

*Agnieszka Adamczak-Ratajczak*

**RYTMY OKOŁODOBOWE MELATONINY I KORTYZOLU W  
WYBRANYCH CHOROBYCH NEUROLOGICZNYCH**

**Rozprawa doktorska**

**Katedra i Zakład Fizjologii  
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego  
w Poznaniu**

**Kierownik:**  
*dr hab. med. Hanna Krauss prof. UM*

**Promotor:**  
*Prof. dr hab. med. Teresa Torlińska*

**Poznań 2014**

*Serdeczne podziękowania składam  
Pani Prof. dr hab. med. Teresie Torlińskiej  
za inspirację, kierownictwo naukowe, cenne wskazówki w trakcie wykonywania  
pracy oraz pomoc w interpretacji uzyskanych wyników*

*Serdeczne podziękowania składam również:*

*Panu Prof. dr hab. med. Wojciechowi Kozubskiemu z Kliniki Neurologii UM za  
wyrażenie zgody na badanie pacjentów oraz dr med. Michałowi Oweckiemu za  
okazaną pomoc*

*Dr n. med. Justynie Kupsz z Katedry Fizjologii UM za pomoc w oznaczaniu  
parametrów melatoniny i kortyzolu*

*Dr med. Danielowi Zielonce z Europejskiej Sieci Choroby Huntingtona za  
możliwość badania pacjentów z chorobą Huntingtona*

*Lek. med. Mieczysławowi Krawczykowi, Ordynatorowi Oddziału  
Neurologicznego CM HCP w Poznaniu za możliwość badania pacjentów*

*Dr inż. Annie Sowińskiej z Katedry i Zakładu Informatyki i Statystyki UM  
za wykonanie statystyki*

**Spis treści:**

Wykaz stosowanych skrótów i symboli: .....	5
<b>1. Wstęp</b> .....	<b>7</b>
1.1. Wprowadzenie .....	7
1.2. Rytm biologiczne .....	7
1.2.1. Definicja rytmów biologicznych.....	7
1.2.2. Podział rytmów biologicznych .....	8
1.2.3. Układ generujący rytmy okołodobowe u człowieka .....	8
1.3. Melatonina .....	10
1.3.1. Biosynteza melatoniny.....	10
1.3.2. Dobowy rytm melatoniny .....	11
1.3.3. Regulacja syntezy melatoniny .....	12
1.3.4. Znaczenie kliniczne melatoniny.....	12
1.4. Kortyzol .....	14
1.4.1. Kortyzol- hormon stresu.....	14
1.4.2. Metabolizm i wydzielanie kortyzolu .....	14
1.4.3. Dobowy rytm kortyzolu .....	15
1.4.4. Znaczenie kliniczne kortyzolu.....	16
1.5. Choroby neurodegeneracyjne .....	16
1.5.1. Neurodegeneracja .....	17
1.5.2. Mechanizmy ekscytotoksyczności w udarach niedokrwiennych.....	18
1.5.3. Choroba Alzheimera .....	19
1.5.4. Choroba Parkinsona .....	20
1.5.5. Płásawica Huntingtona .....	22
<b>2. Cel pracy</b> .....	<b>24</b>
<b>3. Materiały i metodyka</b> .....	<b>25</b>
3.1. Wprowadzenie .....	25
3.2. Charakterystyka badanych grup .....	26
3.3. Materiał.....	26
3.4. Metodyka .....	27
3.4.1. Kryteria włączenia .....	27
3.4.2. Kryteria wyłączenia.....	28
3.4.3. Procedura badawcza.....	28
3.4.4. Badania lekarskie .....	29

---

3.4.5. Metoda oznaczania kortyzolu.....	30
3.4.6. Metoda oznaczania melatoniny.....	31
3.4.7. Aktygrafia.....	32
3.4.8. Metoda wyznaczania parametrów rytmów biologicznych.....	33
3.4.8.1. Analiza statystyczna różnic parametru cosinorowego melatoniny pacjentów z chorobą Huntingtona, udarem niedokrwiennym mózgu oraz grupy kontrolnej.....	34
3.4.8.2. Analiza statystyczna różnic parametru cosinorowego kortyzolu pacjentów z chorobą Huntingtona, udarem niedokrwiennym mózgu oraz grupy kontrolnej.....	38
<b>4. Wyniki badań.....</b>	<b>42</b>
4.1 Grupa kontrolna.....	42
4.2. Grupa badana.....	48
4.2.1. Wyniki pacjentów z chorobą Huntingtona.....	48
4.2.2. Wyniki pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu.....	57
<b>5. Trudności w badaniach.....</b>	<b>66</b>
<b>6. Dyskusja.....</b>	<b>68</b>
<b>7. Wnioski.....</b>	<b>79</b>
<b>8. Streszczenie.....</b>	<b>80</b>
<b>9. Summary.....</b>	<b>81</b>
<b>10. Piśmiennictwo.....</b>	<b>82</b>
<b>11. Spis tabel.....</b>	<b>91</b>
<b>12. Spis wykresów.....</b>	<b>92</b>

## Wykaz stosowanych skrótów i symboli:

<b><math>\Omega</math></b>	- częstotliwość kątowna (pulsacja)
<b><math>\Phi</math></b>	- akrofaza-przesunięcie fazowe
<b>A</b>	- amplituda
<b>ACTH</b>	- (adrenocorticotrophic hormone) hormon adrenokortykotropowy
<b>AD</b>	- (Alzheimer's Disease) choroba Alzheimera
<b>AMPA</b>	- (aminomethylphosphonic acid)- kwas alfa-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropinowy
<b>APOE</b>	- (apolipoprotein E) apolipoproteina E
<b>APP</b>	- (amyloid precursor protein) prekursor beta amyloidu
<b>CAG</b>	- trinukleotyd kodujący glutaminę
<b>c AMP</b>	- (cyclic adenosine monophosphate) cykliczny adenozymonofosforan
<b>CBG</b>	- (corticoid-binding globulin) globulina wiążąca kortykosteroidy
<b>COX-2</b>	- (cyclooxygenase )cyklooksigenaza
<b>CRH</b>	- (corticotropin-releasing hormone)-hormon uwalniający kortykotropinę
<b>DNA</b>	- (deoxyribonucleic acid) kwas deoksyrybonukleinowy
<b>e</b>	- składnik losowy
<b>EDTA</b>	- (ethylenediaminetetraacetic acid) kwas etylenodinitrylotetraoctowy
<b>EHDN</b>	- (European Huntington's Disease Network) Europejska Sieć Choroby Huntingtona
<b>ELISA</b>	- (enzyme-linked immunosorbent assay) test immunoenzymatyczny
<b>GABA</b>	- (gamma-Aminobutyric acid) kwas gamma-aminomasłowy
<b>GSH</b>	- (glutathione) glutation
<b>HD</b>	- (Huntington's disease) choroba Huntingtona
<b>HIOMT</b>	- (Hydroxyindole O-methyltransferase) transferaza hydroksyindolo-O-metylowa

<b>HPA</b>	- (hypothalamic-pituitary-adrenocortical) oś podwzgórze-przysadka-nadnercza
<b>HTT</b>	- gen kodujący białko huntingtynę
<b>IT15</b>	- gen kodujący huntingtynę
<b>KT</b>	- tomografia komputerowa
<b>M</b>	- MESOR (midline estimating statistic of rhythm) średni poziom oscylacji
<b>MDA</b>	- (malonodialdehyde) dialdehyd malonowy
<b>NAT</b>	- (N-acetyltransferase) N-acetylotransferaza
<b>NMDA</b>	- (N-Methyl-D-aspartic acid) kwas N-metylo-D-asparaginowy
<b>NOS</b>	- (nitric oxide synnthase) syntaza tlenu azotu
<b>OUN</b>	- ośrodkowy układ nerwowy
<b>PD</b>	- (Parkinson's Disease) choroba Parkinsona
<b>PPN</b>	- oś podwzgórze-przysadka-nadnercza
<b>PSEN 1</b>	- (presenilin) presenilina 1
<b>REM</b>	- (Rapid Eye Movement) - faza snu, w której występują szybkie ruchy gałek ocznych
<b>RHT</b>	- (retino hypothalamic tract) droga siatkówkowo-podwzgórzowa
<b>ROS</b>	- (reactive oxygen species) reaktywne formy tlenu
<b>SCA</b>	- (spinocerebral ataxia) ataksja rdzeniowo-mózdkowa
<b>SCN</b>	- (nucleus suprachiasmaticus) jądro nadskrzyżowaniowe
<b>T</b>	- okres
<b>TREDS</b>	- (trinucleotide repeat expansion diseases)-choroby spowodowane powtórzeniami trinukleotydów

## 1. Wstęp

### 1.1. Wprowadzenie

Procesy fizjologiczne i biochemiczne w organizmie człowieka są ze sobą zsynchronizowane, zachodzą w określonej kolejności i częstotliwości w 24h cyklu dnia i nocy.

W chorobach neurodegeneracyjnych pojawiają się zaburzenia rytmów okołodobowych, a wczesnym objawem powyższych schorzeń może być nieprawidłowy rytm melatoniny. Istnieją doniesienia naukowe w piśmiennictwie na temat zaburzeń rytmów okołodobowych u pacjentów z chorobą Alzheimera i Parkinsona, natomiast mało jest prac dotyczących rytmów biologicznych w przebiegu choroby Huntingtona

Dotychczas stwierdzono, że w chorobie Huntingtona, zmiany neurodegeneracyjne pojawiają się m.in. w podwzgórzu. [35,117] Zlokalizowane jest tam jądro nadskrzyżowaniowe (SCN), pełniące rolę rozrusznika rytmów biologicznych, stąd zbadanie profilu okołodobowego melatoniny (uważane jest za najlepszy marker rytmów biologicznych), równocześnie z określeniem profilu kortyzolu (markera stresu), może być przydatne do oceny tych zaburzeń.[43]

### 1.2. Rytmu biologiczne

#### 1.2.1. Definicja rytmów biologicznych

Rytmu biologiczne człowieka są zjawiskiem powszechnym i są ściśle sprzężone z okresowością środowiska zewnętrznego tzn. z ruchem Ziemi dookoła własnej osi, obrotem Ziemi wokół Słońca oraz ruchem Księżyca w relacji do Ziemi.

Obserwacje chronobiologiczne roślin i zwierząt prowadzone są od starożytności lecz dopiero w ostatnim półwieczu nastąpił dynamiczny rozwój chronobiologii. Większość procesów w organizmach żywych podlega cyklicznej zmienności w zjawisk fizjologicznych zwanych rytmami biologicznymi. Rytmu okołodobowe są zdefiniowane jako

samopodtrzymujące się oscylacje z okresem, który jest równy czasowi upływającemu pomiędzy każdym powtórzeniem się oscylacji. Charakteryzują się trzema cechami: okresem (od kilku sekund do roku), amplitudą (zmiennością funkcji w jednostce czasu) i fazą (występowaniem wartości najniższych lub najwyższych). [66,57,58]

### **1.2.2. Podział rytmów biologicznych**

W zależności od częstotliwości periodyki zjawiska biologicznego rytmy możemy podzielić na: rytmy okołodobowe zwane również circadiannymi, których okres trwa od 20 do 28 godzin, rytmy ultradianne o okresie krótszym niż 20 godzin oraz rytmy infradianne o okresie dłuższym niż 28 godzin. [49]

Ponadto rytmy biologiczne można też podzielić również na rytmy egzogenne, które regulowane są przez czynniki zewnętrzne takie jak: temperatura, światło i tryb życia oraz rytmy endogenne, których przyczyna powstania tkwi wewnątrz organizmu i związana jest z zegarem biologicznym znajdującym się w naszym organizmie. [78,79,85]

### **1.2.3. Układ generujący rytmy okołodobowe u człowieka**

Światło słoneczne i sztuczne synchronizuje rytmy biologiczne, natomiast najsilniejszym endogennym synchronizatorem rytmów biologicznych człowieka, nazwanym zegarem biologicznym, jest struktura anatomiczna - jądro nadskrzyżowaniowe (nucleus suprachiasmaticus-SCN), która znajduje się w przedniej części podwzgórza, nad skrzyżowaniem nerwów wzrokowych. Neurony jądra nad skrzyżowaniem wzrokowym wpływają, za pośrednictwem włókien współczulnej części układu autonomicznego, na wydzielanie melatoniny przez szyszynkę. [18]



Model zegara biologicznego składa się z trzech podstawowych elementów:

- właściwego zegara, który jest odpowiedzialny za wytwarzanie endogennych rytmów okołodobowych,
- szlaków aferentnych doprowadzających sygnały środowiskowe do zegara
- szlaków eferentnych, przy pomocy których rytmiczne sygnały powstałe w zegarze są przesyłane do odpowiednich struktur efektorowych organizmu. [30]

Składowe kompleksu zegara biologicznego i wzajemne powiązanie między nimi przedstawia się według schematu: wejście, oscylator oraz wyjście.

Najważniejszym sygnałem „wejściowym” kompleksu zegara biologicznego jest światło. Ponadto wiele innych bodźców środowiskowych takich jak aktywność ruchowa, warunki socjalne, regularne przyjmowanie pokarmów oraz przyjmowanie leków może wpływać na pracę zegara biologicznego. [41,59]

Komórki fotoreceptorowe, pręciki i czopki, są odpowiedzialne za pochłanianie promieni świetlnych i przekształcanie sygnału fizycznego w sygnał neurochemiczny dla celów widzenia, natomiast odbiór kwantów światła dla celów zegara biologicznego zachodzi w komórkach zwojowych i komórkach amakrynowych siatkówki oka.

