

Ewelina Dziurkowska, Paweł K. Zarzycki¹⁾

ROLA OZNACZANIA HORMONÓW STEROIDOWYCH W ŚLINIE W NOWOCZESNEJ DIAGNOSTYCE MEDYCZNEJ

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Gdańsku
Kierownik: prof. dr hab. *H. Lamparczyk*

¹⁾ Laboratorium Toksykologii Katedry Biologii Środowiskowej
Wydziału Budownictwa i Inżynierii Środowiska Politechniki Koszalińskiej
Kierownik: dr hab. *P.K. Zarzycki*

Hasła kluczowe: hormony steroidowe, ślina, analiza ilościowa, chromatografia, metody radioimmunologiczne.

Keywords: steroids hormones, saliva, quantitative analysis, chromatography, radio-immunoassay.

Hormony steroidowe, produkowane przez organizm są pochodnymi cyklopentanoperhydrofenantrenu. Prekursorem do ich biosyntezy jest cholesterol, który w wyniku działania enzymów mitochondrialnych zostaje przekształcony do pregnenolonu. Następnie produkt ten jest transportowany do cytosolu, gdzie ulega przekształceniu do progesteronu. Jest on prekursorem wszystkich hormonów steroidowych. Organizm ludzki wytwarza pięć klas steroidów: mineralokortykoidy, glukokortykoidy, estrogeny, gestageny i androgeny. Poszczególne klasy hormonów różnią się między sobą budową oraz pełnionymi funkcjami. Posiadają jednak wspólny mechanizm działania, który polega na bezpośredniej regulacji szybkości transkrypcji odpowiednich genów. Dlatego też, receptory hormonów steroidowych znajdują się wewnątrz komórek docelowych. Hormony wnikają do komórki na drodze dyfuzji biernej lub ułatwionej, aby następnie połączyć się z odpowiednim receptorem śródkomórkowym. Posiadają one dwa miejsca wiązania, do jednego z nich zostaje przyłączony hormon, do drugiego zaś nić DNA. W związku z ich bezpośrednim wpływem na ekspresję genów, efekty działania tych substancji uwidaczniają się po dłuższym czasie (kilka godzin, a nawet kilka dni), jak również utrzymują się przez kilka dni (1).

Metody oznaczania hormonów steroidowych

Najczęściej hormony steroidowe oznaczane są we krwi, zarówno w surowicy jak i osoczu. Możliwe jest także określenie ich zawartości w innym materiale biologicznym takim, jak: mocz, ekstrakty tkankowe, płyn owodniowy lub ślina (tab. I). Mimo, że stężenie sterydów w ostatnim z wymienionych materiałów jest dużo niższe niż w pozostałych, zaletą pomiarów w ślinie jest to, że może być ona pobrana w sposób nieinwazyjny oraz obserwowana jest wysoka korelacja z zawartością hormonów we krwi.

Metody oznaczania hormonów steroidowych w ślinie

Oznaczanie stężenia steroidów w ślinie umożliwia nieinwazyjne badanie poziomu tych substancji, jak również stwierdzenie, czy ulega on chwilowym zmianom oraz w jakim stopniu. Przykładowe procedury analityczne stosowane w oznaczaniu tych substancji w ślinie przedstawiono w tab. II. Najczęściej stosowanymi metodami są metody enzymatyczne (EIA), gdzie wykorzystuje się przeciwciała zwierzęce lub radioimmunologiczne (RIA) z użyciem przeciwciał znakowanych radioaktywnie. Metoda EIA

Tabela I
Przykłady oznaczania hormonów steroidowych w różnych materiałach biologicznych (2)

Table I
Examples of determinations of steroid hormones in various biological materials

Metoda	Materiał biologiczny	Oznaczany steroid	Separacja	Detekcja
HPLC	Surowica	Kortyzol	Faza stacjonarna: kolumna z wypełnieniem C ₁₈ Faza ruchoma: metanol/woda (50:50)	UV
	Plazma	17-OHP Progesteron	Faza stacjonarna: kolumna z wypełnieniem Hypersil ODS Faza ruchoma: acetonitryl/metanol/woda (25:25:50)	UV
	Kultury tkankowe	Kortyzol Testosteron DHEA progesteron	Faza stacjonarna: kolumna z wypełnieniem Apex ODS Faza ruchoma: metanol/woda (gradient w zakresie od 40 do 100% metanolu)	UV
	Mocz	Estradiol	Faza stacjonarna: kolumna z wypełnieniem żelowym TSK ODS-120T Faza ruchoma: A metanol/ bufor fosforanowy (57:43) B metanol/bufer fosforanowy (63:37)	Spektrofotometr fluorescencyjny
TLC	Tkanka tłuszczowa	Estradiol Progesteron 17-OHP	Faza stacjonarna: żel silikonowy 60 Faza ruchoma: chloroform/aceton (9:1)	UV po uprzednim spryskaniu 10% H ₂ SO ₄
	Osocze	Kortyzol	Faza stacjonarna: żel silikonowy 60 Faza ruchoma: chloroform/etanol/woda (90:10:2)	UV po uprzednim spryskaniu mieszaniną H ₂ SO ₄ i etanolu (6,5:3,5)
GC	Osocze	Estradiol	Faza stacjonarna: kolumna wypełniona żelem dimetylo-silikonowym Faza ruchoma: gazowy amoniak	MS

polega na tym, że określony antygen zostaje związany na podłożu. Następnie w czasie inkubacji specyficzne przeciwciała zostaje związane z antygenem. Kompleks antygen-przeciwciała zostaje ponownie poddane inkubacji z drugim przeciwciałem połączonym z biotyną, która może być znakowana fluorescencyjnie. Po zakończonej reakcji cały kompleks zostaje poddana inkubacji w roztworze streptowidyny związanej z enzymem lub znakowanej Europem (Eu). Metoda RIA polega na bezpośredniej inkubacji materiału biologicznego z antygenem znakowanym izotopem, najczęściej ¹²⁵I. Podczas inkubacji następuje wytrącenie kompleksu znakowany antygen-przeciwciała, a następnie mierzy się jego radioaktywność.

