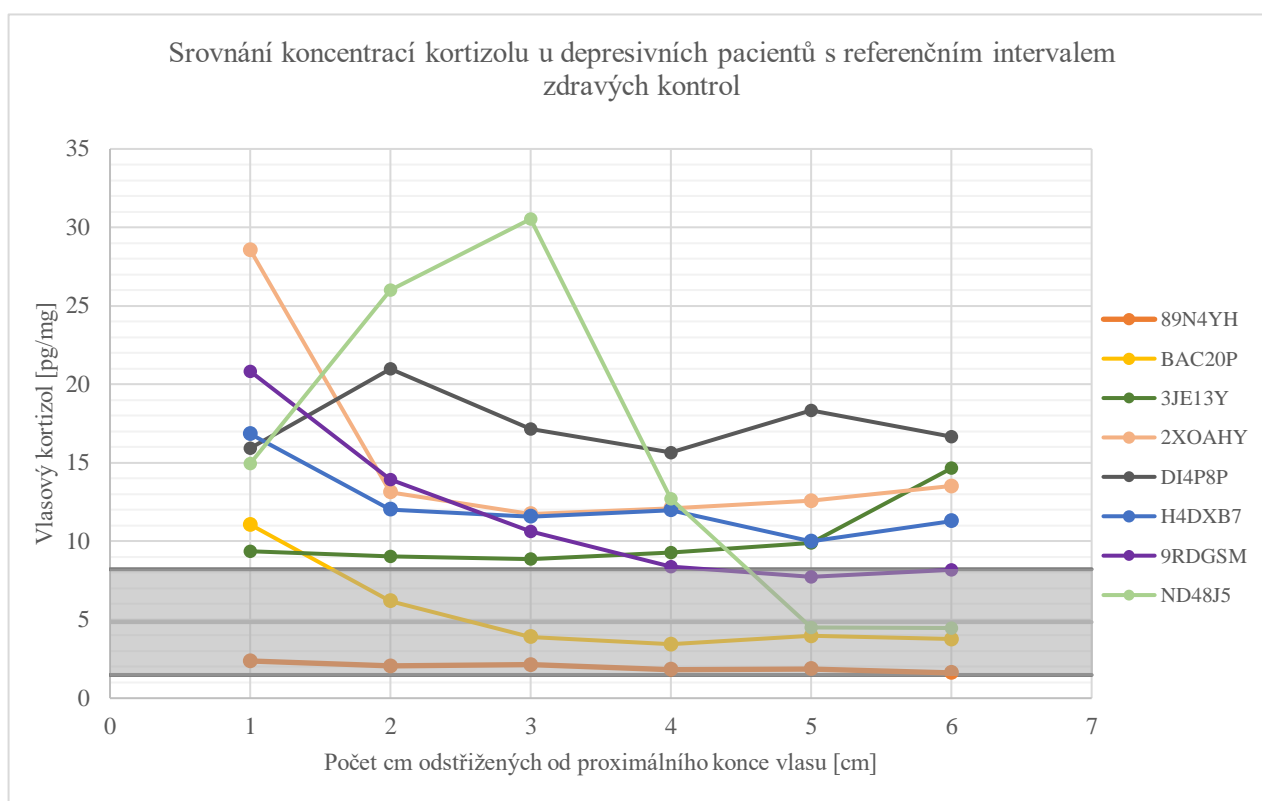
5.2 Longitudinální analýza vlasového kortizolu u depresivní poruchy

V rámci skupiny depresivní poruchy byly zanalyzovány vzorky vlasů od 21 pacientů (1 vzorek byl vyřazen). Informace o pohlaví, věku, případně o průběhu samotné poruchy u daných pacientů nebyly zjišťovány. Zaměření této práce bylo vedeno primárně k výběru vhodné analýzy výsledků vzhledem ke specifitě retrospektivní analýzy vzorků vlasů o délce 3-6 cm, a proto nebude součástí finálního vyhodnocení srovnání koncentrací kortizolu vzhledem k pohlaví či věku pacientů, případně průběhu dané zkoumané poruchy.

Po nastříhání vzorků bylo shromážděno devět pacientů s 6cm segmenty, čtyři pacienti s 5cm segmenty, tři pacienti s 4cm segmenty, tři pacienti s 3cm segmenty a dva pacienti s 2cm segmenty. U jednoho pacienta nebylo možné vzorky nastříhat kvůli krátké délce vlasů. Dohromady tak bylo vyhodnoceno pouze 21 vzorků pacientů.

Hodnoty koncentrací variovaly vzhledem ke specifitě a heterogenitě dané zkoumané poruchy, obecně však dosahovaly výrazně vyšších hodnot (13.90 ± 2.48 pg/mg) oproti zdravé kontrole, jak je znázorněno na Obrázku 10.