Kluczową rolę w przekazywaniu informacji świetlnych do nadrzędnego zegara biologicznego odgrywa szlak siatkówkowo- podwzgórzowy. Głównym neuroprzekaźnikiem drogi siatkówkowo- podwzgórzowej RHT (retino hypothalamic tract) jest glutaminian. Elektryczna stymulacja RHT powoduje uwalnianie tego mediatora w SCN, natomiast podany do SCN powoduje depolaryzację neuronów i wzmacnia częstotliwość ich wyładowań. Glutaminian oddziałuje na neurony za pośrednictwem receptorów NMDA i nie-NMDA w obecności tlenu azotu. Ponadto w synchronizacji pracy SCN uczestniczą również inne szlaki neuronalne takie jak: szlak kolankowato- podwzgórzowy, który łączy ciało kolankowate boczne z jądrem nadskrzyżowaniowym a głównym neuroprzekaźnikiem tego szlaku jest neuropeptyd Y. Kolejnym jest szlak łączący twór siatkowaty z SCN, który przekazuje przede wszystkim informacje sensoryczne a neuroprzekaźnikiem jest tutaj serotonina. Szlaki przekazujące do zegara biologicznego informacje o środowisku wewnętrznym organizmu to szlaki neuronalne łączące przegrodę, hipokamp, podwzgórze z SCN, natomiast szlaki neuronalne mające swój początek w limbicznej części przodomózgowia przekazują do SCN informacje o stanie pobudzenia mózgu. [52,58,121]

Endogenny oscylator jest jądrem zegara biologicznego i wytwarza rytmiczny sygnał dobowy w sposób autonomiczny. Sygnały wejściowe do zegara biologicznego synchronizują endogenny rytm oscylatora do rytmu egzogenego.

Wytworzony przez endogenny oscylator rytmiczny sygnał wyjściowy jest przekazywany z zegara biologicznego drogami eferentnymi do struktur efektorowych, w których dochodzi do przetworzenia sygnału oscylatora w rytmiczny sygnał charakterystyczny dla typu i funkcji struktury docelowej.[121]

## **1.3 Melatonina**

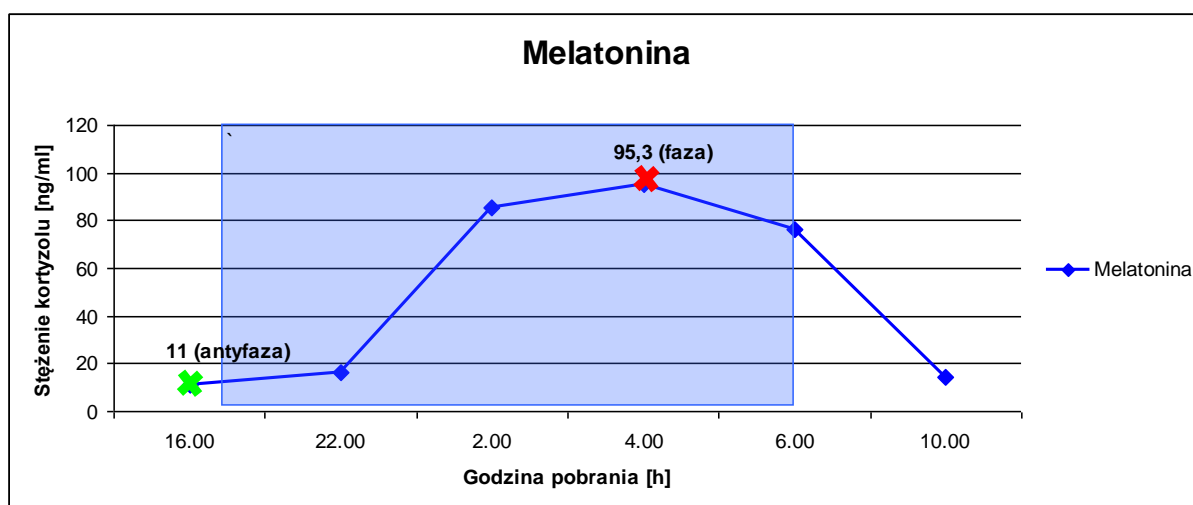
### **1.3.1. Biosynteza melatoniny**

Synteza melatoniny przebiega stopniowo a produktem wyjściowym dla syntezy jest tryptofan. Szyszynka jest niewielkim tworem stanowiącym część nadwzgorza, który zawiera wszystkie substraty i enzymy potrzebne do wytworzenia melatoniny z tryptofanu.

Tryptofan jest pobierany wbrew gradientowi stężeń z krwi przez pinealocyty i ulega hydroksylacji do 5-hydroksytryptofanu przy udziale 5-hydroksylazy tryptofanowej. Z kolei 5-hydroksytryptofan podlega dekarboksylacji przy udziale dekarboksylazy aminokwasów aromatycznych, w wyniku czego powstaje 5-hydroksytryptamina (serotonina). Następnie pod wpływem N-acetylotransferazy (NAT) serotonina ulega acetylacji, w wyniku której powstaje N-acetyloserotonina. Ostatnim etapem jest proces metylacji N-acetyloserotoniny przy udziale transferazy hydroksyindolo-O-metylowej (HIOMT), w wyniku czego grupa metylowa jest przenoszona z S-adenozylometioniny na N-acetyloserotoninę, co prowadzi do wytworzenia melatoniny. Melatonina pochodzenia szyszynkowego jest pulsacyjnie uwalniana do krwioobiegu a następnie dociera do wszystkich narządów. Unieczynnianie szyszynkowej melatoniny zachodzi głównie w wątrobie, a nieaktywne metabolity są wydalane wraz z moczem. Natomiast melatonina syntetyzowana w siatkówce nie przechodzi do płynów ustrojowych, podlega szybkiej degradacji do 5-metoksytryptofolu i kwasu 5-metoksyindolooctowego i pełni rolę neuroprzebieźnika/neuromodulatora. [8,9,10]

### 1.3.2. Dobowy rytm melatoniny

Wydzielanie melatoniny odbywa się w endogennym rytmie dobowym regulowanym przez cykl światło/ciemność. Pod wpływem bodźców świetlnych maleje wydzielanie melatoniny i obniża się jej poziom we krwi. Stężenie melatoniny we krwi zaczyna wzrastać późnym wieczorem i osiąga najwyższe wartości między godziną 2 a 3 w nocy, wynosząc 80-150pg/ml. Następnie łagodnie obniżając się uzyskuje przed świtem niskie wartości porównywalne do tych, jakie obserwuje się w ciągu całego dnia, wahające się 10-20 pg/ml. U człowieka wykazano, niezależnie od trybu życia jaki prowadzi, że biosynteza melatoniny przebiega w zależnym od warunków oświetlenia rytmie okołodobowym, wytwarzanym przez endogenne zegary biologiczne. [69,97,122]



**Wykres 1. Uśredniony profil melatoniny u osób zdrowych**

źródło: badania własne

### 1.3.3. Regulacja syntezy melatoniny

Melatonina wykazuje bardzo charakterystyczny dobowy rytm syntezy i wydzielania, ściśle zależny od warunków oświetlenia, o których informacja dociera do szyszynki za pośrednictwem autonomicznego układu nerwowego. W nocy podczas ciemności wzmagają się synteza melatoniny i jej prekursora serotoniny. Bodziec świetlny biegnie początkowo od siatkówki oka przez nerw wzrokowy, następnie przez jądro nadskrzyżowaniowe podwzgórza, jądro przykomorowe, pęczek przyśrodkowy przodomózgowia, pokrywę międzymózgowia, jądro pośrednio-boczne rdzenia kręgowego i zwój szyjny górny, którego włókna zazwojowe unerwiające szyszynkę stanowią ostatni element tej drogi.

W nocy, gdy zmniejsza się aktywność neuronów SCN dochodzi do aktywacji zazwojowych włókien współczulnych, co prowadzi do uwalniania z ich zakończeń nerwowych neurotransmitera noradrenaliny. Następnie noradrenalina pobudza receptory  $\beta$ -adrenergiczne, co powoduje aktywację układu cyklicznego adenylosyzyklicznego AMP, co zwiększa aktywność N-acetylotransferazy serotoniny i prowadzi do zwiększonej syntezy melatoniny. [77, 98,113]

### 1.3.4. Znaczenie kliniczne melatoniny

Uważa się, że rolą melatoniny jest „nastawianie zegara biologicznego”, między innymi rytmu sen- czuwanie. W wielu badaniach wykazano obniżone stężenia nocne melatoniny w surowicy lub jej metabolitu – siarczanu 6-hydroksymelatoniny w moczu w zaburzeniach snu, zwłaszcza u osób w podeszłym wieku. Podawanie melatoniny powoduje normalizację rytmów biologicznych w zaburzeniach snu u osób niewidomych, pracowników zmianowych oraz u osób zmieniających strefę czasową. Obniżone stężenia melatoniny obserwowano w depresji zarówno u dorosłych i dzieci, w schizofrenii, u alkoholików, w klasterowym bólu głowy, u pacjentów z chorobą Alzheimera oraz raku sutka, gruczołu krokowego, odbytnicy, endometrium, szyjki macicy, płuc, żołądka oraz tarczycy. [6,7, 23,28,74]

Natomiast podwyższony poziom melatoniny stwierdzono u dziewcząt z jadłowstrętem psychicznym, u kobiet z podwzgórzowym brakiem miesiączki, w hiperprolaktynemii, a także u mężczyzn z hipogonadyzmem hipogonadotropowym. W chwili obecnej istnieją trzy podstawowe wskazania do stosowania terapeutycznego melatoniny. Są to: zaburzenia snu, zwłaszcza u osób w wieku podeszłym, regulacja rytmu sen – czuwanie u osób niewidomych oraz niwelowanie zaburzeń wynikających z szybkiej zmiany stref czasowych w czasie podróży. Dawka stosowanej melatoniny oraz długość kuracji powinny być zawsze dobierane indywidualnie i zależeć od przyczyny jej stosowania. Przeciętne dawki stosowane w terapii wahają się od 1 do 5 mg. [53,54,56,100,116,119]

## 1.4. Kortyzol

### 1.4.1. Kortyzol- hormon stresu

Kortyzol nazywany jest „markerem stresu”, gdyż jego stężenie znacząco rośnie w czasie stresu. Reguluje on metabolizm węglowodanów, białek i lipidów, zwiększając katabolizm białek oraz przyspieszając procesy glukoneogenezy. Zwiększa lipolizę w tkance tłuszczowej, co powoduje wzmożone uwalnianie wolnych kwasów tłuszczowych, natomiast zmniejsza liczbę eozynofików, limfocytów, bazofików a zwiększa liczbę granulocytów obojętnochłonnych i płytek krwi. Kortyzol ma silne działanie przeciwzapalne, a stosowany w dużych dawkach hamuje wszystkie etapy procesu zapalnego. Działanie przeciwzapalne wynika między innymi ze stabilizacji błony lizosomów, zmniejszenia tworzenia bradykininy i prostaglandyn oraz zmniejszenia przepuszczalności naczyń włosowatych. Wszystkie glikokortykosteroidy wywierają silny wpływ na wydzielanie hormonu uwalniającego hormon adrenokortykotropowy (CRH) z podwzgórza i samego hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) z przysadki na zasadzie sprzężenia zwrotnego ujemnego. [33,71,73]

### 1.4.2. Metabolizm i wydzielanie kortyzolu

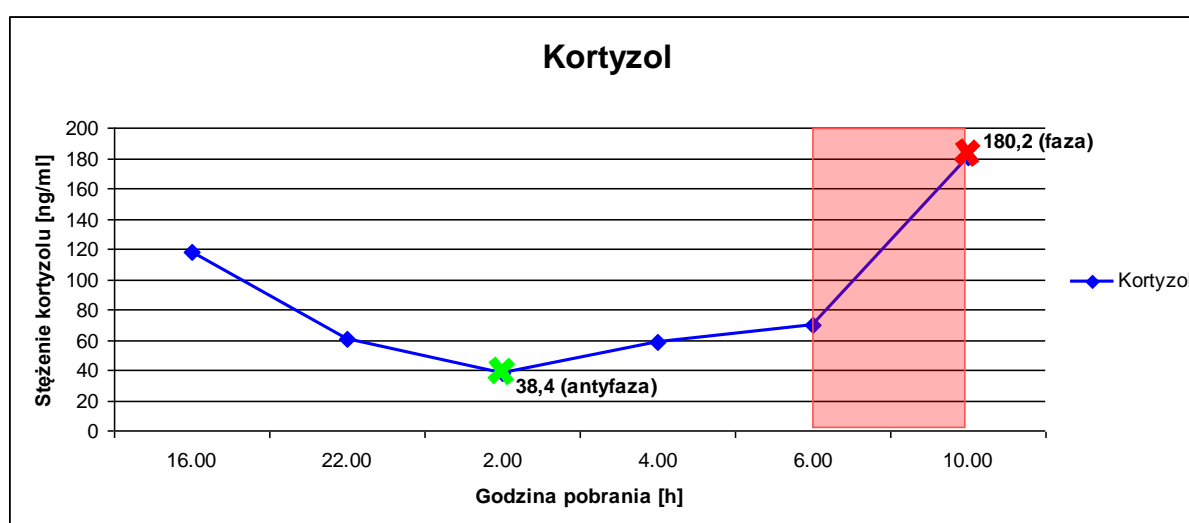
Kortyzol jest wydzielany przez komórki warstwy pasmowatej oraz w niewielkim stopniu w warstwie siatkowatej kory nadnerczy. Około 95% aktywności glikokortykoidowej przypada na kortyzol zwany także hydrokortyzonem. Wiąże się on we krwi głównie z białkiem osocza  $\alpha$ -globuliną tzw. transkortyną (CBG), a tylko w niewielkim stopniu z albuminami. Około 10% krążącego we krwi jest frakcją wolną hormonu. Kortyzol związany z białkiem jest biologicznie nieczynny i stanowi rezerwuuar czynnego wolnego hormonu.

Sekrecja kortyzolu jest stymulowana przez adrenokortykotropinę (ACTH)- hormon polipeptydowy wydzielany przez przednią część przysadki mózgowej, a z kolei wydzielanie ACTH jest zależne od podwzgórzowego hormonu uwalniającego kortykotropinę (CRH). Wzajemnie sprzężony system regulacyjny wydzielania tych hormonów jest określony jako oś podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowa i odbywa się na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego.