W praktyce klinicznej coraz częściej wykorzystuje się również metody separacyjne włączając w to: chromatografię gazową (GC) oraz różne odmiany chromatografii cieczowej takie, jak wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) oraz chromatografia cienkowarstwowa (TLC). W metodach tych ilościowej detekcji sterydów dokonuje się za pomocą detektorów płomieniowo-jonizacyjnych, spektroskopii promieniowania elektromagnetycznego w zakresie światła widzialnego, ultrafioletowego oraz bliskiej podczerwieni, spektrofлуorymetrii, spektroskopii mas oraz detektorów elektrochemicznych.

Metody separacyjne

W roku 1993 oznaczaniem hormonów steroidowych w ślinie zajmowali się *Blom* i współpr., którzy określali wpływ przechowywania śliny na stężenie progesteronu i testosteronu. W tym celu ślinianki ekstrahowano za pomocą octanu metylu, a następnie przeprowadzono oznaczanie za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Stwierdzono, że ślinianki wykazują większą aktywność metaboliczną u mężczyzn niż kobiet, zarówno w stosunku do progesteronu, jak i testosteronu (3).

Chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrem masowym zastosował w 2003 r. *Jönsson* i współpr. (4). Celem badania było określenie warunków potrzebnych do oznaczania stężenia kortyzolu w ślinie. Jako standardu wewnętrznego użyto kortyzolu znaczonego deuterem. Faza ruchoma składała się z metanolu i wody z dodatkiem 0,5% roztworu kwasu octowego, zaś kolumna była wypełniona

Tabela II
Przykładowe procedury stosowane podczas oznaczania hormonów steroidowych w ślinie

Table II
Examples of procedures used to determine steroid hormones in saliva

Metoda analizy	Analizowany hormon	Separacja	Detekcja	Piśmiennictwo (rocznik i nr)
TLC	Progesteron Testosteron	Metoda inkubacji z hormonami znakowanymi C ¹⁴ Ekstrakcja octanem metylu	Autoradiograficzna	1993 (3)
	Progesterone	Faza stacjonarna: żel silikonowy Rozpuszczalniki: pierwszy wymiar – dichlorometan-octan metylu (9:1), drugi wymiar – hexanol-hexan (1:3)	Aparat scyntygraficzny	1999 (17)
LC – MS – MS	Kortyzol	Kolumna 20 × 2,1 Faza stacjonarna: kolumna z wypełnieniem C ₈ Faza ruchoma: woda/metanol (50 : 50) z dodatkiem kwasu octowego	Spektrometria masowa	2003 (4)
RIA		Metoda z użyciem przeciwciał znakowanych I ²⁵	Licznik γ	
HPLC	Kortyzol	Ekstrakcja z użyciem rozpuszczalników organicznych i kolumny wypełnionej oktadecylsilanem	UV	1994 (5)
	Kortyzol	Faza ruchoma: A acetonitryl/woda (10:90) z dodatkiem cytrynianu sodu B acetonitryl/woda (10:90) C acetonitryl/woda (72,3:27,7) Faza stacjonarna: kolumna z wypełnieniem C ₁₈	Fluorescencyjna	1995 (28)
GC – MS	DHEA	Faza ruchoma: etanol Faza stacjonarna: 50% fenylpolisiloksan	Spektrometria masowa	2001 (7)
HPLC		Kolumna 15 × 0,25 mm Faza ruchoma: A acetonitryl/woda (15:85) B metanol Faza stacjonarna: kolumna z wypełnieniem C ₁₈	UV	
EIA	17-OHP	Nieizotopowa metoda immunologiczna z wykorzystaniem poliklonalnej surowicy anti-17-OHP	Fluorestencyjna	1998 (8)
	Kortyzol	Metoda monoklonalnych przeciwciał mysich przeciw immunoglobulinom króliczym IgG	Fluorestencyjna	2002 (11)
	Kortyzol	Test immunofluorestencyjny oparty na technologii TRACE	Fluorestencyjna	2005 (12)
RIA	Testosteron	Metoda podwójnych przeciwciał znaczonych I ²⁵	Licznik γ	1996 (14)
	Progesteron	Metoda podwójnych przeciwciał znakowanych I ²⁵	Licznik γ	2000 (19)
	Kortyzol Testosteron	Metoda z użyciem przeciwciał znakowanych I ²⁵	Licznik γ	2004 (26)
	Kortyzol	Metoda z użyciem przeciwciał znakowanych I ²⁵	Licznik γ	2006 (27)

fazą stacjonarną C₈. Separację steroidów przeprowadzono z użyciem gradientu mieszaniny metanol/woda z dodatkiem 0,5% roztworu kwasu octowego w zakresie od 50 do 100% metanolu w ciągu 3 min.