Vzhledem k tomu, že grafické znázornění na Obrázku 10 neumožnilo zobrazit potenciální longitudinální vývoj koncentrací kortizolu pomocí segmentace vzorků, přistoupila jsem k samostatné analýze výsledků u jednotlivých typů poruch. Na Obrázku 11 je graficky znázorněn vývoj koncentrací u modelových vzorků o minimální délce 6 cm. Právě segmentace vzorků umožnila sledovat vývoj kortizolu v organismu pacienta po dobu 6 měsíců.



Obrázek 11: Srovnání koncentrací kortizolu u vybraných depresivních pacientů se zdravými kontrolami.

Na Obrázku 11 je patrné, že koncentrace většiny modelových vzorků se pohybují mimo referenční interval zdravých kontrol. Tento trend byl již pozorován na Obrázku 10, v rámci výše uvedeného grafického znázornění však získáváme řadu nových informací o vývoji koncentrací kortizolu.

U většiny vzorků je pozorován pokles a následná stabilizace hodnot směrem k distálnímu konci vlasů. Vzorek ND48J5 se vyděluje oproti zbylým vzorkům počátečním nárůstem a následovaným prudkým poklesem koncentrace kortizolu. Informace o podobném vývoji v organismu pacienta pomocí box plot zobrazení z důvodu obecné generalizace hodnot nebyla v Obrázku 10 patrná.

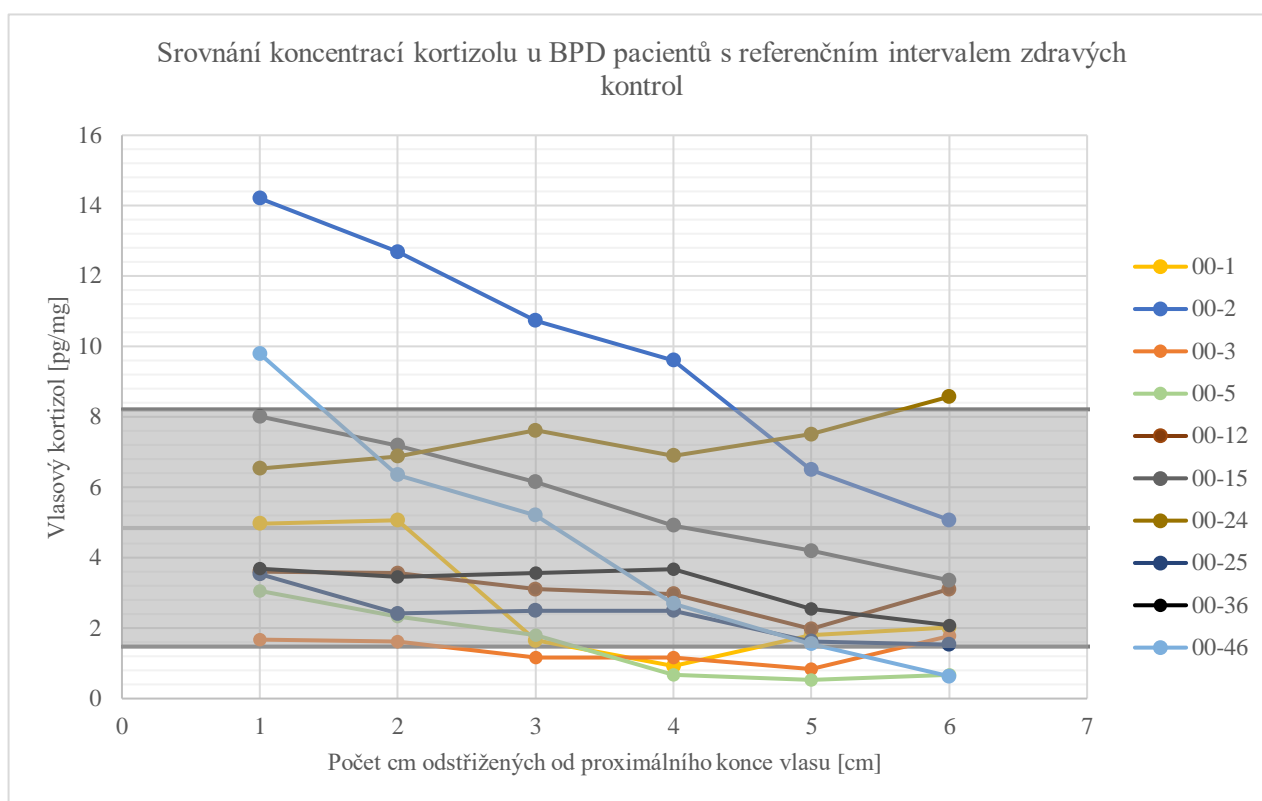
5.3 Longitudinální analýza vlasového kortizolu u hraniční poruchy osobnosti

V rámci skupiny BPD byly shromážděny a zanalyzovány vzorky vlasů od 30 pacientů (1 vzorek byl vyřazen). I když byly informace o pohlaví a věku pacientů dostupné, informace o průběhu dané poruchy zjištěny nebyly, a proto se opět v rámci analýzy vývoje kortizolu u dané poruchy přistoupilo primárně k analýze potenciálu segmentace vzorků vzhledem k získání dodatečných informací o vývoji kortizolu v organismu pacienta.