Kortyzol metabolizowany jest w wątrobie, większa część jest zredukowana do dehydrokortyzolu, a potem do tetrahydrokortyzolu, który wiązany jest z kwasem glukuronowym. Pochodne tetrahydroglukuronowe kortyzonu przechodzą do moczu, częściowo na drodze sekrecji kanalikowej, a niewielki procent kortyzolu (10%) i kortyzonu ulega przemianie do 17-ketosteroidowych pochodnych, które są wiązane z siarczanami i wydalone z moczem. [36,40]

### 1.4.3. Dobowy rytm kortyzolu

Ponad 90% kortyzolu występuje w osoczu krwi w postaci związanej, a biologiczny okres jego połowicznego rozpadu jest dość długi i wynosi 60-90min. Stężenie kortyzolu wykazuje wahania dobowe, ze szczytem w godzinach rannych i spadkiem w późnych godzinach nocnych. Maksymalne stężenie pojawia się pomiędzy godziną 6:00 a 8:00 i wynosi 150-250ng/ml. Z kolei najniższe jest pomiędzy godziną 23:00 a 4:00 (<50 ng/ml). Rytm dobowy wydzielania kortyzolu jest regulowany przez centralny układ nerwowy, a profil tego jest zależny od pory snu i czuwania. W wydzielaniu kortyzolu występuje duża zmienność a rytm ten może być zaburzony poprzez stres psychiczny, stres fizyczny, pracę zmianową oraz różne choroby. W ciągu kilku minut od wystąpienia stresu dochodzi do wzrostu wydzielania kortyzolu poprzez wzrost wydzielania podwzgórzowego CRH i przysadkowego ACTH.[5,50]



**Wykres 2. Uśredniony profil kortyzolu u osób zdrowych**

źródło: badania własne

#### 1.4.4. Znaczenie kliniczne kortyzolu

Spadek wydzielania hormonów nadnerczy , zwłaszcza kortyzolu na skutek pierwotnego uszkodzenia kory nadnerczy np. w wyniku gruźlicy, procesów autoimmunologicznych, przerzutów nowotworowych, niepożądanego działania leku może prowadzić do wystąpienia choroby Adisona, apatii i depresji. [11,16,20,28]

Natomiast nadmiar glikokortykosteroidów , niezależnie od przyczyny prowadzi do rozwoju objawów określanych zespołem Cushinga. W obrazie klinicznym stwierdza się otyłość z pominięciem kończyn, tzw. twarz księżycowata, kark bawoli, zmiany skórne (najczęściej rozstępny), nadmierne owłosienie u kobiet, zaburzenia czynności gonad, osteoporozę, zaburzenia metaboliczne.

Skutki nadmiaru tych hormonów występują również w ośrodkowym układzie nerwowym prowadząc do labilności emocjonalnej, zaburzenia pamięci i koncentracji oraz bezsenności. [45,88]

### 1.5. Choroby neurodegeneracyjne

Choroby neurodegeneracyjne to grupa wrodzonych lub nabytych postępujących chorób układu nerwowego, w których podstawowym zjawiskiem patologicznym jest postępująca utrata komórek nerwowych. Należą do nich choroba Alzheimera, Parkinsona, stwardnienie rozsiane, stwardnienie zanikowe boczne, płasawica Huntingtona, choroba Refsuma, zwyrodnienie tylnosnurowe w przebiegu niedokrwistości Addisona-Biermera, ataksja rdzeniowo-mózdkowa, postępujące porażenie nadjądrowe oraz rdzeniowy zanik mięśni. [67,68]

Proces prowadzący do wystąpienia objawów choroby neurodegeneracyjnej rozpoczyna się znacznie wcześniej i przebiega przez długi czas bezobjawowo. Pierwsze objawy pojawiają się kiedy znacząca ilość neuronów ulegnie uszkodzeniu lub uszkodzenie dotyczy określonej części ośrodkowego układu nerwowego. Do czynników ryzyka większości chorób neurodegeneracyjnych należą starszy wiek i polimorfizmy genetyczne.



Obecnie wydaje się, że wszystkie choroby neurodegeneracyjne związane są z patologią i akumulacją białek. W przypadku zaburzeń struktury przestrzennej białek, może dochodzić do rozwoju procesów patologicznych. Akumulacja patologicznych białek jest toksyczna dla komórek nerwowych i jest przyczyną neurodegeneracji. [42,67,68,108]

### 1.5.1. Neurodegeneracja

Neurodegeneracja czyli uszkodzenie i obumieranie komórek nerwowych może obejmować zmiany ostre powstałe podczas udaru niedokrwiennego mózgu, stanu padaczkowego oraz urazu mózgu. Dominuje wówczas mechanizm nekrotyczny, choć mogą być również uruchamiane mitochondrialne mechanizmy prowadzące do apoptozy. Neurodegeneracja może obejmować także procesy przewlekłe, takie jak choroby neurodegeneracyjne OUN, w wyniku których dochodzi do apoptozy komórek poprzez uruchomienie szlaku aktywacji kaspaz i fragmentacji DNA.

Dla nekrozy charakterystyczne jest uszkodzenie błony komórkowej, zaburzenie transportu jonowego, obrzęk i stan zapalny, natomiast apoptoza to proces zależny od genów, związany z aktywacją kaskady procesów biochemicznych. Aktywowane zostają proteolityczne kaspazy i endonukleazy niszczące DNA. [108]

Do głównych mechanizmów neurodegeneracyjnych należą: ekscytotoksyczność aminokwasów pobudzających, takich jak kwas glutaminowy, zaburzenia procesów energetycznych komórki oraz stres oksydacyjny. Warunkiem pojawienia się ekscytotoksyczności jest pobudzenie jonotropowych i metabotropowych receptorów glutaminergicznych na skutek wzrostu stężenia agonistów tych receptorów, prowadzące do większego uwalniania kwasu glutaminowego do szczeliny synaptycznej. Powoduje to aktywację receptorów AMPA, co następnie prowadzi do depolaryzacji błon neuronów i otwarcia bramkowanych elektrycznie kanałów sodowych oraz napływ do neuronów jonów sodowych. W wyniku przedłużającej się depolaryzacji dochodzi do biernego napływu jonów chlorkowych oraz wody co powoduje obrzęk komórki i zmiany nekrotyczne. Poprzez aktywację receptorów NMDA nadmierny napływ jonów wapnia do komórki, wywołuje

uwalnianie wapnia z siateczki śródplazmatycznej, co prowadzi do zaburzeń biosyntezy białek, produkcji białek stresowych i powstania stresu oksydacyjnego. [21]

Ponadto utrzymujący się w szczelinie synaptycznej wysoki poziom stężenia kwasu glutaminowego może prowadzić do przedłużenia i wzmocnienia sygnału glutaminergicznego czyli tzw. pętli glutaminergicznej. Mechanizmy ekscytoksytoxiczności występują w urazach mózgu, udarach niedokrwiennych mózgu, stanach padaczkowych i hipoglikemii, natomiast w chorobach neurodegeneracyjnych większą rolę odgrywa stres oksydacyjny oraz dysfunkcja mitochondriów i retikulum endoplazmatycznego. [103]

### **1.5.2. Mechanizmy ekscytoksytoxiczności w udarach niedokrwiennych**

W niedokrwieniu mózgu, w wyniku przejściowego lub stałego obniżenia przepływu krwi przez mózg dochodzi do zaburzeń energetycznych w komórkach. Ograniczenie ilości dostarczanego z krwią tlenu i glukozy prowadzi do utraty potencjału błonowego oraz depolaryzacji komórek nerwowych i glejowych. Reakcje te rozpoczynają się od zaburzenia czynności pompy sodowo-potasowej, co prowadzi do depolaryzacji błony neuronu i uwolnienia neuroprzekaźników pobudzających oraz otwarcia kanałów wapniowych. Napływanie jonów wapnia do komórek prowadzi do uszkodzenia organelli komórkowych i zaburzeń funkcjonowania komórek nerwowych. W następstwie tych procesów do przestrzeni komórkowej uwalniane są neurotransmitery glutaminian i glicyna. Akumulacja glutaminianu w synapsie zwiększa się również na skutek zaburzenia mechanizmu presynaptycznego jego wychwytu zwrotnego, a jego wzrost prowadzi do nasilenia aktywacji receptorów NMDA i gwałtownego wzrostu poziomu wewnątrzkomórkowego  $Ca^{2+}$ .

Z kolei jony wapnia inicjują w cytoplazmie aktywację proteaz, lipaz, endonukleaz, fosfolipaz, cytooksygenazy COX-2 czy syntazy tlenku azotu (NOS), w następstwie których dochodzi do aktywacji apoptozy. Wolne rodniki prowadzą także do powstania czynników prozapalnych, które aktywują mikroglej i prowadzą do adhezji leukocytów. Zwiększony poziom glutaminianu prowadzi również do aktywacji kanałów zależnych od napięcia dla jonów sodowych, związanych z receptorami AMPA, depolaryzacji błony komórkowej i biernego napływu jonów  $Na^{+}$  oraz wody. W wyniku tych procesów dochodzi do obrzęku komórek nerwowych, wzrostu ciśnienia czaszkowego i zwężenia naczyń. [67,103]

Brak bezpośrednich dowodów na pierwotną rolę mechanizmów ekscytotoksyczności w przewlekłych schorzeniach neurodegeneracyjnych. [67,68]

Uważa się, że elementy stresu oksydacyjnego, dysfunkcja mitochondriów i retikulum endoplazmatycznego lub zaburzenia funkcji cytoszkieletu mogą być w mniejszym lub większym stopniu przyczyną zwyrodnienia neuronów w tych schorzeniach.

Reaktywne formy tlenu są ubocznym produktem reakcji red-ox zachodzących w mózgu, do których należą wolne rodniki i nadtlenek wodoru. Działanie cytotoksyczne reaktywnych form tlenu określane jest jako stres oksydacyjny. Wchodzą one w reakcje z lipidami, białkami i kwasami nukleinowymi: wolne rodniki mogą generować łańcuchowe reakcje peroksydacji lipidów błonowych i w efekcie prowadzić do zaburzenia struktury i funkcji błon biologicznych zwłaszcza mitochondriów, retikulum endoplazmatycznego i błony neuronów doprowadzając do śmierci komórki. [103]

### 1.5.3. Choroba Alzheimera

Choroba Alzheimera należy do schorzeń neurodegeneracyjnych i odpowiada za 40-60% wszystkich przypadków otępienia. Ta zwyrodnieniowa choroba ośrodkowego układu nerwowego, charakteryzuje się postępującą utratą zdolności umysłowych takich jak zaburzenia pamięci, zaburzenia funkcji poznawczych upośledzające funkcjonowanie społeczne i zawodowe.

W miarę upływu czasu pojawiają się różne zaburzenia zachowania i objawy związane z upośledzeniem czynności kory mózgowej. W początkowych etapach choroby objawy mogą być trudne do zauważenia. Chory zaczyna zapominać o podstawowych rzeczach, które często związane są codziennymi czynnościami lub z wykonywanym zawodem. Zaburzeniom pamięci towarzyszy gorsza orientacja w przestrzeni oraz czasie. Pojawiają się również częste zmiany nastroju, zniechęcenie wobec ulubionych czynności i apatia. Zaburzenia pamięci nasilają się z czasem. W dalszej kolejności pojawiają się zaburzenia mowy i koordynacji ruchów utrudniające wykonywanie codzienne prace. Przebieg choroby jest postępujący i nieuchronnie prowadzi do pełnej niepełnosprawności i zgonu. [31,68,84,96]

W większości przypadków choroba Alzheimera rozpoczyna się po 65 roku życia.

Około 2% przypadków choroby Alzheimera dziedziczy się jednogenowo, to znaczy, że przyczyną jest mutacja w obrębie pojedynczego genu dla białka prekursorowego amyloidu (APP) na chromosomie 21, preseniliny 1 (PSEN 1) na chromosomie 14 oraz peseniliny 2 (PSEN 2) na chromosomie 1. Natomiast pozostałe przypadki to postać sporadyczna, w której czynniki ryzyka związane są z polimorfizmem genu APOE (apolipoproteiny E)

Wydaje się, że neurodegeneracja w AD jest procesem kaskadowym, a rolę odgrywają w niej zewnątrzkomórkowa agregacja  $\beta$ -amyloidu w postaci blaszek starczych, hiperfosforylacja i wewnątrzkomórkowa agregacja białka tau w postaci splotów neurofibrilarnych oraz stres oksydacyjny. [68] Toksyczność złogów  $\beta$ -amyloidu objawia się głównie uszkodzeniami synapsy, zaburzeniami homeostazy jonów wapnia, stresem oksydacyjnym oraz indukcją apoptozy. Typowo zmiany patologiczne lokalizują się w obrębie: części podstawnej przodomózgowia, hipokampu, węchomózgowia, oraz kory skroniowej a degeneracja ta powoduje spadek stężenia acetylocholino w mózgu, deficyt ważnych neuroprzekaźników takich jak noradrenalina, serotonina, dopomina oraz kwas gamma-aminomasłowy. [68,109,110]

#### 1.5.4. Choroba Parkinsona

Choroba Parkinsona to heterogenna choroba neurodegeneracyjna, która dotyka ok. 2-3% populacji po 65rż. Rozpoznanie opiera się na stwierdzeniu klasycznych objawów: drżenia spoczynkowego, hypokinezji, bradykinezji, sztywności mięśniowej typu pozapiramidowego oraz niestabilnej postawy. Ryzyko zachorowania rośnie z wiekiem i jest większe wśród mężczyzn, a zapadalność w wieku 75–85 lat wynosi 4,5–6,8 na 1000 osób. Zmiany zwyrodnieniowe dotyczą całego mózgowia, a w pierwszej kolejności pojawiają się w rdzeniu przedłużonym i jądrach węchowych, następnie obejmują śródmózgowie i jądra podstawy, a w postaci zaawansowanej również korę nową.

Charakterystyczny jest zanik komórek dopaminergicznych istoty czarnej powodujący zmniejszenie stężenia dopaminy oraz obecność ciał Lewy'ego, które są złogami alfa-synukleiny i ubikwityny w cytoplazmie zajętych neuronów. Poziom dopaminy musi obniżyć się o ok.80%, aby wystąpiły objawy kliniczne. Ponadto stwierdza się zaburzenia układu noradrenergicznego, serotonergicznego, GABA-ergicznego oraz glutaminergicznego.