Inny typ chromatografii cieczowej został zastosowany w 1994 r. przez *Saito* i współprac., prowadzili badania z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją UV przy dł. fali

254 nm. Dotyczyły one określenia w ślinie i we krwi poziomu związanego oraz wolnego kortyzolu, gdzie stwierdzono wysoką korelację pomiędzy zawartością tego hormonu w obu płynach ustrojowych. Badano również poziom metabolitów kortyzolu w moczu. Pokreślono przydatność wybranej metody w badaniach klinicznych (5).

HPLC wykorzystali również *Vialard-Miguel* i współpracownicy w 2005 r. Zajmowali się oni wpływem substancji, które podawane są uczestnikom badań, aby spowodować wzrost wydzielania śliny (6). W tym wypadku dotyczyło to wpływu soku cytrynowego na detekcję kortyzolu. W celu potwierdzenia swojej teorii posłużyli się oni dwoma metodami analitycznymi. Ekstrakcję przeprowadzono za pomocą dichlorometanu, a następnie do próbek dodano steroidu znakowanego trytem. Stężenie hormonu było określane za pomocą RIA oraz HPLC z detekcją fluorestencyjną. Stwierdzono, że w przypadku metody radioimmunologicznej zakwaszenie śliny spowodowało zmniejszenie detekcji hormonu. W metodzie chromatograficznej użycie soku wpłynęło tylko na zmniejszenie piku znakowanego steroidu.

Wśród metod separacyjnych wykorzystywana była również chromatografia gazowa. Za jej pomocą badano stężenie dehydroepiandrosteronu (DHEA). Zaobserwowano, że u osób chorujących na depresję występuje obniżenie poziomu tego hormonu, przy równoczesnym wzroście wydzielania kortyzolu. Stwierdzono, że podwyższone stężenie kortyzolu może powodować trudności w nauce oraz zaburzenia pamięci. DHEA posiada właściwości antyglukokortykoidowe, które mogą wpływać hamująco na szkodliwe działanie kortyzolu i działać ochronnie na mózg. Ochronne działanie DHEA chciano również wykorzystać przy leczeniu choroby *Alzheimer*a. Zaobserwowano, że w przypadku wspomnianego schorzenia następuje wzrost poziomu tego hormonu oraz jego głównego metabolitu – 7α -OH-DHEA. Badania potwierdzające tę teorię przeprowadzili między innymi *Hill* i współpracownicy w 2001 r. (7). Zajmowali się oni oznaczaniem DHEA oraz jego metabolitu w ślinie, przy pomocy GC-MS oraz we krwi z użyciem metody RIA. Ekstrakcje próbek przeprowadzono za pomocą eteru dietylowego oraz etanolu, a jej skuteczność została potwierdzona poprzez analizę HPLC. Następnie steroidy zostały uPOCHODNIONE, a ich stężenie oznaczono za pomocą chromatografii gazowej. W badaniu potwierdzono wysoką korelację pomiędzy stężeniami steroidów w obu płynach ustrojowych, zarówno dla DHEA jak również jego metabolitu, 7α -OH-DHEA. Dodatkowo stwierdzono, że produkcja omawianych steroidów jest większa u mężczyzn niż u kobiet.

Metody nieseparacyjne

Wśród metod nieseparacyjnych w celu oznaczenia poziomu steroidów stosowane są metody enzymatyczne (EIA) oraz radioimmunologiczne (RIA), (tab II). W 1998 r. *Dressendorfer* i współpracownicy oznaczali w ślinie poziom 17-hydroxyprogesteron (17-OHP) za pomocą niezotopowej metody immunologicznej z wykorzystaniem specyficznej poliklonalnej surowicy odpornościowej anti-17-OHP, biotyny połączonej z 17-OHP, jako znacznika oraz sondy wtórnej – streptowidyny znakowanej Europem (Eu) (8). Detekcję wykonano metodą fluorymetryczną. Podczas badania określono preferencyjne poziomy tego hormonu dla różnych grup wiekowych oraz stwierdzono, że występuje okołodobowy cykl wydzielania 17-OHP charakterystyczny dla badanych probantów zależny od wieku.

Podobną metodę lecz z użyciem przeciwciał zwierzęcych i detekcją fluorestencyjną zastosowali w 2000 r. *Heuser* i współpracownicy przy oznaczaniu stężenia kortyzolu w ślinie (9). Badania te miały na celu określenie roli receptorów mineralokortykoidowych na wydzielanie tego hormonu u osób starszych. W tym celu probantom podawano spironolakton, a następnie badano poziom ACTH oraz kortyzolu we krwi i ślinie. Stwierdzono, że u osób starszych nastąpił wzrost wydzielania kortyzolu, zaś ACTH pozostało na stałym poziomie. Podobnego wpływu spironolaktonu nie obserwowano u grupy kontrolnej, którą stanowiły osoby młode.

Metoda EIA została również wykorzystana przez *Neudecka* i współpracownicy w 2001 r., podczas oznaczania wpływu deksametazonu na wydzielanie kortyzolu u chorych na bulimię (10). Oznaczenie prowadzono w ślinie za pomocą metody immunologicznej z detekcją fluorestencyjną, gdzie wprowadzono fluorestencyjnie znakowaną biotynę oraz streptowidynę znakowaną Europem (Eu). Stwierdzono, że poziom kortyzolu nie uległ zmianie lub tylko w nieznacznym stopniu, pod wpływem deksametazonu u chorych na bulimię z niskim wskaźnikiem masy ciała (BMI). W tej grupie badanych znalazły się również kobiety, u których wystąpił w przeszłości chorowały na anoreksję.