Po nastříhání vzorků bylo shromážděno dvacet pacientů s 6cm segmenty, jeden pacient s 4cm segmenty, jeden pacient s 3cm segmenty, jeden pacient s 2cm segmenty ze skupiny podstupující terapii a sedm pacientů s 6cm segmenty ze skupiny nepodstupující terapii. Vzorky pro diplomovou práci byly převzaty z odběru 1 (začátek studie, viz Obrázek 9), a tudíž byl výchozí bod pro obě skupiny jednotný. Vzhledem k tomu, že v rámci diplomové práce nebyl analyzován vývoj kortizolu vzhledem k aplikované terapii, byly skupiny pacientů podstupující a nepodstupující terapii chápány jako jedna skupina.

Hodnoty koncentrací variovaly vzhledem k heterogenitě BPD, obecně však dosahovaly výrazně nižších hodnot (4.94 ± 1.86 pg/mg) oproti skupině depresivních pacientů, přibližně však spadaly do intervalu zdravých kontrol, jak je znázorněno na Obrázku 10.

Vzhledem k tomu, že grafické znázornění pomocí box plot neumožnilo zobrazit potenciální variování hladin kortizolu v longitudinálním měřítku, bylo opět přistoupeno k analýze segmentů u jednotlivých pacientů. Na Obrázku 12 je znázorněn vývoj koncentrací kortizolu u modelových vzorků o délce vyšší než 6 cm.



Obrázek 12: Srovnání koncentrací kortizolu u vybraných BPD pacientů se zdravými kontrolami.

Na Obrázku 12 lze pozorovat vývoj koncentrací kortizolu u pacientů s danou poruchou. V rámci BPD je patrný větší překryv hodnot s referenčním intervalem zdravých kontrol, jak již bylo zmíněno u Obrázku 10, s výjimkou vzorku 00-2, který se vyděluje z intervalu zvláště v horní hranici referenčního intervalu zdravých kontrol.

Díky segmentaci vzorků je možné pomocí grafického znázornění pozorovat i podrobnější informace o hladinách kortizolu konkrétních pacientů. U většiny vzorků je patrný pokles hodnot směrem k distálnímu konci vlasů, případně stabilizace hodnot kortizolu.

6 Diskuze

I když je hormon kortizol a jeho význam v organismu znám již od roku 1946 (Timmermans et al., 2019), inkorporace kortizolu do vlasů a možné využití této vlastnosti v analýze má poměrně krátkého trvání. Až roku 2010 přišla první studie s ideou segmentové analýzy, která by umožnila sledovat vývoj kortizolu v organismu pacienta. Díky segmentaci vzorků na základě předpokládaného růstu vlasů o jeden centimetr za jeden měsíc tak bylo navrženo retrospektivní monitorování zmíněného hormonu (Thomson, 2010). I přes vysoký potenciál však segmentová analýza zůstává spíše upozaděna a bývá nahrazována měřením kortizolu ve vzorcích nesegmentovaných, případně segmentovaných po dvou až třech centimetrech, čímž však dochází ke ztrátě cenné informace měsíčního vývoje hladin tohoto hormonu.

I vzhledem ke krátké době, po kterou je studován potenciál měření kortizolu ve vlasech, nebyl doposud ustaven referenční interval pro medicínské využití. Jedinou laboratoří, která testuje vlasový kortizol a zařazuje jej do referenčního intervalu zdravých kontrol, je Rocky Mountain Analytical (<https://rma-lab.com/?myProvince=other>), která uvádí hodnoty kortizolu v rozmezí 5.9 až 22 pg/mg pro zdravou populaci. I z tohoto důvodu většina studií pracuje se skupinou zdravých kontrol, u níž ustanovuje vlastní rozmezí referenčních hodnot vlasového kortizolu. Zmíněné výzkumy se shodují na spodní hranici 1-5 pg/mg, avšak v oblasti horní hranice zjištění značně variují. Právě tato nekonzistentnost vede k závěrům, že koncentrace kortizolu pokrývají nenormální rozdělení, a proto je třeba pro jejich analýzu provést transformaci na normální rozdělení. I přesto mnohé ze studií nadále analyzují koncentrace kortizolu bez adekvátní transformace.

Zmíněná nekonzistentnost v hodnotách kortizolu u zdravých kontrol se mimo jiné pojí i s využíváním rozdílných metod analýz, mezi nimiž dominují primárně ELISA a LC-MS. ELISA stanovení se doposud potýkala s problémem zkřížené reaktivity (cross-reaktivity), která uměle navyšovala hodnoty měřeného kortizolu zejména díky přítomnému kortizonu (Gao et al., 2013). U LC-MS analýzy naopak přetrvával problém s kalibrací při použití autentického standardu a distálního vzorku vlasů jako náhradní matrice. Vzhledem k tomu, že distální konce vlasů používané pro tvorbu kalibračních vzorků mnohdy obsahují vysoké koncentrace kortizolu (1-5 pg/mg), spolehlivost této metody je diskutabilní (Binz et al., 2016; Kostolanska et al., 2019). Studie z roku 2016 však přinesla posun v oblasti LC-MS analýzy a zavedla použití náhradního analytu. Ten umožnil vytvořit kalibrační řadu s využitím značeného kortizolu, který v organismu běžně přítomný není, a byl proto při LC-MS analýze samostatně vyhodnocován nehledě na nativní kortizol (Binz et al., 2016). Následné zavedení online SPE do zmíněného postupu zpracování a analýzy vlasového kortizolu vedlo k vytvoření metody, která má vysokou validitu a potenciální širokoplošné využití (Kostolanska et al., 2019).