Kluczową rolę w mechanizmie śmierci komórek dopaminergicznych i niedopaminergicznych przypisuje się stresowi oksydacyjnemu, który poprzez wolne rodniki wywołuje peroksydację lipidów błony komórkowej i oksydacyjne uszkodzenie DNA. [51]

Obok narastającej niesprawności ruchowej pojawiają się zaburzenia wegetatywne, ból, zaburzenia czucia, zaburzenia neuropsychiatryczne. Choroba Parkinsona u 80-90% nieleczonych osób powoduje kalectwo lub śmierć po 15 latach trwania choroby. Leczenie wydłuża okres sprawności o 7-10 lat. [67]

Grupa chorób neurodegeneracyjnych określana wspólną nazwą TREDs (ang. Trinucleotide Repeat Expansion Diseases), powodowana jest przez międzypokoleniową ekspansję powtórzeń trójnukleotydomych. Wraz z wydłużaniem się ciągu powtórzeń obniża się wiek wystąpienia pierwszych objawów choroby w kolejnych pokoleniach, ponadto choroba ma cięższy przebieg. Zjawisko to nosi nazwę antycypacji i występuje w większości przypadków chorób związanych z ekspansją powtórzeń trójnukleotydomych. Wyjątek stanowi ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 8 SCA8, w której allele zawierające średniej długości trakty powtórzeń są patogenne. Prawdopodobieństwa wystąpienia mutacji w następnym pokoleniu nie można dokładnie określić. U części genów występują zmiany premutacyjne, które nie prowadzą bezpośrednio do choroby, ale zwiększają prawdopodobieństwo jej wystąpienia w kolejnym pokoleniu. [67,68,118]

Choroby związane z ekspansją powtórzeń trójnukleotydomych można podzielić ze względu na miejsce występowania powtórzeń na:

1. Trójnukleotydomowe powtórzenia zlokalizowane w regionie ulegającym translacji. Do tej grupy chorób zalicza się: płasawicę Huntingtona, ataksje rdzeniowo-mózdkowe, rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni typu Kennedy`ego.
2. Trójnukleotydomowe powtórzenia zlokalizowane w regionie nie ulegającym translacji oraz w intronie. Do tej grupy chorób zalicza się: zespół łamliwego chromosomu X, dystrofię miotoniczną, ataksje rdzeniowo-mózdkowe, ataksję Friedricha.

Ataksje rdzeniowo-mózdkowe to grupa neurodegeneracyjnych chorób genetycznych o podobnych objawach, które dziedziczą się w sposób autosomalny dominujący. Ich objawami są głównie zaburzenia koordynacji ruchów kończyn górnych i dolnych oraz

zaburzenia ruchów gałek ocznych. Jest to związane z uszkodzeniem układu nerwowego na poziomie pnia mózgu, mózdzku, rdzenia kręgowego i nerwów obwodowych. Choroba rozpoczyna się najczęściej około 30 - 45 roku życia. Jej przebieg ma charakter postępujący, który prowadzi z reguły do ciężkiego inwalidztwa. Podłoże molekularne większości ataksji rdzeniowo-mózdkowych związane jest z niestabilnością powtórzeń trójnukleotydowych CAG znajdujących się w kodujących regionach poszczególnych genów, a najczęstszym typem ataksji w Polsce są SCA1 i SCA2. [67,68,118]

### 1.5.5. Płasawica Huntingtona

Płasawica Huntingtona-(choroba Huntingtona) jest rzadką, postępującą neurodegeneracyjną chorobą ośrodkowego układu nerwowego. Jest dziedziczona autosomalnie dominująco i występuje w Europie i Ameryce Północnej z częstością 4-8 osób na 100000. Rozpoczyna się zwykle pomiędzy 35-40 rokiem życia, a wiek zachorowania może wahać się pomiędzy 5-70 rokiem życia. [19,29,34]

Charakterystyczna jest triada objawów: poznawczych, motorycznych i psychopatologicznych, a pierwszym objawem jest niezgrabność ruchów. Poza ruchami mimowolnymi występują też inne zaburzenia ruchowe jak ograniczenia ruchomości gałek ocznych, parkinsonizm, dystonie. Ponadto obserwujemy też u pacjentów z HD mioklonie, tiki, ataksję, dyzartrię, dysfagię, spastyczność z wzmożeniem odruchów ścięgnistych i odruchem Babińskiego. [12,102]

Również w chorobie Huntingtona występują powszechnie zaburzenia zachowania, które mogą wyprzedzać objawy ruchowe. Przede wszystkim dominuje depresja, która rozpoznawana jest u ponad 60% chorych. Depresja ta odpowiedzialna jest za wyższy odsetek samobójstw w porównaniu do populacji ogólnej. Ponadto występują napady paniki, lęku, zaburzenia obsesyjno-kompulsyjne, manie, psychozy, apatie, drażliwość, zachowania agresywne, odhamowanie seksualne. [32,47,62,63,104]

U pacjentów z płasawicą Huntingtona obserwujemy spowolnienie psychoruchowe, trudności z rozwiązywaniem problemów i inne objawy zaburzeń funkcji kory przedczołowej. Narastanie tych objawów prowadzi do rozwoju zespołu otępiennego.[2,25,80,83,105]

Patofizjologia wiąże się z dysfunkcją i utratą neuronów oraz gliozą w obrębie prążkowiec, szczególnie w okolicy jądra ogoniastego i płatów czołowych.

Przyczyną powstawania choroby jest mutacja genu IT15 kodującego białko – huntingtynę, która w warunkach fizjologicznych jest białkiem obecnym w cytoplazmie nie tylko neuronów, ale także innych komórek. Białko to prawdopodobnie bierze udział w transporcie aksonalnym, aczkolwiek jego dokładna funkcja nie została poznana.

Mutacja ta polega na wydłużeniu ciągu powtórzeń trójnukleotydowych CAG w obrębie genu, co prowadzi do syntezy wadliwego białka. U zdrowych ludzi stwierdza się 10–29 powtórzeń, natomiast pacjenci z HD mają 36-121 powtórzeń trójnukleotydu CAG. Liczba powtórzeń jest zmienna i zazwyczaj ulega zwiększeniu w następnym pokoleniu. Nasilenie zmian zwyrodnieniowych mózgu stwierdzanych w badaniu morfologicznym wykazuje związek z liczbą powtórzeń CAG. [3,35,70,94] Badania neuroobrazowe (tomografia komputerowa, rezonans magnetyczny) wykazują zaniki jądra ogoniastego i płatów czołowych.

Leczenie tego schorzenia jest objawowe. W zależności od objawów podajemy leki przeciwdepresyjne, klasyczne i atypowe neuroleptyki (np. kłozapina, kwetiapina), natomiast ruchy płasawicze można zmniejszyć stosując haloperidol lub perfenazynę. [14,95]

Postęp płasawicy Huntingtona jest nieuchronny a zgon następuje na ogół po 15-20 latach od początku choroby, z wyłączeniem szybko postępującej postaci młodzieńczej. Schyłkowe stadium charakteryzuje się sztywnością, akinezą, głębokim otępieniem. Unieruchomienie i dysfagia szczególnie często prowadzą do zachłystowego zapalenia płuc, najczęstszej przyczyny śmierci tych chorych. [93]

## 2. Cel pracy

1. Określenie prawidłowości lub nieprawidłowości w zakresie rytmów biologicznych u pacjentów z rozpoznaną chorobą Huntingtona oraz niedokrwiennym udarem mózgu na podstawie profilu okołodobowego melatoniny i kortyzolu.
2. Stwierdzenie przydatności oznaczania stężenia melatoniny i kortyzolu do oceny stopnia zaawansowania choroby Huntingtona.



### 3. Materiały i metodyka

#### 3.1. Wprowadzenie

Test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), czyli test immunoenzymatyczny odkryty został w latach 60-tych XX wieku. Wykorzystuje on enzymy do wykrywania reakcji antygenów ze swoistymi przeciwciałami. Początkowo test ELISA wykorzystywany był jedynie do wykrywania przeciwciał zawartych w surowicy lecz za jego pomocą można również analizować ilość antygenów w badanej próbce. Ze względu na szybkość i czułość stał się podstawowym testem klinicznym, służącym zarówno do celów naukowych jak i diagnostycznych. Testy ELISA standardowo wykonywane są na polistyrenowych lub pleksiglasowych, 96-dołkowych płytkach. Wszystkie analizowane próbki znajdują się w osobnych studzienkach a płytkę opłascza się odpowiednim antygenem lub przeciwciałem. Łączenie się antygenu ze specyficznym przeciwciałem uwidacznia reakcja barwna, powstająca dzięki odpowiednim enzymom. Najczęściej stosowane enzymy to: fosfataza alkaliczna przekształcająca bezbarwny fosforan p-nitrofenolu w żółty p-nitrofenol, peroksydaza chrzanowa dająca niebieskie zabarwienie w obecności tetrametylobenzydyny oraz oksydaza glukozowa, która z kwasem 5-aminosalicylowym daje kolor brunatny.

Zmiana barwy roztworu mierzona jest spektrofotometrycznie, a uzyskany wynik porównuje się z próbkami kontrolnymi tworzącymi tzw. krzywą kalibracyjną, stanowiącą wykres zależności intensywności barwy od stężenia przeciwciał w próbce.

## 3.2. Charakterystyka badanych grup

Pacjenci z chorobą Huntingtona rekrutowani do badań byli z Kliniki Neurologii UM w Poznaniu, z pacjentów przyjętych bezpośrednio do Kliniki Neurologii lub kierowanych do tejże Kliniki przez European Huntington's Disease Network Poland z Poznania.

Przed rozpoczęciem badań cykli okołodobowych melatoniny i kortyzolu pacjenci byli badani przez lekarza neurologa celem określenia stopnia zaawansowania choroby. Natomiast pacjenci z udarem niedokrwiennym rekrutowani byli z Oddziału Udarowego CM HCP w Poznaniu po wykonaniu badania neurologicznego oraz badania tomografii komputerowej głowy (KT).

## 3.3. Materiał

Celem określania prawidłowości lub nieprawidłowości w zakresie rytmów biologicznych przeprowadzono następujące badania:

1. Materiał do badań pobrano w następujących godzinach: 16:00, 18.00, 22:00, 24:00, 2:00, 4:00, 6:00, 10:00.
2. Pobraną krew wirowano przez 10 min przy obrotach 3500 obr/min a uzyskaną w ten sposób surowicę przechowywano w temperaturze -80 stopni Celsjusza.
3. Badania hormonalne dotyczyły oznaczenia:
  - a. **stężenia melatoniny** - za pomocą immunoenzymatycznego testu ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), zestawem testowym produkcji IBL Hamburg ELISA.
  - b. **stężenia kortyzolu** – za pomocą immunoenzymatycznego testu ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), zestawem testowym produkcji IBL Hamburg ELISA.
4. Oceniano aktywność ruchową przy użyciu rejestratora Actiwatch Plus firmy Oxford.

## 3.4. Metodyka

### 3.4.1. Kryteria włączenia

#### *1. Potwierdzenie badaniem neurologicznym oraz badaniem genetycznym choroby Huntingtona (grupa I).*

Przyczyną choroby Huntingtona jest mutacja polegająca na ekspansji powtórzeń trójnukleotydomowych CAG w genie HTT (IT15, HD) kodującym huntingtynę. Prawidłowy gen HTT ma do 35 powtórzeń CAG. U większości pacjentów obserwuje się ponad 40 powtórzeń CAG, a u nosicieli mutacji w pośredniej ilości 36–39 powtórzeń CAG objawy choroby mogą, ale nie muszą wystąpić. Badano krew obwodową pobraną na EDTA, a badanie polegało na amplifikacji fragmentu genu HTT(IT15) zawierającego powtórzenia trójnukleotydomowe CAG i określeniu ich zakresu.[89]

#### *2. U pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu wykonanie badania KT głowy potwierdzające niedokrwienie oraz badanie neurologiczne (grupa II).*

Tomograf komputerowy (Computed Tomography – CT), zbudowany jest ze stołu i układu lampa-detektory. Wykorzystuje źródło promieniowania rentgenowskiego do wykonywania przekrojowych zdjęć ciała. Przewagą tomografii komputerowej nad klasycznymi radiologicznymi badaniami jest możliwość rekonstrukcji obiektu w różnych przekrojach 2D, rekonstrukcji przestrzennych 3D oraz możliwość precyzyjnego różnicowania gęstości tkankowej narządów wewnętrznych. Pacjent jest naświetlany dokładnie z każdego punktu wokół jego długiej osi, dzięki czemu uzyskuje się możliwość otrzymania na monitorze obrazu wybranej warstwy ciała. Podczas badania chory znajduje się w pozycji leżącej na specjalnym stole, który jest przesuwany prostopadle do tzw. gantry, układu lampa-detektory. Mimo, że badanie jest nieinwazyjne i bezbolesne, to dla części pacjentów kłopotliwe jest wytrzymanie, nieruchomo, w jednej pozycji nawet 20 minut. Badanie KT głowy jest obecnie podstawowym badaniem obrazowym pozwalającym uwidocznić struktury śródczaszkowe oraz zróżnicować udar niedokrwienny od udaru krwotocznego mózgu.

### 3.4.2. Kryteria wyłączenia

Potwierdzenie w badaniu KT głowy obszaru niedokrwienia obejmujące podwzgórze, gdzie zlokalizowane jest jądro nadskrzyżowaniowe (SCN), pełniące rolę rozrusznika rytmów biologicznych.

### 3.4.3. Procedura badawcza

Wszystkie osoby biorące udział w badaniu lub ich prawni opiekunowie, otrzymały wyczerpującą informację na temat celu badania, procedur badawczych i wyraziły pisemną zgodę na udział w badaniu.

Badanie otrzymało 12 maja 2011r, uchwałą nr 436/11, zezwolenie Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu. Środki na badanie pochodziły z badania statutowego nr 502-01-01125184-00268.

Schemat procedur badawczych przedstawiał się następująco:

#### **1. Grupa kontrolna**

Do badań wykorzystano surowicę krwi studentów Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, w wieku od 19 do 27 lat, którzy podczas badania przebywali w klimatyzowanej komorze, gdzie kontrolowane było oświetlenie (L:D=12:12).

Materiał do badań pobrano w następujących godzinach: 16:00, 22:00, 2:00, 4:00, 6:00, 10:00. Pobraną krew wirowano przez 10 min przy obrotach 3500 obr/min a uzyskaną w ten sposób surowicę przechowywano w temperaturze -80 stopni Celsjusza.

Aktywność ruchowa osób badanych kontrolowana była na podstawie monitoringu za pomocą urządzenia Actiwatch.

## 2. Grupa badana

Badaniem objętych zostało 8 pacjentów z chorobą Huntingtona w wieku 28-70 lat, w różnym stopniu zaawansowania choroby.