Wpływ deksametazonu na wydzielanie kortyzolu był również badany w 2002 r. przez *Baghai* i współpracownicy (11). W tym wypadku badaniu byli poddani pacjenci cierpiący na depresję lub chorobę afektywną dwubiegunową. Wiadomo, że w przebiegu tych chorób następuje wzrost wydzielania kortyzolu. Badanie miało na celu stwierdzenia w jakim stopniu terapia antydepresyjna wpływa na obniżenie tego steroidu oraz potwierdzenie korelacji pomiędzy zmianami stężenia kortyzolu we krwi

oraz ślinie. Oznaczanie było prowadzone za pomocą metody fluorescencyjno-immunologicznej z użyciem monoklonalnych przeciwciał mysich przeciw króliczej immunoglobulinie IgG.

W 2005 r. *Jacobs* i wspólr. oznaczali stężenie kortyzolu w ślinie również za pomocą metody immunologicznej (12). Badaniu poddane zostały kobiety, które miały za zadanie zbierać materiał o różnych porach przez 5 kolejnych dni. Ochotniczki nie znały jednak dokładnej godziny, a były one informowane za pomocą sygnału z zegarka. Czas, jaki upłynął od sygnału do wstawienia próbki ze śliny do lodówki był monitorowany. Stwierdzono, iż dzienny profil uwalniania kortyzolu nie różnił się w tym przypadku od wcześniej opisywanych w literaturze.

W 2005 r. *Hucklebridge* i wspólr. porównywali cykliczność wydzielania kortyzolu oraz DHEA (13). Oznaczanie to przeprowadzono w ślinie, również przy użyciu metody immunologicznej (EIA). Dla potwierdzenia otrzymanych wyników podobne badanie zostało wykonane we krwi. W obu przypadkach stwierdzono wysoką korelację pomiędzy otrzymanymi wynikami. Potwierdzili oni, że krótko po przebudzeniu następuje wzrost wydzielania kortyzolu. DHEA wykazywał mniejsze wahania w ciągu dnia i nie obserwowano również wpływu przebudzenia na wzrost jego stężenia w płynach ustrojowych.

Najpopularniejszą z nieseparacyjnych metod stosowanych w celu ilościowego oznaczenia steroidów w ślinie jest metoda RIA. W roku 1996 *Rilling* i wspólr. oznaczali testosteron u mężczyzn w różnym wieku, w celu określenia korelacji pomiędzy jego stężeniem w ślinie i krwi oraz możliwości oznaczania biodostępności tego hormonu w obu płynach ustrojowych (14). Zastosowaną metodą analityczną była RIA z wykorzystaniem podwójnych przeciwciał znakowanych radioaktywnym jodem ^{125}I . Została ona zmodyfikowana tak, by umożliwić oznaczanie hormonu w ślinie. Podczas badania stwierdzono, że możliwa jest obserwacja zmian stężenia testosteronu zarówno we krwi, jak i ślinie. Jednak oba płyny ustrojowe nie są wyznacznikami biodostępności tego hormonu. Zauważono również, że występuje ścisła, odwrotna korelacja pomiędzy zawartością globuliny (SHBG) wiążącej testosteron we krwi, a jego stężeniem w ślinie, co może być wykorzystane podczas badania biodostępności tego hormonu.

W roku 1998 *Hucklebridge* i wspólr. (15) badali w ślinie, przy użyciu metody radioimmunologicznej, wpływ zwiększonego wydzielania kortyzolu na wzrost stężenia immunoglobuliny A oraz czy obie te substancje wykazują cykliczność uwalniania. Stwierdzono, że stężenie kortyzolu wzrastało w ciągu ok. 0,5 godz. po przebudzeniu, zaś immunoglobuliny w tym samym odstępie czasu wykazywało spadek. Zauważono również, że w ciągu dnia wydzielanie obu tych substancji jest podobne.

W 1999 r. *Gonzalez-Bono* i wspólr. zajmowali się określeniem wpływu nastroju na wydzielanie testosteronu oraz kortyzolu (16). Badania zostały przeprowadzone na dwóch drużynach koszykarzy, u których badano stężenia hormonów w ślinie po zakończeniu meczu. Poziom testosteronu był określany za pomocą metody RIA. Próbki śliny po pobraniu ekstrahowano eterem. Następnie supernatant oddzielono poprzez wymrożenie. Po odparowaniu dodano testosteronu znakowanego jodem ^{125}I i przeniesiono do roztworu zawierającego specyficzne przeciwciała. Inkubacja została przeprowadzona w temp. 37°C przez 2 godz., a następnie oznaczono poziom hormonu, używając licznika promieniowania gamma (γ). Procedura dotycząca oznaczania kortyzolu w ślinie była podobna. Do próbki śliny znakowanego kortyzolu i jednogodzinnej inkubacji ze specyficznymi przeciwciałami króliczymi. Pod koniec dodano polietylenoglikol i odwirowano próbki, a następnie oznaczono poziom promieniowania gamma. Nie stwierdzono znaczącego wzrostu wydzielania hormonów pod wpływem zmieniającego się u sportowców nastroju zarówno w przypadku zwycięzców, jak i pokonanych. Niewielki wpływ na stężenia testosteronu odnotowano wraz z długością trwania meczu i jego wynikiem. Wzrost wydzielania tego hormonu odnotowano u zwycięzców, zaś jego spadek u pokonanych. Natomiast stężenie kortyzolu nieznacznie wzrastało u obu drużyn.