Vzhledem k výše popsaným parametrům byla metoda online SPE LC-MS spolu se segmentovou analýzou výsledků aplikována do této práce, zaměřené na oblast depresivní poruchy a BPD, u nichž má do budoucna potenciál vysokého uplatnění.

Na základě měření kortizolu u zmíněných skupin byly průměrné hladiny v logaritmické transformaci srovnány se skupinou kontrol (Obrázek 10), hodnoty kortizolu u kontrolní skupiny byly převzaty z dříve publikované studie využívající shodný postup a způsob analýzy (Kostolanska et al., 2019). U pacientů s BPD byl pozorován přibližný překryv hodnot s kontrolní skupinou (hodnoty mediánů činily 4.85 ± 1.84 pg/mg pro kontrolní skupinu a $4.94 \pm$

1.86 pg/mg pro skupinu pacientů s BPD), což se shoduje se závěry předchozí studie z roku 2016 (Dettenborn et al., 2016). U skupiny depresivních pacientů však byly pozorovány výrazně vyšší hladiny (13.90 ± 2.48 pg/mg) oproti kontrolní skupině. I když tyto závěry odpovídají dříve publikovaným výsledkům (Dettenborn et al., 2012), tematika depresivních poruch vzhledem k vlasovému kortizolu je poměrně nejasně prozkoumanou oblastí a výsledky studií, zaměřující se na tyto typy poruch, si mnohdy protirečí.

Vzhledem k obecné heterogenitě zkoumaných poruch bylo proto v rámci diplomové práce přistoupeno k segmentové analýze vzorků, která umožnila zobrazit konkrétní vývoj hladin kortizolu u jednotlivých pacientů. Rozdílné vývoje hladin kortizolu spolu se specifickým vývojem poruchy u konkrétního pacienta, v čemž právě v oblasti duševních poruch tkví samotný potenciál segmentové analýzy, tak nebyly zanedbány či ztraceny ve snaze generalizovat výsledky. Do budoucna je naplánována analýza pomocí smíšených modelů, která umožní detailněji porovnat skupiny depresivních pacientů a pacientů s BPD.

Postupný pokles hladin kortizolu směrem k distálnímu konci vlasů (zvláště kolem 4. až 5. centimetru) byl pozorován již v počátečních studiích (Gao et al., 2010; Kirschbaum et al., 2009) a byl potvrzen i v této práci (Obrázek 11 a 12). Výsledky se tak shodují i se závěry, že studie, které využívají isopropanol pro počáteční přečištění vzorků, tento pokles u měřených vzorků pozorují (Gao et al., 2010; Kirschbaum et al., 2009), na rozdíl od studií, které tento krok nevyužívají (Manenschijn et al., 2011; Thomson, 2010).

Mimo typický pokles hladin kortizolu byl u některých vzorků zachycen nezvyklý výkyv mimo výše popsany trend, zvláště pak u skupiny depresivních pacientů (Obrázek 11). Bez znalosti věku, pohlaví, či anamnézy pacienta nelze z podobného vývoje hladin utvářet jakékoliv závěry, lze však

předpokládat, že podobný průběh souvisí s charakterem poruchy, případně intervencí, ať už terapeutickou, či farmakologickou. V rámci budoucího výzkumu by bylo zajímavé prozkoumat, zda daný pacient procházel depresivní poruchou v prvotní fázi, při níž již v předchozích studiích zvýšené hladiny kortizolu pozorovány byly (Psarraki et al., 2021).

Cílem diplomové práce bylo v první řadě prozkoumat potenciál využití online SPE LC-MS analýzy u depresivní poruchy a BPD, a případně navrhnout vhodnější způsob analýzy výsledků. Z uvedených závěrů je patrné, že dosavadní využívání generalizovaných a průměrovaných hodnot u skupiny duševních poruch není dostačující, jelikož je v rámci této analýzy zanedbán celkový vývoj kortizolu u jednotlivých pacientů. Obecná heterogenita vývoje u zmíněných poruch přitom byla v oblasti vlasového kortizolu již prozkoumána (Psarraki et al., 2021), a proto se jeví jako vhodnější sledovat místo průměrných hladin kortizolu spíše celkový vývoj tohoto hormonu v dlouhodobém měřítku u daného pacienta. I vzhledem k tomu, že doposud nebyl pro vlasový kortizol ustanoven referenční interval pro zdravou populaci, se jeví segmentová analýza jako ideální způsob vyhodnocení výsledků. Retrospektivní sledování umožňuje sledovat celkový vývoj kortizolu a pacient se tak sám sobě stává kontrolou.