Grupą porównawczą było 8 chorych z udarem niedokrwiennym mózgu w wieku 52-84 lat, u których metodą tomografii komputerowej wykazano brak zmian patologicznych w podwzgórzu, gdzie znajduje się rozrusznik (jądro SCN) dla rytmów biologicznych.

Podczas badania pacjenci z obu grup przebywali w szpitalu, w pozycji półleżącej, w osobnych zaciemnionych salach, gdzie kontrolowane było oświetlenie (L:D=12:12). Aktywność ruchowa kontrolowana była na podstawie monitoringu za pomocą urządzenia Actiwatch.

Wyniki uzyskane u pacjentów były porównywane z wartościami referencyjnymi korespondujących testów uzyskanych od producenta oraz z wynikami uzyskanych stężeń melatoniny i kortyzolu w cyklach okołodobowych osób zdrowych (na podstawie badań własnych w Pracowni Rytmów Biologicznych Katedry Fizjologii).

### 3.4.4. Badania lekarskie

Przedmiotowe badanie neurologiczne składa się kolejno ze sprawdzenia:

- stanu psychicznego i wyższych funkcji mózgowych
- funkcjonowania nerwów czaszkowych
- układu ruchu, napięcia i siły mięśniowej
- odruchów
- czucia powierzchniowego i głębokiego
- zborności ruchów
- chodu
- objawów korzeniowych i oponowych
- czynności autonomicznego układu nerwowego

Badanie przedmiotowe rozpoczyna się od badania głowy. Początkowo badamy pacjenta na leżąco, a następnie przechodzimy do badania w pozycji stojącej oraz podczas ruchu. Po ocenie czaszki przystępujemy do badania objawów oponowych i nerwów czaszkowych. Oceniamy spontaniczne ułożenie kończyn, obecność ruchów mimowolnych, ruchomość bierną i czynną w poszczególnych stawach oraz napięcie mięśniowe. Następnie oceniamy siłę mięśniową różnych grup mięśni i badamy odruchy ścięgnowe przy pomocy młotka neurologicznego, oceniając nasilenie reakcji odruchowej oraz symetrię w obu kończynach. Najważniejszym odruchem patologicznym stwierdzanym w uszkodzeniu dróg piramidowych jest odruch Babińskiego. Polega on na tonicznym, grzbietowym zgięciu palucha wywołanym skurczem mięśnia prostownika długiego palucha. Po badaniu układu ruchu przechodzimy do badania czucia, które ma charakter subiektywny i wymaga dobrej współpracy badanego. Oceniamy czucie powierzchniowe (ból, dotyku i temperatury) oraz czucie głębokie (ułożenia i wibracji). Badanie kończymy oceniając motorykę pacjenta podczas chodzenia.

### 3.4.5. Metoda oznaczania kortyzolu

W celu określenia sekrecji kortyzolu ocenione zostało wydzielanie tego hormonu w cyklu 18-godzinnym, a jego stężenie w pobranych próbkach surowicy krwi oznaczone zostało przy pomocy immunoenzymatycznego testu ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), zestawem testowym produkcji IBL Hamburg.

Do odpowiednich studzienek odmierzone po 20  $\mu$ l każdego składnika tzn. standardu, prób kontrolnych oraz prób badanych a następnie dodano 200  $\mu$ l enzymu wiążącego. Po dokładnym wymieszaniu inkubowano płytkę przez 60 minut w temperaturze pokojowej, wytrząsano zawartość studzienek i przepłukano je trzykrotnie roztworem przemywającym (po 400  $\mu$ l na każdą studzienkę). Odsączone zawartość studzienki na bibułę a do każdej z nich dodano po 100  $\mu$ l roztworu substratu. Następnie inkubowano płytki przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Zatrzymanie reakcji enzymatycznej nastąpiło poprzez dodanie do każdej studzienki 100  $\mu$ l roztworu zatrzymującego. Absorbancję odczytano przy długości fali  $\lambda=450$  nm po 10 minutach od zatrzymania reakcji.

### 3.4.6. Metoda oznaczania melatoniny

Celem określenia sekrecji melatoniny, uznanej za najlepszego markera rytmu okołodobowego, pobrano próbki krwi, w cyklu 18-godzinnym, w tym samym czasie co kortyzol.

Stężenie melatoniny w pobranych próbkach surowicy krwi oznaczone było za pomocą immunoenzymatycznego testu ELISA ( Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), zestawem testowym produkcji IBL Hamburg.

Odmierzono po 50  $\mu$ l każdego wyekstrahowanego standardu, próbek kontrolnych oraz próbek badanych do odpowiednich studzienek. Następnie dodano po 50  $\mu$ l enzymu wiążącego i napipetowano 50  $\mu$ l antysurowicy do studzienek i ostrożnie wymieszano. Zaklejono płytki folią adhezyjną i inkubowano przez noc (14-20 godzin) w temperaturze 2-8 stopni Celsjusza.

Zawartość każdej studzienki trzykrotnie przepłukano roztworem przemywającym (assay buffer) po 250  $\mu$ l na studzienkę a następnie roztwór ostrożnie usuwano. Kiedy odsączono zawartość studzienki na bibule, do każdej z nich dodano po 150  $\mu$ l roztworu substratu (enzyme conjugate). Następnie płytki przykryto folią adhezyjną i inkubowano przez 120 minut w temperaturze pokojowej na wytrząsarce (500 rpm).

Ponownie zawartość każdej studzienki przepłukano trzykrotnie roztworem przemywającym po 250  $\mu$ l na studzienkę. Kiedy odsączono zawartość studzienki na bibule, do każdej z nich dodano po 200  $\mu$ l świeżo przygotowanego roztworu substratu (PNPP substrate solution). Kolejnym etapem była inkubacja płytki przez 20-40minut w temperaturze pokojowej( 18-25 stopni Celsjusza) na wytrząsarce (500 rpm). Zatrzymanie reakcji nastąpiło poprzez dodanie do każdej studzienki 50  $\mu$ l roztworu zatrzymującego (PNPP stop solution). Krótco mieszano zawartość poprzez delikatne wytrząsanie płytki. Absorbancję odczytano przy długości fali  $\lambda=405$  nm (referencyjna długość fali 600-650) w czytniku mikropłytek w ciągu 60 minut od zatrzymania reakcji.

### 3.4.7. Aktygrafia

Aktograf jest niezastąpionym narzędziem do prowadzenia badań i obserwacji chronobiologicznych. W naszych badaniach, do oceny aktywności ruchowej pacjentów, użyto miniaturowy, cyfrowy, bezprzewodowy aktograf – Actiwatch Plus firmy Oxford. Aktywność mierzono począwszy od godz. 16:00 do godz. 10:00 kolejnego dnia, a pomiaru dokonywano co 30 sekund.

18-godzinną aktywność ruchową pacjentów monitorowano aktografem, wielkości zegarka, noszonym przez osoby praworęczne na lewym nadgarstku, natomiast osoby leworęczne nosiły przyrząd na prawym nadgarstku.

Aktograf jest stosowany już od kilkudziesięciu lat w pomiarach aktywności ludzi, lecz pionierem zastosowania nowoczesnych cyfrowych aktografów w badaniach chronobiologicznych był Alexander Borbély z Uniwersytetu w Zurychu. Czujnik aktografu czyli akcelerometr jest elementem piezoelektrycznym, wytwarzającym napięcie proporcjonalne do jego wychylenia, które z kolei jest zależne od przyspieszenia działającego na czujnik. Jeśli przyspieszenie przekroczy wartość progową (najczęściej na 0.1 G), sygnał z czujnika spowoduje powstanie impulsu napięcia elektrycznego a impulsy te są zliczane i zapamiętywana w pamięci cyfrowej. Po zakończeniu badania, dane z aktografu przesyłane były bezprzewodowo do komputera, gdzie zostały przeanalizowane. [86]



### 3.4.8. Metoda wyznaczania parametrów rytmów biologicznych

Analizując rytmy biologiczne wyznaczamy amplitudę, średni poziom oscylacji tzw. MESOR (midline estimating statistic of rhythm), okres oscylacji oraz przesunięcie – acrophase.

Do wyznaczania parametrów biologicznych służą metoda cosinorowa, autokorelacji, periodogramu Einright'a, parametryczne, metody oparte na teorii chaosu, analiza Fourierowska. W danych biologicznych często uzyskujemy pomiary, które nie spełniają wymaganych założeń, w tych przypadkach dobrym rozwiązaniem jest metoda cosinorowa, która pozwala na analizę 3 składowych charakteryzujących daną częstotliwość: MESOR, amplitudę oraz przesunięcie fazowe. Analiza cosinorowa jest to model oparty na funkcji cosinus:

$$y = \mathbf{M} + \mathbf{A} \cos(\mathbf{t} \omega + \phi) + \mathbf{e}$$

$\omega$  - częstotliwość kątowna

$\mathbf{M}$  - MESOR

$\mathbf{A}$  - amplituda

$\Phi$  - akrofaza

$\mathbf{e}$  - składnik losowy

W naszym badaniu wyznaczyliśmy parametry dla okresu 18 h przy użyciu metody pojedynczego cosinora (single cosinor) oraz cosinora populacyjnego (population mean cosinor) dla poszczególnych badanych grup. W ten sposób uzyskano trzy parametry dla melatoniny i kortyzolu : MESOR, amplitudę oraz przesunięcie fazowe. Uzyskane parametry poddano dalszej analizie statystycznej w celu wyznaczenia istotnych różnic w badanych grupach przy pomocy analizy wariancji i testu Kruskala-Wallisa.

### 3.4.8.1. Analiza statystyczna różnic parametru cosinorowego melatoniny pacjentów z chorobą Huntingtona, udarem niedokrwiennym mózgu oraz grupy kontrolnej

Analizując fazę dla melatoniny nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami a grupą kontrolną (tab. 1 i wykres 3).

Istotność statystyczną ( $p$ ) określono na poziomie  $p < 0,05$ .

Zależna: Faza	Test Kruskala-Wallisa: $p=0,5734$ Warunek uwzględniania: melatonina		
	H	U	K
H		1,000000	1,000000
U	1,000000		0,932264
K	1,000000	0,932264	

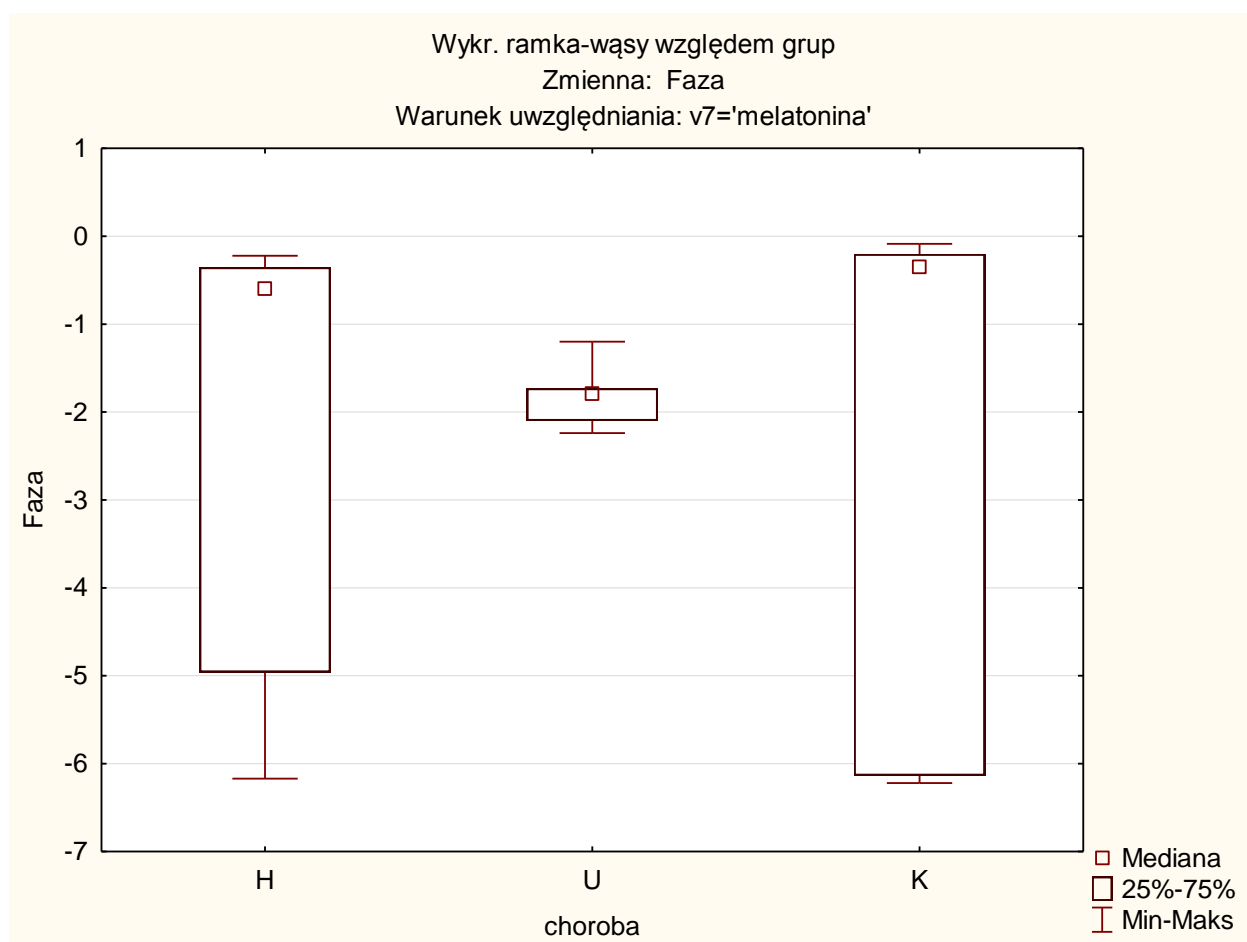
**Tabela 1.** Test Kruskala-Wallisa dla fazy;  $p=0,5734$

H- pacjenci z chorobą Huntingtona

U- pacjenci z udarem niedokrwiennym mózgu

K- studenci stanowiący grupę kontrolną

Wartości zaznaczone na czerwono wskazują na istotne różnice pomiędzy grupami na poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ .

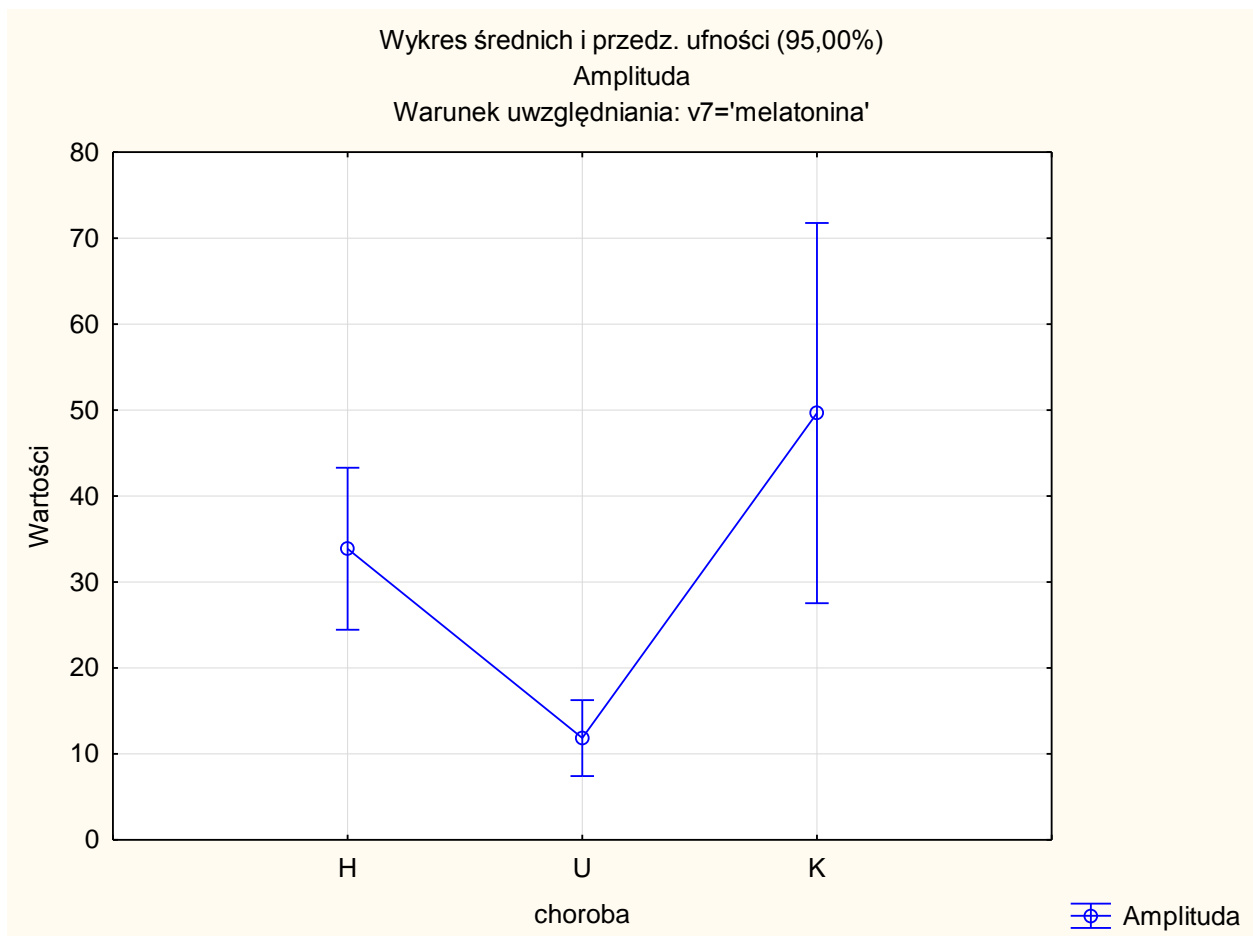


**Wykres 3.** Wartości średnie i przedziały ufności dla fazy z podziałem na poszczególne grupy

Wykazano istotną różnicę w wartościach amplitudy melatoniny u pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast nie ma istotnej różnicy w wartościach amplitudy pomiędzy pacjentami z chorobą Huntingtona a grupą kontrolną (tab. 2 i wykres 4).

choroba	Analiza wariancji $p=0,000447$		
	Test post hoc $v7='melatonina'$		
	H	U	K
H		0,037175	0,161469
U	0,037175		0,000545
K	0,161469	0,000545	

**Tabela 2.** Analiza wariancji post hoc  $p=0,000447$

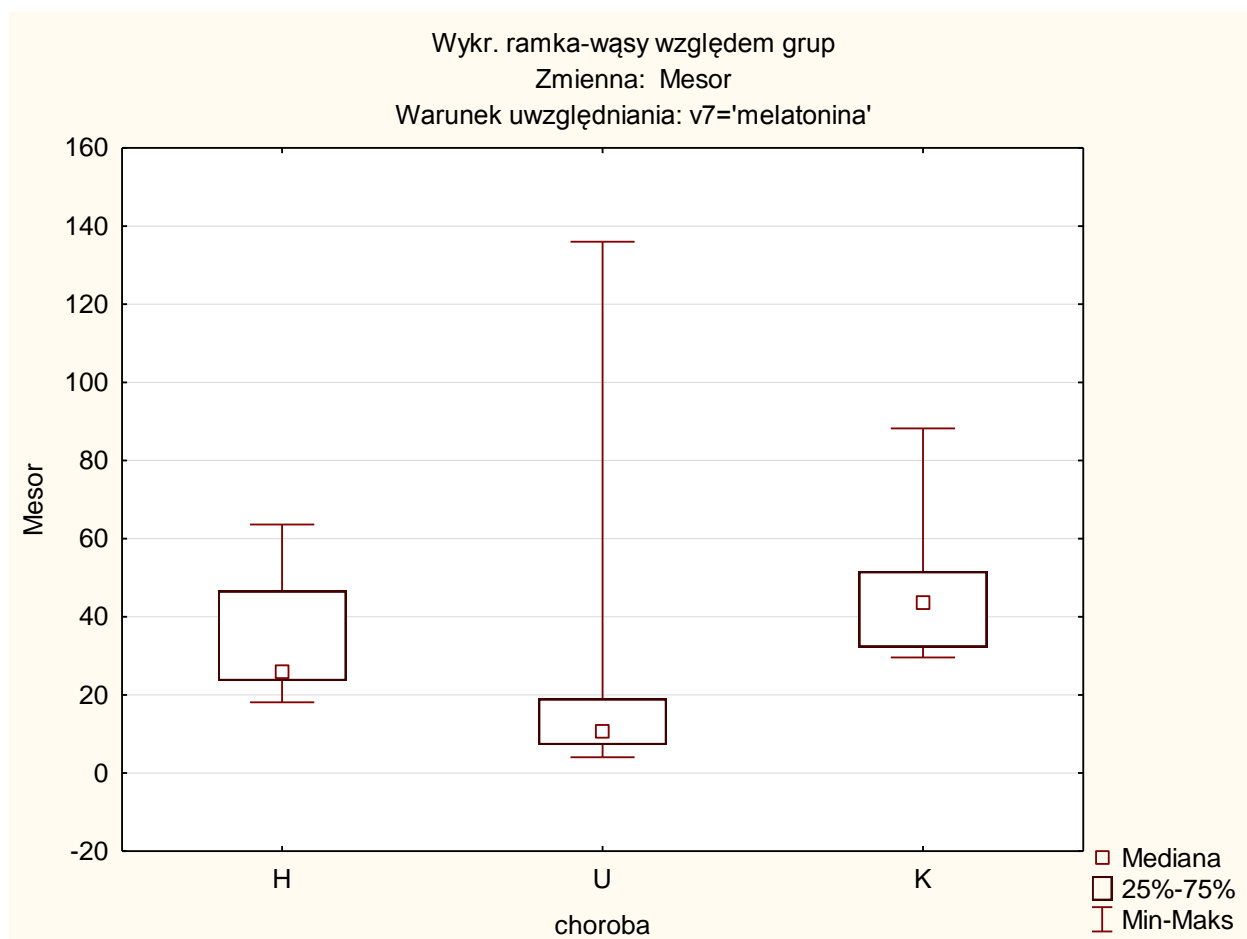


**Wykres 4.** Wartości średnie i przedziały ufności dla amplitudy z podziałem na poszczególne grupy

Podobnie porównując wartości MESORa stwierdzono istotne statystycznie różnice pomiędzy pacjentami z udarem niedokrwiennym mózgu a grupą kontrolną. Natomiast nie ma istotnej różnicy w wartościach MESORa pomiędzy pacjentami z chorobą Huntingtona a grupą kontrolną ( tab. 3 i wykres 5).

Zależna: Mesor	Test Kruskala-Wallisa: p =0,0466 Warunek uwzględniania: melatonina'		
	H	U	K
H		0,563952	0,786922
U	0,563952		0,040532
K	0,786922	0,040532	

**Tabela 3.** Test Kruskala-Wallisa dla mesor p=0,0466



**Wykres 5.** Wartości średnie i przedziały ufności dla MESORa z podziałem na poszczególne grupy

### 3.4.8.2. Analiza statystyczna różnic parametru cosinorowego kortyzolu pacjentów z chorobą Huntingtona, udarem niedokrwiennym mózgu oraz grupy kontrolnej

Analizując amplitudę dla kortyzolu nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami a grupą kontrolną (tab. 4).

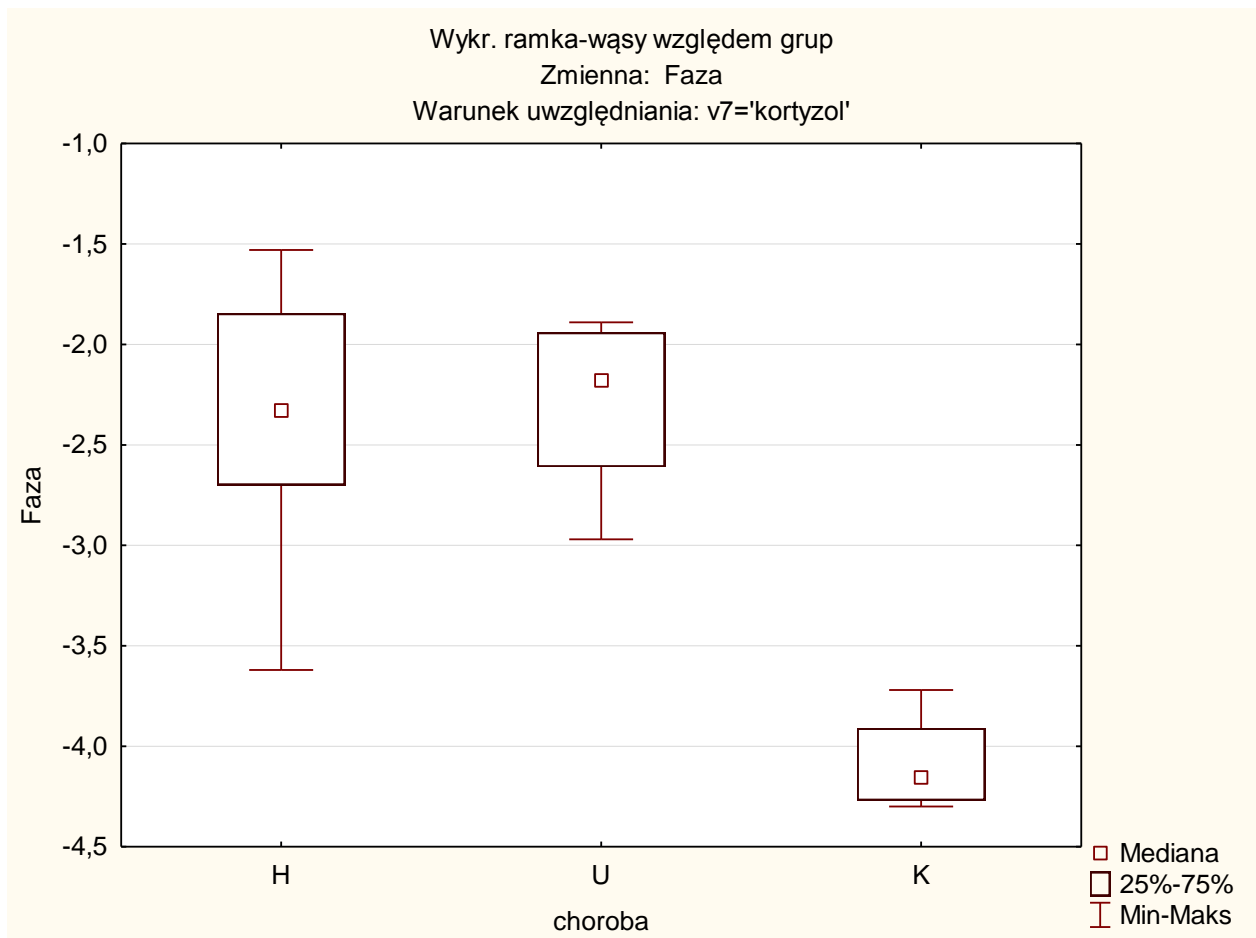
Zależna: Amplituda	Test Kruskala-Wallisa: $p = 0,3743$ Warunek uwzględniania: $v7 = \text{'kortyzol'}$		
	H	U	K
H		0,531454	0,924539
U	0,531454		1,000000
K	0,924539	1,000000	

**Tabela 4.** Test Kruskala-Wallisa dla amplitudy  $p = 0,3743$

Natomiast wykazano istotną różnicę w wartościach fazy dla kortyzolu zarówno u pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu jak pacjentów z chorobą Huntingtona w porównaniu z grupą kontrolną (tab. 5 i wykres 6).