Natomiast *Laine* i wspólr. również 1999 r. badali zmiany stężenia progesteronu i jego metabolitów w ślinie podczas jej przechowywania (17). W tym celu próbki zostały podzielone na dwie części. Pierwsza z nich była poddana inkubacji ze znacznym progesteronem bezpośrednio po jej otrzymaniu. Druga część najpierw była wirowana, a następnie supernatant został poddany inkubacji. Pozostały osad był zamrożony na dwa miesiące, aby po tym czasie mógł być rozmrożony i uzupełniony do obj. 5 cm^3 za pomocą buforu sacharozowego i poddany inkubacji z radioaktywnym progesteronem. Po inkubacji próbki zostały oczyszczone za pomocą chromatografii cienkowarstwowej, a następnie trzykrotnie ekstrahowane octanem metylu. Faza wodna, w której mogły znajdować się rozpuszczalne w wodzie pochodne steroidów, została poddana analizie za pomocą β -spektrometru. Faza organiczna została poddana ponownemu rozdzielaniu za pomocą metanolu i hekanu. Dzięki czemu otrzymano oddzielnie wolne steroidy oraz ich lipidowe metabolity. Następnie wszystkie trzy grupy związków zostały oznaczona za pomocą scyntylatora. Frakcja wolnych steroidów podlegała dalszym badaniom przy

użyciu TLC. Jako rozpuszczalniki zastosowano dichlorometan i octan metylu (9:1) w pierwszym wymiarze oraz hexanol – hexan (1:3) w drugim. Autoradiogramy zostały wykonane na błonach rentgenowskich podczas 30-dniowej ekspozycji. Po wybarwieniu plam za pomocą mieszaniny etanolu, bezwodnika octowego i kwasu siarkowego mierzono ich radioaktywność scyntylatorem. Badaniem tym udowodniono, że ślina posiada nieznaczne właściwości metaboliczne mogące wpływać na zawartość hormonów. Szybkość zachodzących w niej reakcji rozkładu zależy od ilości komórek zawartych w próbce.

Badanie kortyzolu w połączeniu z oznaczaniem poziomu DHEA w ślinie za pomocą metody RIA, zostało prowadzone u osób chorych na depresję przez *Michael* i współpr. w 2000 r. (18). Miało ono na celu stwierdzenie, czy u chorych z tym schorzeniem, oprócz zwiększonego wydzielania kortyzolu, następuje również wzrost stężenia DHEA. Wśród ochotników znajdowały się za równo osoby chore, jak też będące w remisji, zaś próbę kontrolną stanowili zdrowi ochotnicy. Stwierdzono, że stosunek molowy kortyzol/DHEA był wyższy u osób chorych na depresję. Jednakże stężenie samego DHEA nie było podwyższone, co mogło być spowodowane stosowaniem przez probantów leków przeciwdepresyjnych. Silnie zaś był zaznaczony wzrost wydzielania drugiego z badanych steroidów. Potwierdzono również wysoką korelację pomiędzy wynikami badania zawartości hormonów w ślinie oraz we krwi. Oznaczanie kortyzolu w ślinie zostało przeprowadzone przy użyciu enzymatycznie znaczonego immunosorbentu. DHEA był oznaczany metodą radioimmunologiczną, poprzedzoną ekstrakcją próbki w mieszaninie hekanu i eteru (4:1).

W roku 2000 *Hausmann* i współpr. zajmowali się wpływem progesteronu na występowanie asymetrii mózgu (19). Badaniu zostały poddane trzy różne grupy osób (młode kobiety normalnie miesiączkujące, młodzi mężczyźni oraz kobiety w okresie menopauzy). Oznaczanie progesteronu w ślinie prowadzone było z wykorzystaniem metody RIA, którą przystosowano do prowadzenia badań w tym płynie fizjologicznym poprzez wydłużenie czasu inkubacji oraz zwiększenie użytej próbki. Stwierdzono, że występuje znacząca interakcja pomiędzy stężeniem tego hormonu, a zachodzącymi zmianami w mózgu. Najbardziej wpływ ten uwidocznił się u młodych kobiet, u których występują duże wahania wydzielanych hormonów podczas cyklu. Przypuszcza się, że progesteron wywiera wpływ na lateralizację. Jego wysoki poziom polepsza prace lewej półkuli mózgu oraz zmniejsza asymetrię pomiędzy półkulami. U pozostałych badanych grup, gdzie poziom progesteronu nie ulega tak dużym wahanom nie stwierdzono różnic w lateralizacji.

W roku 2001 *Johansson* i współpr. wykorzystali metodę RIA, podczas oznaczania stężenia kortyzolu w ślinie u chorych na dystrofię mięśni (20). Badali oni zaburzenia wydzielania i metabolizmu kortyzolu oraz ACTH, wynikające z genetycznych mutacji enzymów uczestniczących w tych procesach. Oznaczali oni również stężenie kortyzolu we krwi oraz jego metabolitów w moczu. Stwierdzono, iż u chorych na dystrofię, za równo u mężczyzn jak i u kobiet, występuje podwyższony poziom kortyzolu. Nie ulega natomiast zmianie wydzielanie ACTH.