Mezi výzvy pro zmíněné retrospektivní sledování kortizolu se řadí efekt vymývání (wash-out) v distálních koncích vlasů. Některé ze studií zmiňují jako možný důvod promývání vlasů isopropanolem, který z oslabených distálních oblastí (poškozených UV zářením a častým mytím vlasů) kortizol snadněji uvolňuje (Manenschijn et al., 2011). Zabránění efektu vymývání nebo korekce na něj by vedly ke zvýšení potenciálu analýzy segmentovaných vlasů, pomocí nichž by bylo možné monitorovat hladiny kortizolu v rámci jednoho odběru po dobu delší než 6 měsíců. Díky tomu by metoda využívající matrice

DISKUZE

vlasů mohla mít v medicínském měřítku širší uplatnění, například při sledování periodických jevů (sezónní vlivy, maniodepresivní periodicita, cyklický Cushingův syndrom apod.).

7 Závěr

Cílem diplomové práce zaměřené na sledování vlasového kortizolu u pacientů s psychiatrickými poruchami bylo zhodnotit význam analýzy zmíněného hormonu s využitím online SPE LC-MS analýzy u depresivní poruchy a BPD. V teoretické části jsem nastínila charakteristiky studovaného hormonu, možné narušení jeho sekrece a dosavadní výzkumy v oblasti vlasového kortizolu s ohledem na zmíněné poruchy. Na závěr jsem uvedla nejčastěji používané metody pro analýzu vlasového kortizolu.

V praktické části jsem zpracovala a zanalyzovala pomocí SPE LC-MS analýzy vzorky vlasů od 21 pacientů s depresivní poruchou a 30 pacientů s BPD po vyřazení nevhodných či neměřitelných vzorků. Výsledné hladiny kortizolu jsem porovnávala navzájem a se skupinou zdravých kontrol z předchozí studie.

Výsledné hodnoty koncentrací činily 13.90 ± 2.48 pg/mg u depresivních pacientů a 4.94 ± 1.86 pg/mg u pacientů s BPD. Pomocí box plot zobrazení byl pozorován překryv intervalů u skupiny zdravých kontrol (4.85 ± 1.84 pg/mg) (medián \pm směrodatná odchylka) a skupiny BPD, naopak pacienti s depresivní poruchou se z pohledu koncentrace kortizolu jednoznačně lišili. Vzhledem k tomu, že zmíněná statistická analýza neumožnila vyjma průměrných hladin zobrazit i potenciální výkyvy kortizolu u jednotlivých pacientů, jsem následně provedla segmentovou analýzu vzorků, která umožnila retrospektivně sledovat vývoj hormonu až půl roku s ohledem na délku vlasů. Vzhledem ke specifitě použité matrice byly hladiny kortizolu sledovány po jednotlivých měsících.

Segmentová analýza byla zhodnocena jakožto nástroj, který umožňuje sledovat vývoj kortizolu v organismu s ohledem na heterogenitu studovaných

ZÁVĚR

psychiatrických poruch. U všech vzorků byl pozorován postupný pokles hladin směrem k distálnímu konci vlasů z důvodu wash-out efektu. Mimo to byl však u některých vzorků, zvláště u depresivních pacientů, zjištěn specifický trend variace hladin, který byl potvrzen v případě depresivní poruchy i literaturou. Do budoucna bude možné tento přístup využít pro konkrétnější sledování efektivity terapií s ohledem na věk, pohlaví a vývoj psychiatrické poruchy pacientů v rámci zmíněných výzkumů.

Použité zdroje

- Achari, A. E., & Jain, S. K. (2017). *Adiponectin , a Therapeutic Target for Obesity , Diabetes , and Endothelial Dysfunction*.
<https://doi.org/10.3390/ijms18061321>
- Aleknaviciute, J., Tulen, J. H. M., Kamperman, A. M., de Rijke, Y. B., Kooiman, C. G., & Kushner, S. A. (2016). Borderline and cluster C personality disorders manifest distinct physiological responses to psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology*, 72, 131–138.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.06.010>
- Angelousi, A., Margioris, A. N., & Tsatsanis, C. (2020). ACTH Action on the Adrenals. *Endotext*.
- Ashton, M. C. (2017). *Individual Differences and Personality* (3rd ed.). Academic Press.
- Aydin, S. (2015). Peptides A short history , principles , and types of ELISA , and our laboratory experience with peptide / protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4–15.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- Binz, T. M., Braun, U., Baumgartner, M. R., & Kraemer, T. (2016). Development of an LC–MS/MS method for the determination of endogenous cortisol in hair using ¹³C₃-labeled cortisol as surrogate analyte. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1033–1034, 65–72.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.07.041>
- Bourvis, N., Aouidad, A., Cabelguen, C., Cohen, D., & Brand, S. (2017). *How Do Stress Exposure and Stress Regulation Relate to Borderline Personality Disorder ?* 8(November), 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2017.02054>
- Britannica, T. E. of E. (n.d.). cortisol. In *Encyclopedia Britannica*.