Zależna: Faza	Test Kruskala-Wallisa: $p = 0,0004$ Warunek uwzględniania: kortyzol		
	H	U	K
H		1,000000	0,001592
U	1,000000		0,001790
K	0,001592	0,001790	

**Tabela 5.** Test Kruskala-Wallisa dla fazy  $p = 0,0004$

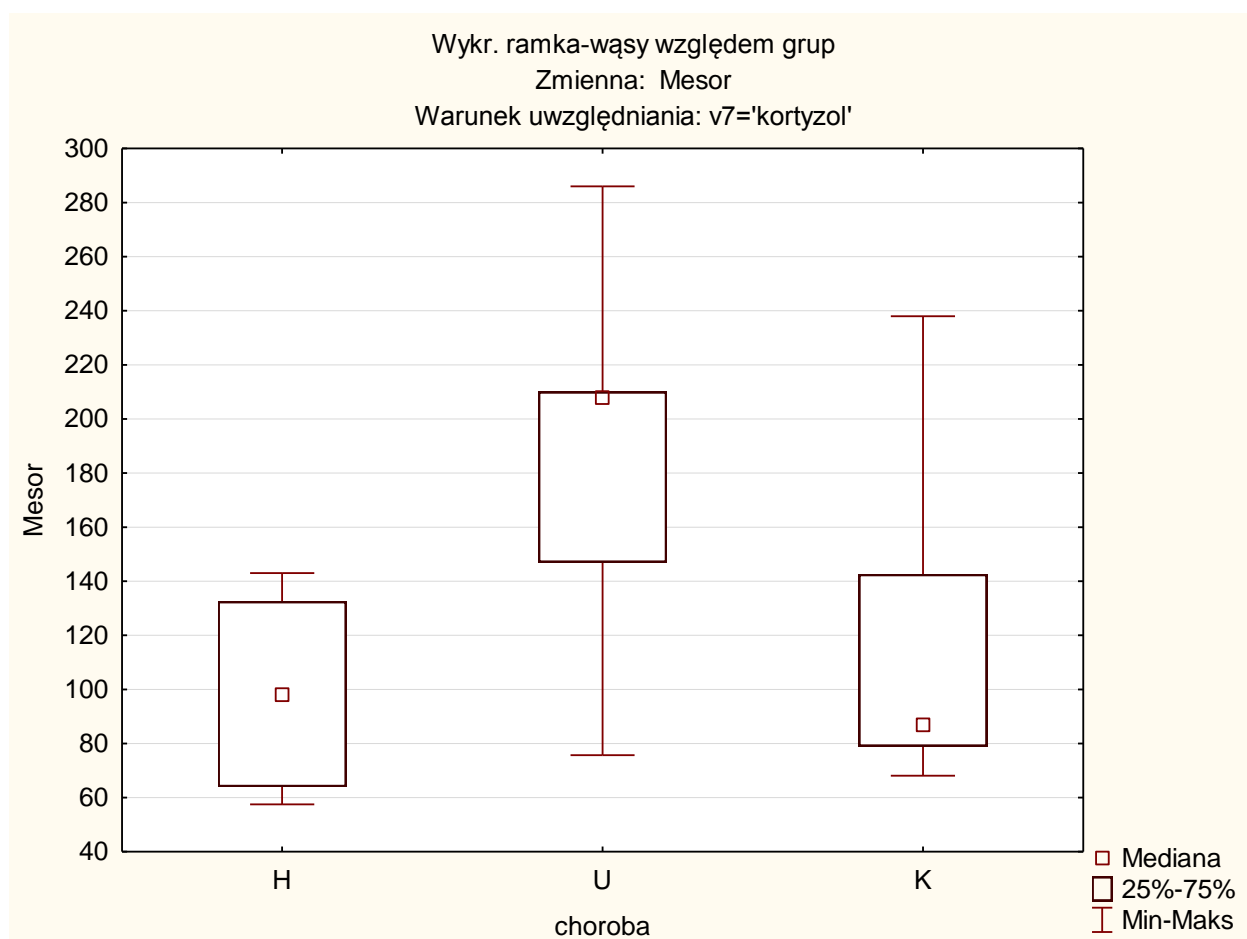


**Wykres 6.** Wartości średnie i przedziały ufności dla fazy z podziałem na poszczególne grupy

Porównując wartości MESORa nie stwierdzono istotnie statystycznie różnic pomiędzy badanymi pacjentami a grupą kontrolną ( tab. 6 i wykres 7).

Zależna:	Test Kruskala-Wallis: $p = ,0180$		
Mesor	Warunek uwzględniania: kortyzol		
	H	U	K
H		0,022362	1,000000
U	0,022362		0,112123
K	1,000000	0,112123	

**Tabela 6.** Test Kruskala-Wallis dla MESORa;  $p=0,0180$



**Wykres 7.** Wartości średnie i przedziały ufności dla MESORa z podziałem na poszczególne grupy



Porównanie amplitudy, fazy i MESOR melatoniny i kortyzolu we wszystkich badanych grupach.

	melatonina		kortyzol	
		p		p
Amplituda	H vs U	0,037	H vs U	0,531
	U vs K	0,0005	U vs K	1,000
	H vs K	0,161	H vs K	0,925
Faza	H vs U	1,000	H vs U	1,000
	U vs K	0,932	U vs K	0,002
	H vs K	1,000	H vs K	0,002
Mesor	H vs U	0,564	H vs U	0,022
	U vs K	0,041	U vs K	0,112
	H vs K	0,787	H vs K	1,000

H- pacjenci z chorobą Huntingtona

U- pacjenci z udarem niedokrwiennym mózgu

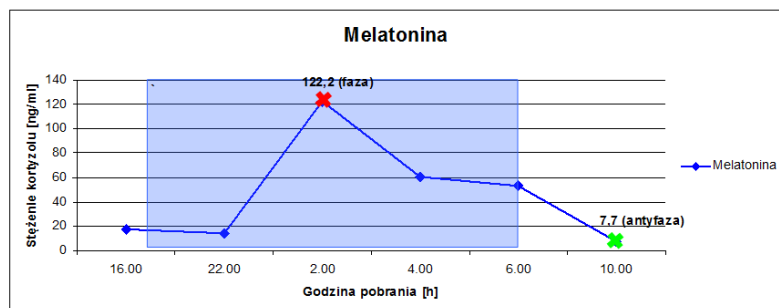
K- studenci stanowiący grupę kontrolną

Wartości zaznaczone na czerwono wskazują na istotne różnice pomiędzy grupami na poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ .

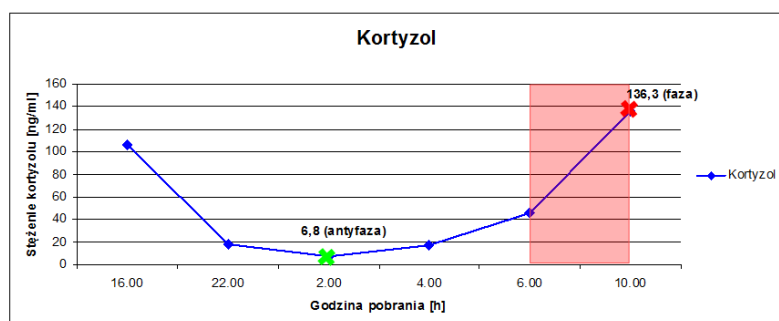
## 4. Wyniki badań

## 4.1 Grupa kontrolna

Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	17,1	4,6
22.00	14,1	
02.00	122,2	N- 70-125
04.00	60,4	77,5
06.00	53,3	
10.00	7,7	

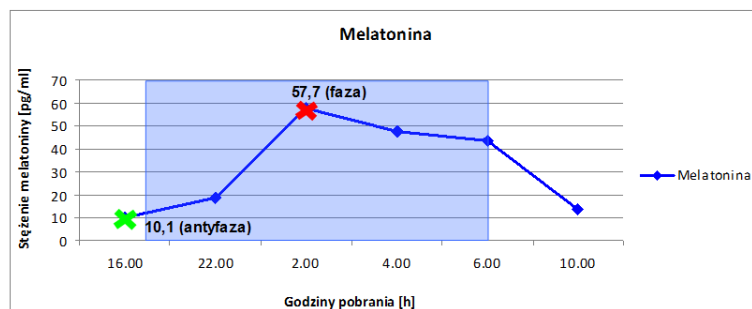


Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	106,6	< 50
22.00	18,2	
02.00	6,8	
04.00	16,7	
06.00	46	150-250
10.00	136,3	

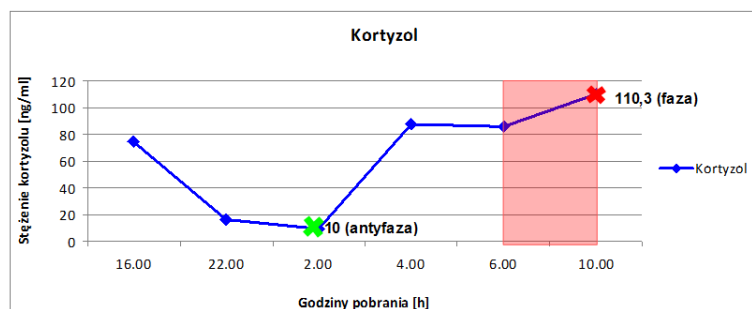


Wykres 8. Zmiany stężenia melatoniny i koryzolu w surowicy krwi - osoba nr 1. (W.B)

Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	10,1	4,6
22.00	18,7	
02.00	57,7	N- 70-125
04.00	47,6	77,5
06.00	43,4	
10.00	13,7	

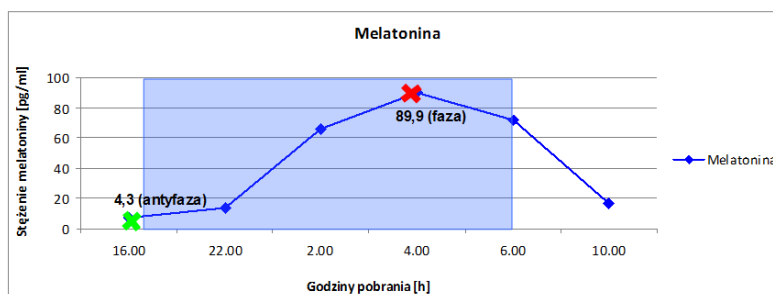


Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	75,2	< 50
22.00	16,9	
02.00	10,0	
04.00	87,7	
06.00	86,3	150-250
10.00	110,3	

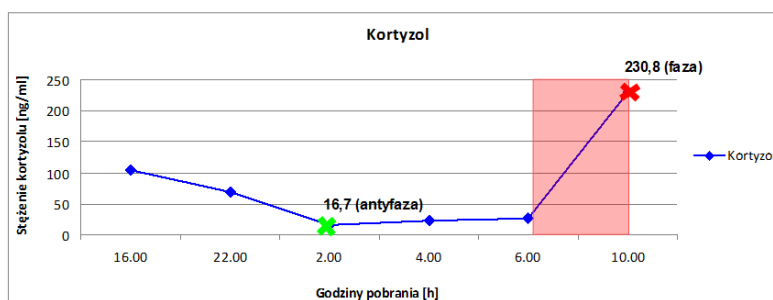


Wykres 9. Zmiany stężenia melatoniny i koryzolu w surowicy krwi - osoba nr 2. (A.D)

Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	7,0	4,6
22.00	13,9	
02.00	66,2	N- 70-125
04.00	89,9	77,5
06.00	71,8	
10.00	16,6	

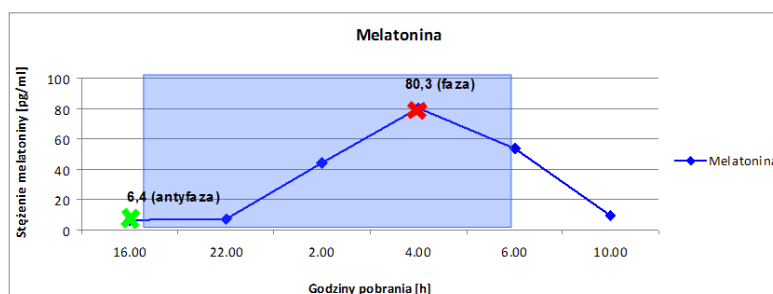


Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	105,4	< 50
22.00	69,0	
02.00	16,7	
04.00	23,6	
06.00	27,4	150-250
10.00	230,8	

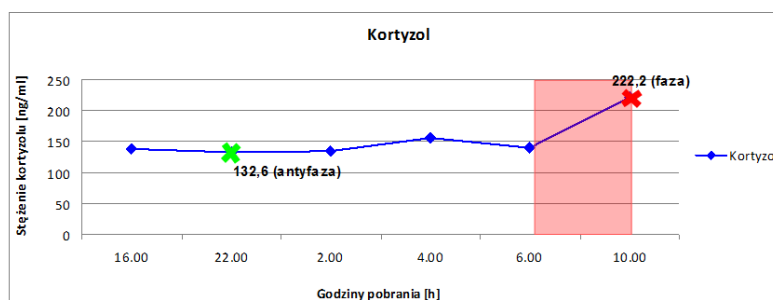


**Wykres 10.** Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 3. (A.P)

Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	6,4	4,6
22.00	7,1	
02.00	44,2	N- 70-125
04.00	80,3	77,5
06.00	53,3	
10.00	9,6	

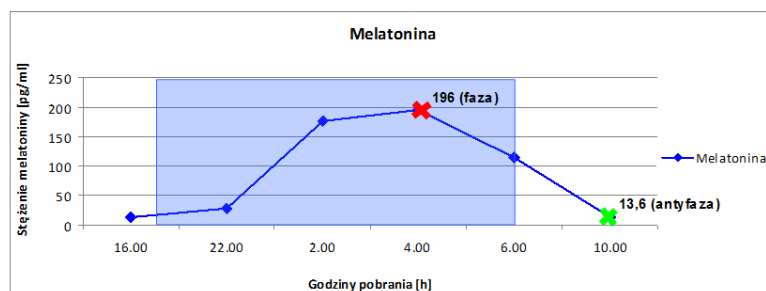


Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	137,8	< 50
22.00	132,6	
02.00	135,1	
04.00	155,2	
06.00	139,9	150-250
10.00	222,2	

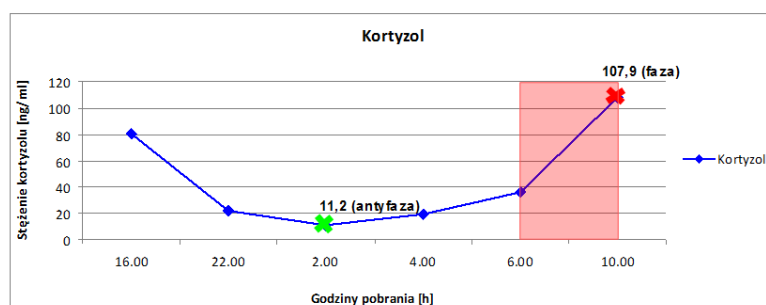


**Wykres 11.** Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 4. (N.C)

Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	14,0	4,6
22.00	27,9	
02.00	175,9	N- 70-125
04.00	196,0	77,5
06.00	113,8	
10.00	13,6	