W 2001 r. *Gröschl* i współpr. prowadzili badania nad wpływem przechowywania śliny, jak również zawartych w niej substancji takich jak jedzenie, czy dostarczanych podczas higieny jamy ustnej na wyniki oznaczanych hormonów (21). Określali oni poziom kortyzolu, progesteronu oraz jego metabolitu 17-OH-progesteronu za pomocą metody RIA zmodyfikowanej tak, aby możliwe było prowadzenie badań w ślinie. Dowiedli oni, iż na wydzielanie omawianych hormonów nie miało wpływu ani jedzenie zawarte w pobranej ślinie, ani też codzienna higiena jamy ustnej. Natomiast znaczący spadek poziomu steroidów stwierdzono w próbkach, które były przechowywane w różnych warunkach przez okres 3 tygodni.

Metoda RIA została również wykorzystana przez *Berg* i współpr., którzy w 2001 r. badali zmiany testosteronu, kortyzolu i estradiolu u mężczyzn, podczas trwającej ciąży u ich partnerek (22). Próbki śliny były pobierane przez cały okres ciąży oraz 3 miesiące po urodzeniu się dziecka. Badanie testosteronu i kortyzolu było przeprowadzone przy użyciu radioaktywnego jodu i metody RIA. Przeciwciała użyte podczas inkubacji mogły rozpoznać zarówno wolne jak i związane z białkami steroidy. Jednakże oznaczanie hormonów w ślinie wykluczało frakcję związaną. Oznaczanie estradiolu zostało natomiast przeprowadzone przy użyciu RIA, w której wykorzystano przeciwciała znakowane Trytem (^3H). Ekstrakcję próbek przeprowadzono przy pomocy eteru dietylowego. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, u mężczyzn podczas trwania ciąży ich partnerek następuje spadek wydzielania testosteronu oraz kortyzolu. Przy czym na tydzień przed planowanym rozwiązaniem u niektórych z nich następował wzrost wydzielania kortyzolu. Jednocześnie zauważono wyższe stężenie estradiolu u mężczyzn podczas trwania ciąży. Jednakże w niektórych przypadkach poziom ten ulegał obniżeniu około ósmego miesiąca ciąży i ponownie wzrastał po narodzinach dziecka. Nie są znane

przyczyny zmian hormonalnych występujące w organizmach mężczyzn. Przypuszcza się, iż ma to związek z przygotowaniem organizmu do pełnienia roli ojca.

W 2002 r. *Young* i współpr. zajmowali się oznaczaniem kortyzolu i DHEA w ślinie (23). Badanie dotyczyło stężenia tych hormonów u osób z depresją nie stosujących leków. Stwierdzono, że podwyższone stężenie kortyzolu może powodować trudności w nauce oraz zaburzenia pamięci. DHEA posiada właściwości antyglukokortykoidowe, które mogą wpływać hamująco na szkodliwe działanie kortyzolu i działać ochronnie na mózg. Badanie potwierdziło, że u osób z depresją, u których nie stosowano farmakoterapii występuje podwyższone stężenie DHEA, co może być wykorzystane jako wskaźnik podczas diagnozowania tego schorzenia. Możliwe jest również podawanie tego związku w celu ograniczenia deficytu poznawczego w depresji. Oznaczanie zostało przeprowadzone przy pomocy metody radioimmunologicznej, poprzedzonej ekstrakcją w mieszaninie hexanu i eteru (4:1).

Wpływem progesteronu na stężenie innych substancji w ustroju zajmował się w 2002 r. *Gröschl*, który określał się korelację pomiędzy wydzielanym steroidem a leptyną (24). Obie substancje oznaczane były w ślinie za pomocą metody RIA. Badaniu zostały poddane młode kobiety, regularnie miesiączkujące. Stwierdzono, że wydzielanie leptyny odznacza się cyklicznością. Najniższe stężenie tego związku występuje podczas fazy folikularnej. Najwyższe natomiast w fazie lutealnej, pomiędzy 15 a 17 dniem cyklu. Wydzielanie progesteronu charakteryzuje się również cyklicznością, a wzrost wydzielania przypada pomiędzy 15 a 26 dniem. Zaobserwowano również dużą korelację pomiędzy stężeniem obu wydzielanych substancji. Przypuszcza się, iż leptyna odgrywa ważną rolę w procesie rozmnażania, gdyż wykazuje działanie proliferacyjne na komórki, a jej receptory wykryto między innym w endometrium.

Natomiast w roku 2003 *Elzinga* i współpr. wykorzystali metodę RIA podczas badania wpływu stresujących przeżyć na wzrost wydzielania kortyzolu (25). W doświadczeniu uczestniczyły kobiety, które w dzieciństwie lub młodości doświadczyły przemocy. Oznaczanie steroidu prowadzono w ślinie z wykorzystaniem przeciwciał znakowanych I^{125} . Wybór metody oznaczania nie był przypadkowy. Starano się, aby na wynik badania nie miały wpływu inne czynniki, dlatego też zrezygnowano z badania kortyzolu we krwi. Stres u pacjentek był wywoływany poprzez przywoływanie ich własnych traumatycznych przeżyć. Stwierdzono, że pod wpływem stresu, możliwy był wzrost wydzielania kortyzolu nawet o 122% w stosunku do próby kontrolnej.