POUŽITÉ ZDROJE

- <https://www.britannica.com/science/cortisol%0A>
- Cheer, K., & Trainer, P. J. (2014). Evaluation of pituitary function. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 124). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59602-4.00010-1>
- Cooper, G. A. A., Kronstrand, R., & Kintz, P. (2012). Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. *Forensic Science International*, 218(1–3), 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.10.024>
- Dattani, S. et al. (2021). Mental Health. *OurWorldInData.Org*. <https://ourworldindata.org/mental-health>
- Dettenborn, L., Kirschbaum, C., Gao, W., Spitzer, C., Roepke, S., Otte, C., & Wingenfeld, K. (2016). Increased hair testosterone but unaltered hair cortisol in female patients with borderline personality disorder. *Psychoneuroendocrinology*, 71, 176–179. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.05.026>
- Dettenborn, L., Muhtz, C., Skoluda, N., Stalder, T., Steudte, S., Hinkelmann, K., Kirschbaum, C., & Otte, C. (2012). Introducing a novel method to assess cumulative steroid concentrations: Increased hair cortisol concentrations over 6 months in medicated patients with depression. *Stress*, 15(3), 348–353. <https://doi.org/10.3109/10253890.2011.619239>
- Dey, S., & Noguchi, C. T. (2017). Erythropoietin and Hypothalamic–Pituitary Axis. In *Vitamins and Hormones* (1st ed., Vol. 105). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2017.02.007>
- Duesenberg, M., Wolf, O. T., Metz, S., Roepke, S., Fleischer, J., Elias, V., Renneberg, B., Otte, C., & Wingenfeld, K. (2019). Psychophysiological stress response and memory in borderline personality disorder. *European Journal of Psychotraumatology*, 10(1). <https://doi.org/10.1080/20008198.2019.1568134>

- Fink, G. (2007). *Encyclopedia of Stress, Four-Volume Set* (2nd ed.). Academic Press.
- Gao, W., Stalder, T., Foley, P., Rauh, M., Deng, H., & Kirschbaum, C. (2013). Quantitative analysis of steroid hormones in human hair using a column-switching LC – APCI – MS / MS assay. *Journal of Chromatography B*, 928, 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.03.008>
- Gao, W., Xie, Q., Jin, J., Qiao, T., Wang, H., Chen, L., Deng Huihua, H., & Lu, Z. (2010). HPLC-FLU detection of cortisol distribution in human hair. *Clinical Biochemistry*, 43(7–8), 677–682.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.01.014>
- Gerritsen, L., Staufenbiel, S. M., Penninx, B. W. J. H., van Hemert, A. M., Noppe, G., de Rijke, Y. B., & van Rossum, E. F. C. (2019). Long-term glucocorticoid levels measured in hair in patients with depressive and anxiety disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 101(July 2018), 246–252. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.11.019>
- Greff, M. J. E., Levine, J. M., Abuzgaia, A. M., Elzagallaai, A. A., Rieder, M. J., & van Uum, S. H. M. (2019a). Hair cortisol analysis: An update on methodological considerations and clinical applications. *Clinical Biochemistry*, 63(July 2018), 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.09.010>
- Greff, M. J. E., Levine, J. M., Abuzgaia, A. M., Elzagallaai, A. A., Rieder, M. J., & van Uum, S. H. M. (2019b). Hair cortisol analysis: An update on methodological considerations and clinical applications. *Clinical Biochemistry*, 63(September 2018), 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.09.010>
- Hakamata, Y., Komi, S., Moriguchi, Y., Izawa, S., & Motomura, Y. (2017). *Amygdala-centred functional connectivity affects daily cortisol concentrations : a putative link with anxiety*. May, 1–11.

- <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08918-7>
- Herane-Vives, A., de Angel, V., Papadopoulos, A., Wise, T., Chua, K. C., Strawbridge, R., Castillo, D., Arnone, D., Young, A. H., & Cleare, A. J. (2018). Short-term and long-term measures of cortisol in saliva and hair in atypical and non-atypical depression. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, *137*(3), 216–230. <https://doi.org/10.1111/acps.12852>
- Hirotsu, C., Tufik, S., & Andersen, M. L. (2015). Review article Interactions between sleep , stress , and metabolism : From physiological to pathological conditions. *Sleep Science*, *8*(3), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.slsci.2015.09.002>
- Inoue, A., Oshita, H., Maruyama, Y., Tanaka, Y., Ishitobi, Y., Kawano, A., Ikeda, R., Ando, T., Aizawa, S., Masuda, K., Higuma, H., Kanehisa, M., Ninomiya, T., & Akiyoshi, J. (2015). Gender determines cortisol and alpha-amylase responses to acute physical and psychosocial stress in patients with borderline personality disorder. *Psychiatry Research*, *228*(1), 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2015.04.008>
- Jahangard, L., Mikoteit, T., Bahiraei, S., Zamanibonab, M., Haghghi, M., Bahmani, D. S., & Brand, S. (2019). Prenatal and postnatal hair steroid levels predict post-partum depression 12 weeks after delivery. *Journal of Clinical Medicine*, *8*(9). <https://doi.org/10.3390/jcm8091290>
- Kirschbaum, C., Tietze, A., Skoluda, N., & Dettenborn, L. (2009). Hair as a retrospective calendar of cortisol production-Increased cortisol incorporation into hair in the third trimester of pregnancy. *Psychoneuroendocrinology*, *34*(1), 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.08.024>
- Kostolanska, K., Novotna, L., Taborska, E., & Pes, O. (2019). Online solid-phase extraction liquid chromatography–mass spectrometry of hair cortisol using a surrogate analyte. *Chemical Papers*, *73*(1), 151–158. <https://doi.org/10.1007/s11696-018-0560-1>