W 2004 r. *Maso* i współpr. zajmowali się oni określeniem korelacji pomiędzy ilością treningów i nastawieniem do meczu oraz wydzielaniem kortyzolu i testosteronu (26). Badania zostały przeprowadzone w grupie czynnie trenujących rugbyistów, od których raz w tygodniu 3 razy dziennie pobierano próbki śliny oraz wypełniali oni kwestionariusz dotyczący ich kondycji. Oznaczanie stężenie obu hormonów przeprowadzono przy użyciu metody RIA. Wyniki potwierdziły, iż pozytywne nastawienie psychiczne nie ma znaczącego wpływu na wydzielanie kortyzolu, a tylko niewielki wzrost stężenie zaobserwowano w przypadku testosteronu.

W 2006 r. *Marcus-Perlman* i współpr. również za pomocą RIA potwierdzili wysoką korelację pomiędzy zawartością kortyzolu we krwi oraz w ślinie (27). Zmodyfikowali oni metodę radioimmunologiczną tak, aby móc zastosować ją do oznaczania stężenia hormonu w ślinie. W tym celu wydłużyli oni czas inkubacji oraz zwiększyli objętość analizowanej próbki. Wzrost wydzielanego hormonu w obu płynach ustrojowych badano po podawaniu ochotnikom niewielkich dawek ACTH.

Metoda oznaczania hormonów steroidowych w ślinie pozwala na nieinwazyjne monitorowanie zmian zachodzących w stężeniu tych substancji pod wpływem różnych czynników. Jak wcześniej wspomniano niektóre z nich, np.: kortyzol mogą ulegać podwyższeniu podczas sytuacji sterowych, co ma miejsce przy pobieraniu krwi. Dodatkowo, metoda ta pozwala na prowadzenie normalnego trybu życia i nie wymaga pobierania próbek w laboratorium czy dodatkowego osprzętu. Probant może sam pobierać i gromadzić próbki, a następnie przekazywać większą ich liczbę do analizy. Analiza steroidów może być przeprowadzana na kilka sposobów, jednakże możliwe jest tylko oznaczenie tym sposobem frakcji steroidów nie związanych z białkami. Co uniemożliwia określenie całkowitego ich stężenia w organizmie. Jednakże stwierdzono, iż dzięki dużej korelacji, jaka pojawia się pomiędzy zawartością hormonów w ślinie i we krwi, możliwe jest prowadzenie obserwacji zmian tych hormonów. Przeprowadzane badania miały na celu m.in. określenie zmian wydzielania hormonów, jakie zachodzą w stanach chorobowych, takich jak depresja. Czy oznaczenie wzajemnych zależności pomiędzy stężeniami poszczególnych hormonów, jak również wpływu innych substancji w organizmie na wzrost czy spadek zawartości steroidów.

PODSUMOWANIE

Oznaczanie hormonów steroidowych w ślinie pozwala na szybkie oraz nieinwazyjne określenie ich poziomu w organizmie. Najczęściej oznaczanym steroidem jest kortyzol, a jego stężenie określano wszystkimi wyżej opisanymi metodami. Wynika to głównie z faktu, że w ślinie występuje on w stosunkowo wysokim stężeniu oraz ma duże znaczenie w diagnostyce medycznej.

Wśród stosowanych metod analitycznych do oznaczania sterydów najpowszechniej używana jest RIA, która pozwala na oznaczenie większości hormonów steroidowych. Najczęściej jako znacznik stosowany jest radioaktywny jod ^{125}I . Możliwe jest również przeprowadzenie badania przy użyciu trytu ^3H , w szczególności gdy określane jest stężenie estrogenów.

W praktyce klinicznej metody separacyjne są stosowane rzadziej niż powyższe. Wynika to głównie z bardziej złożonych procedur analitycznych. Najmniej wykorzystywana jest chromatografia gazowa, ponieważ omawiane hormony są najczęściej małowolne oraz niestabilne w wysokich temperaturach. Metoda chromatografii cieczowej, jako najczęściej stosowana z metod separacyjnych pozwala na szybkie i czułe oznaczenie jakościowe i ilościowe steroidów oraz ich metabolitów. Polecana jest szczególnie w przypadku oznaczania hormonów w badaniach typu metabolomika oraz podczas wykrywania anaboliów u sportowców.

E. Dziurkowska, P.K. Zarzycki

THE ROLE OF DETERMINATIONS OF STEROID HORMONES
IN THE SALIVA IN MODERN MEDICAL DIAGNOSTICS

PIŚMIENNICTWO

1. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.: *Biochemia Harpera*. Wydawnictwo Lekarskie, wyd. V, PZWL, Warszawa 2000; 709-726: 734-753. – 2. Lamparczyk H.: Analysis and characterization of steroids. Sherma J.: CRC Press Boca Raton. 1992; 84-94: 98-117. – 3. Blom T., Ojanotko-Harri A., Laine M., Huhtaniemi I.: Metabolism of progesterone and testosterone in human parotid and submandibular salivary glands in vitro. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 1993; 44:69-76. – 4. Jönsson B.A.G., Malmberg B., Amilon Å., Garde A.H., Ørbæk P.: Determination of cortisol in human saliva using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2003; 784: 63-68. – 5. Saito Z., Takeda R.: Analysis of synthetic corticoids by high performance liquid chromatography. *Nippon Rinsho*, 1994; 52(3): 653-659. – 6. Vialard-Miguel J., Belaidi N., Lembeye L., Corcuff J.B.: Lemon juice alters cortisol assays in saliva. *Clin. Endocrinol.*, 2005; 63: 478-479. – 7. Hill M., Lapčik O., Havlíková H., Morfin R., Hampl R.: 7-Hydroxydehydroepiandrosterone epimers in human serum and saliva comparison of gas chromatography-mass spectrometry and radioimmunoassay. *J. Chromatogr. A.* 2001; 935: 297-307. – 8. Dressendorfer R.A., Strasburger C.J., Bidlingmaier F., Klug I., Kistner A., Siebler T., Kiess W.: Development of a highly sensitive nonisotopic immunoassay for the determination of salivary 17-hydroxyprogesterone: reference throughout childhood and adolescence. *Pediatr Res.*, 1998; 44: 650-655. – 9. Heuser I., Deuschle M., Weber A., Kniest A., Ziegler C., Weber B., Colla M.: The role of mineralocorticoid receptors in the circadian activity of the human hypothalamus-pituitary-adrenal system: Effect of age. *Neurobiol. Aging.* 2000; 21: 585-589. – 10. Neudeck P., Jacoby G.E., Florin I.: Dexamethasone suppression test using saliva cortisol measurement in bulimia nervosa. *Physiol. Behav.*, 2001; 72: 93-98.
11. Baghai T.C., Schüle C., Zwanzger P., Minov C., Holme C., Padberg F., Bidlingmaier M., Strasburger C.J., Rupprecht R.: Evaluation of a salivary based combined dexamethasone/CRH test in

patients with major depression. *Psychoneuroendocrinology*, 2002; 27: 385-399. – 12. *Jacobs N., Nicolson N.A., Derom C., Delespaul P., van Os J., Myin-Germeys I.*: Electronic monitoring of salivary cortisol sampling compliance in daily life. *Life Sci.*, 2005; 76: 2431-2443. – 13. *Hucklebridge F., Hussain T., Evans P., Clow A.*: The diurnal patterns of the adrenal steroids cortisol and dehydroepiandrosterona (DHEA) in relation to awakening. *Psychoneuroendocrinology*, 2005; 30: 51-57. – 14. *Rilling J.K., Worthman C.M., Campbell B.C., Stallings J.F., Mbizva M.*: Ratios of plasma and salivary testosterone throughout puberty: Production versus bioavailability. *Steroids*, 1996; 61: 374-378. – 15. *Hucklebridge F., Clow A., Evans P.*: The relationship between salivary secretory immunoglobulin A and cortisol: neuroendocrine response to awakening and the diurnal cycle. *Int. J. Psychophysiol.*, 1998; 31: 69-76. – 16. *Gonzalez-Bono E., Salvador A., Serrano M.A., Ricarte J.*: Testosterone, cortisol and mood in a sport team competition. *Horm Behav*, 1999; 35: 55-62. – 17. *Laine M.A., Ojanotko A.O.*: Progesterone metabolism in human saliva in vitro. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1999; 70: 109-113. – 18. *Michael A., Jenaway A., Paykel E.S., Herbetr J.*: Altered salivary dehydroepiandrosterone levels in major depression in adults. *Biol. Psychiatry*, 2000; 48: 989-995. – 19. *Hausmann M., Güntürkün O.*: Steroids fluctuations modify functional cerebral asymmetries: the hypothesis of progesterone-mediated interhemispheric decoupling. *Neuropsychologia*, 2000; 38: 1362-1374. – 20. *Johansson Å., Andrew R., Forsberg H., Cederquist K., Walker B.R., Olsson T.*: Glucocorticoid metabolism and adrenocortical reactivity to ACTH in Myotonic Dystrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001; 86: 4276-4283.

21. *Gröschl M., Wagner R., Rauh M., Dörr H.G.*: Stability of salivary steroids: the influences of storage, food and dental care. *Steroids*, 2001; 66: 737-741. – 22. *Berg S.J., Wynne-Edwards K.E.*: Changes in testosterone, cortisol and estradiol levels in men becoming fathers. *Mayo Clin. Proc.*, 2001; 76: 582-592. – 23. *Young A.H., Gallagher P., Porter R.J.*: Elevation of the cortisol-dehydroepiandrosterone ratio in drug-free depressed patients. *Am. J. Psychiatry*, 2002; 159: 1237-1239. – 24. *Gröschl M., Rauh M., Dörr H.G., Blum W.F., Rascher W., Dötsch J.*: Salivary leptin levels during the menstrual cycle and their relation to progesterone. *Fertil Steril*, 2002; 77: 1306-1307. – 25. *Elzinga B.M., Schmahl C.G., Vermetten E., van Dyck R., Bremner J.D.*: Higher cortisol levels following exposure to traumatic reminders in abuse-related PTSD. *Neuropsychopharmacology*, 2003; 28: 1656-1665. – 26. *Maso F., Lac G., Filaire E., Michaux O., Robert A.*: Salivary testosterone and cortisol in rugby players: correlation with psychological overtraining items. *Br. J. Sports. Med.*, 2004; 38: 260-263. – 27. *Marcus-Perlman Y., Tordjman K., Greenman Y., Limor R., Shenkerman G., Osher E., Stern N.*: Low-dose ACTH (1 µg) salivary test: a potential alternative to the classical blood test. *Clin. Endocrinol.*, 2006; 64: 215-218. – 28. *Okumura T., Nakajima Y., Takamatsu T., Matsuoka M.*: Column-switching high-performance liquid chromatographic system with a laser-induced fluorimetric detector for direct, automated assay of salivary cortisol. *J. Chromatogr., B.* 1995; 670: 11-20.

Adres: 80-416 Gdańsk, ul. Hallera 107.