- Koumantarou Malisiova, E., Mourikis, I., Darviri, C., Nicolaides, N. C., Zervas, I. M., Papageorgiou, C., & Chrousos, G. P. (2021). Hair cortisol concentrations in mental disorders: A systematic review. *Physiology and Behavior*, 229(October 2020), 113244. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113244>
- Lebeau, M. A., Montgomery, M. A., & Brewer, J. D. (2011). The role of variations in growth rate and sample collection on interpreting results of segmental analyses of hair §. *Forensic Science International*, 210(1–3), 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.02.015>
- Lee, D.J., Kim, E, Choi, M. H. (2015). *Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress*. 48(4), 209–216.
- Li, J., Xie, Q., Gao, W., Xu, Y., Wang, S., Deng, H., & Lu, Z. (2012). Time course of cortisol loss in hair segments under immersion in hot water. *Clinica Chimica Acta*, 413(3–4), 434–440. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.10.024>
- Lila, A. R., Sarathi, V., Jagtap, V. S., Bandgar, T., Menon, P., & Shah, N. S. (2011). *Review Article Cushing ' s syndrome : Stepwise approach to diagnosis*. 15, 317–321. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.86974>
- Malhi, G. S., & Mann, J. J. (2018). Depression. *Lancet (London, England)*, 392(10161), 2299–2312. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31948-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31948-2)
- Manenschijn, L., Koper, J. W., Lamberts, S. W. J., & Van Rossum, E. F. C. (2011). Evaluation of a method to measure long term cortisol levels. *Steroids*, 76(10–11), 1032–1036. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.04.005>
- Mantella, R. C., Butters, M. A., Amico, J. A., Mazumdar, S., Rollman, B. L., Begley, A. E., Reynolds, C. F., & Lenze, E. J. (2008). Salivary cortisol is associated with diagnosis and severity of late-life generalized anxiety disorder. *Psychoneuroendocrinology*, 33(6), 773–

781. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.03.002>
- Melhem, N. M., Munroe, S., Marsland, A., Gray, K., Brent, D., Porta, G., Douaihy, A., Laudenslager, M. L., DePietro, F., Diler, R., Driscoll, H., & Gopalan, P. (2017). Blunted HPA axis activity prior to suicide attempt and increased inflammation in attempters. *Psychoneuroendocrinology*, *77*, 284–294. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.01.001>
- Michels, A., & Michels, N. (2014). Addison disease: early detection and treatment principles. *American Family Physician*, *89*(7), 563–568.
- Neary, N., & Nieman, L. (2011). *Adrenal Insufficiency- etiology, diagnosis and treatment*. *17*(3), 217–223. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e328338f608>.Adrenal
- Nicolaides, N. C., Chrousos, G. P., & Charmandari, E. (2017). Adrenal Insufficiency. *Endotext*.
- Noppe, G., Rijke, Y. B. De, Dorst, K., Akker, E. L. T. Van Den, & Rossum, E. F. C. Van. (2015). *LC-MS / MS-based method for long-term steroid profiling in human scalp hair*. 162–166. <https://doi.org/10.1111/cen.12781>
- Pitt, J. J. (2009). *Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry*. *30*(February), 19–34.
- Pletnikov, M., & Waddington, J. (2016). *Modeling the Psychopathological Dimensions of Schizophrenia: From Molecules to Behavior (Volume 23) (Handbook of Behavioral Neuroscience, Volume 23) (1st ed.)*. Academic Press.
- Pochigaeva, K., Druzhkova, T., Yakovlev, A., Onufriev, M., Grishkina, M., Chepelev, A., Guekht, A., & Gulyaeva, N. (2017). Hair cortisol as a marker of hypothalamic-pituitary-adrenal Axis activity in female patients with major depressive disorder. *Metabolic Brain Disease*, *32*(2), 577–583. <https://doi.org/10.1007/s11011-017-9952-0>

- Psarraki, E. E., Kokka, I., Bacopoulou, F., Chrousos, G. P., Artemiadis, A., & Darviri, C. (2021). Psychoneuroendocrinology Is there a relation between major depression and hair cortisol ? A systematic review and meta-analysis Quick Inventory of Depressive Symptoms. *Psychoneuroendocrinology*, *124*(December 2020), 105098. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2020.105098>
- Raff, H., & Carroll, T. (2015). *Cushing ' s syndrome : from physiological principles to diagnosis and clinical care*. *3*, 493–506. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.282871>
- Ramachandran, V. S. (2012). *Encyclopedia of Human Behavior* (2nd ed.). Academic Press.
- Ramamoorthy, S., Cidlowski, J. A., & Services, H. (2017). *Corticosteroids- Mechanisms of Action in Health and Disease*. *42*(1), 15–31. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2015.08.002.Corticosteroids-Mechanisms>
- Rinne, T., De Kloet, E. R., Wouters, L., Goekoop, J. G., DeRijk, R. H., & Van den Brink, W. (2002). Hyperresponsiveness of hypothalamic-pituitary-adrenal axis to combined dexamethasone/corticotropin-releasing hormone challenge in female borderline personality disorder subjects with a history of sustained childhood abuse. *Biological Psychiatry*, *52*(11), 1102–1112. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01395-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01395-1)
- Russell, E., Koren, G., Rieder, M., & Van Uum, S. (2012). Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology*, *37*(5), 589–601. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.09.009>
- Southwick, et al. (2003). Twenty-four-hour urine cortisol in combat veterans with PTSD and comorbid borderline personality disorder. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, *191*(4), 261–262. <https://doi.org/10.1097/01.NMD.0000061140.93952.28>

POUŽITÉ ZDROJE

- Squire, L. R. (2009). *Encyclopedia of Neuroscience (Ten Vol. Set)* (1st ed.). Academic Press.
- Stalder, T., & Kirschbaum, C. (2012). Analysis of cortisol in hair – State of the art and future directions. *Brain Behavior and Immunity*, *26*(7), 1019–1029. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.02.002>
- Stalder, T., Steudte-Schmiedgen, S., Alexander, N., Klucken, T., Vater, A., Wichmann, S., Kirschbaum, C., & Miller, R. (2017). Stress-related and basic determinants of hair cortisol in humans: A meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, *77*, 261–274. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.12.017>
- Steudte-Schmiedgen, S., Wichmann, S., Stalder, T., Hilbert, K., Muehlhan, M., Lueken, U., & Beesdo-Baum, K. (2017). Hair cortisol concentrations and cortisol stress reactivity in generalized anxiety disorder, major depression and their comorbidity. *Journal of Psychiatric Research*, *84*, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.09.024>
- Steudte, S., Kirschbaum, C., Gao, W., Alexander, N., Schönfeld, S., Hoyer, J., & Stalder, T. (2013). Hair cortisol as a biomarker of traumatization in healthy individuals and posttraumatic stress disorder patients. *Biological Psychiatry*, *74*(9), 639–646. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.03.011>
- Sugaya, N., Izawa, S., Ogawa, N., Shiotsuki, K., & Nomura, S. (2020). Association between hair cortisol and diurnal basal cortisol levels: A 30-day validation study. *Psychoneuroendocrinology*, *116*(July 2019), 104650. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2020.104650>
- Thomson, S. et al. (2010). Hair Analysis Provides a Historical Record of Cortisol Levels in Cushing's Syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, *118*(2), 133–138. <https://doi.org/10.1097/00043764-198610000-00011>
- Timmermans, S., Souffriau, J., & Libert, C. (2019). *A General Introduction*

to Glucocorticoid Biology. 10(July).

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01545>

Tomas, C., Newton, J., & Watson, S. (2013). *A Review of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function in Chronic Fatigue Syndrome*. 2013.

Wennig, R. (2000). Potential problems with the interpretation of hair analysis results. *Forensic Science International*, 107(1–3), 5–12.

[https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(99\)00146-2](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(99)00146-2)

Wester, V. L., & Rossum, E. F. C. Van. (2015). *Clinical applications of cortisol measurements in hair*. <https://doi.org/10.1530/EJE-15-0313>

Wingenfeld, et al. (2007). Overnight urinary cortisol release in women with borderline personality disorder depends on comorbid PTSD and depressive psychopathology. *European Psychiatry: The Journal of the Association of European Psychiatrists*, 22(5), 309–312.

<https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2006.09.002>

Wojcik, M., Ruszala, A., Janus, D., & Starzyk, J. B. (2019). Secondary Adrenal Insufficiency due to Intra-articular Glucocorticoid Injections. *Indian Pediatrics*, 56(3), 242–243.

Yang, J., Li, J., Xu, G., Zhang, J., Chen, Z., Lu, Z., & Deng, H. (2016). Elevated hair cortisol levels among heroin addicts on current methadone maintenance compared to controls. *PLoS ONE*, 11(3), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150729>

Elektronické zdroje:

PubChem

[<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5754>]

Rocky Mountain Analytical

[<https://rmlab.com/?myProvince=other>]