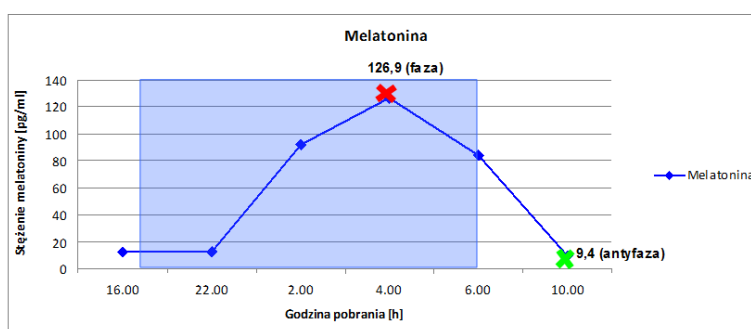


Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	80,7	< 50
22.00	21,5	
02.00	11,2	
04.00	19,1	
06.00	35,7	150-250
10.00	107,9	

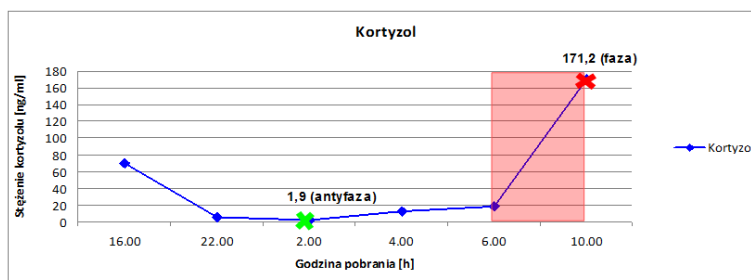


**Wykres 12.** Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 5.(P.T)

Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	12,2	4,6
22.00	12,4	
02.00	92,1	N- 70-125
04.00	126,9	77,5
06.00	84,1	
10.00	9,4	

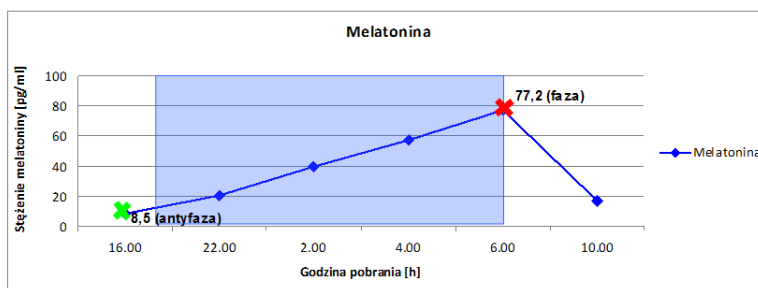


Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	70,7	< 50
22.00	5,4	
02.00	1,9	
04.00	13,2	
06.00	18,6	150-250
10.00	171,2	

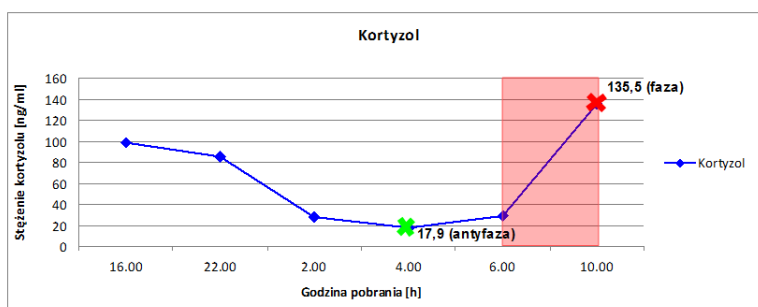


**Wykres 13.** Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi -osoba nr 6. (I.O)

Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	8,5	4,6
22.00	20,5	
02.00	39,7	N- 70-125
04.00	57,1	77,5
06.00	77,2	
10.00	17,1	

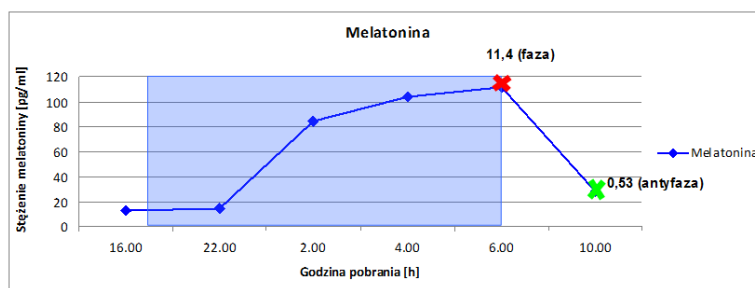


Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	98,7	< 50
22.00	85,0	
02.00	28,2	
04.00	17,9	
06.00	28,4	150-250
10.00	135,5	

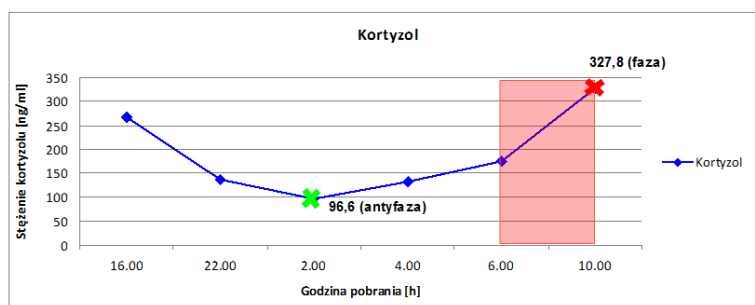


**Wykres 14.** Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 7 (E.K)

Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	13,1	4,6
22.00	14,4	
02.00	84,6	N- 70-125
04.00	104,1	77,5
06.00	111,4	
10.00	27,9	



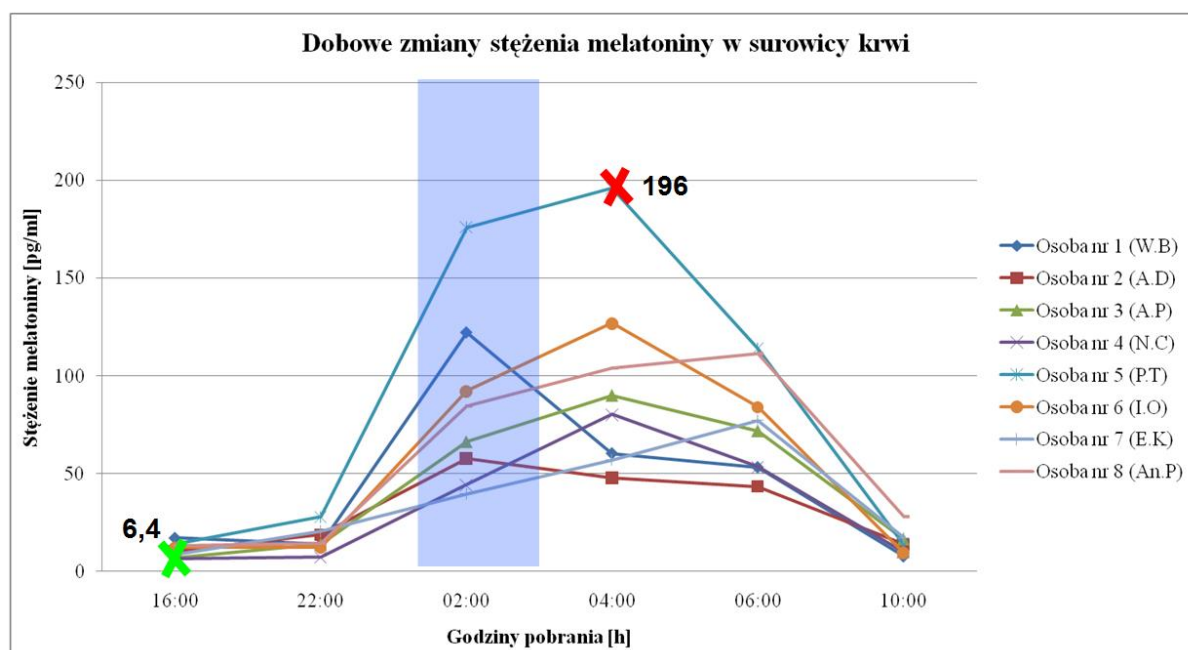
Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	267,1	< 50
22.00	137,2	
02.00	96,6	
04.00	131,7	
06.00	173,9	150-250
10.00	327,8	



**Wykres 15.** Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 8. (An.P)

	godz. 16:00	godz. 22:00	godz. 02:00	godz. 04:00	godz. 06:00	godz. 10:00
Osoba 1 <b>W.B.</b>	17,10	14,10	122,20	60,40	53,30	7,70
Osoba 2 <b>A.D</b>	10,10	18,70	57,70	47,60	43,40	13,70
Osoba 3 <b>A.P.</b>	7,00	13,90	66,20	89,90	71,80	16,60
Osoba 4 <b>N.C.</b>	6,40	7,10	44,20	80,30	53,30	9,60
Osoba 5 <b>P.T</b>	14,00	27,90	175,90	196,00	113,80	13,60
Osoba 6 <b>I.O.</b>	12,20	12,40	92,10	126,90	84,10	9,40
Osoba 7 <b>E.K.</b>	8,50	20,50	39,70	57,10	77,20	17,10
Osoba 8 <b>An.P.</b>	13,10	14,40	84,60	104,10	111,40	27,90
<b>Średnia</b>	<b>11,05</b>	<b>16,13</b>	<b>85,33</b>	<b>95,29</b>	<b>76,04</b>	<b>14,45</b>

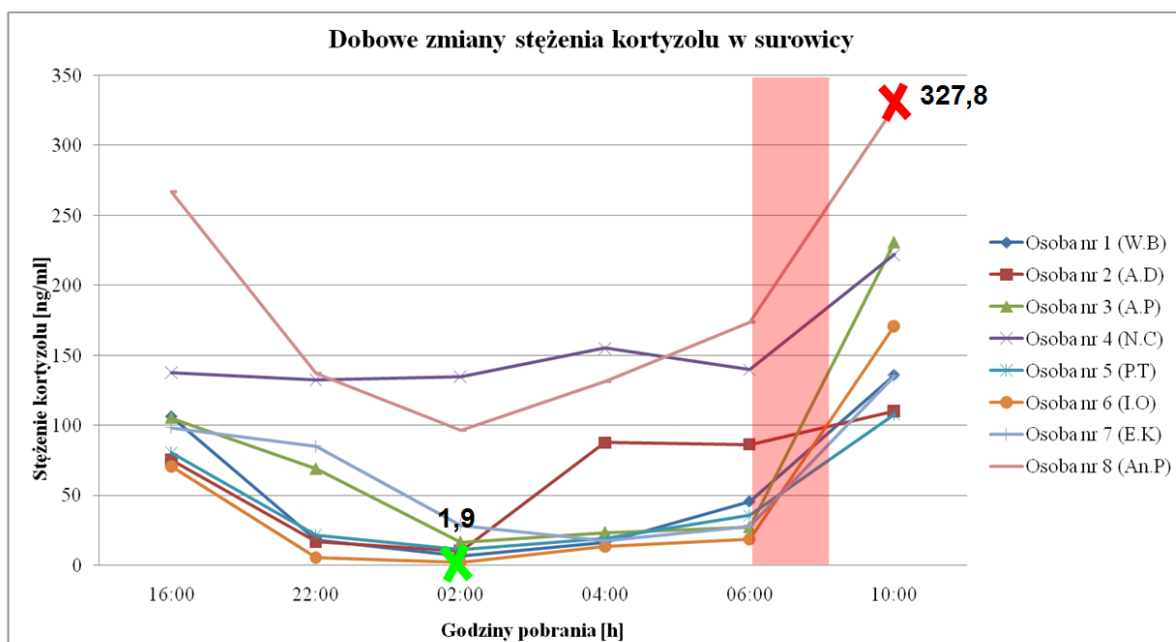
**Tabela 7.** Zmiany stężenia melatoniny w surowicy krwi [pg/ml] w grupie kontrolnej



**Wykres 16.** Zmiany stężenia melatoniny w grupie kontrolnej

	godz. 16:00	godz. 22:00	godz. 02:00	godz. 04:00	godz. 06:00	godz. 10:00
Osoba 1 W.B.	106,60	18,20	6,80	16,70	46,00	136,30
Osoba 2 A.D	75,20	16,90	10,00	87,70	86,30	110,30
Osoba 3 A.P.	105,40	69,00	16,70	23,60	27,40	230,80
Osoba 4 N.C.	137,80	132,60	135,10	155,20	139,90	222,20
Osoba 5 P.T	80,70	21,50	11,20	19,10	35,70	107,90
Osoba 6 I.O.	70,70	5,40	1,90	13,20	18,50	171,20
Osoba 7 E.K.	98,70	85,00	28,80	17,90	28,40	135,50
Osoba 8 An.P.	267,10	137,20	96,60	131,70	173,90	327,80
<b>Średnia</b>	<b>117,78</b>	<b>60,73</b>	<b>38,39</b>	<b>58,14</b>	<b>69,51</b>	<b>180,25</b>

**Tabela 8.** Zmiany stężenia kortyzolu w surowicy krwi [ng/ml] w grupie kontrolnej



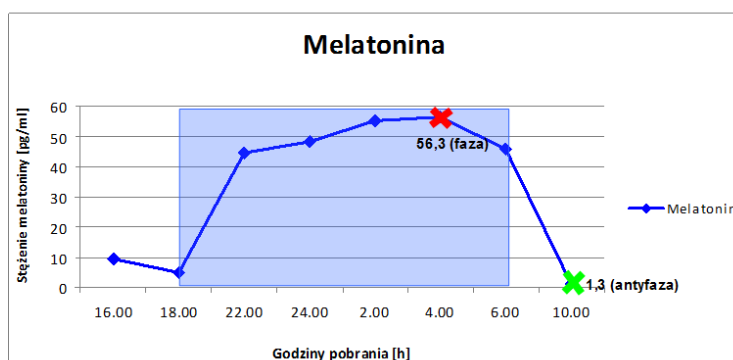
**Wykres 17.** Zmiany stężenia kortyzolu w grupie kontrolnej

## 4.2. Grupa badana

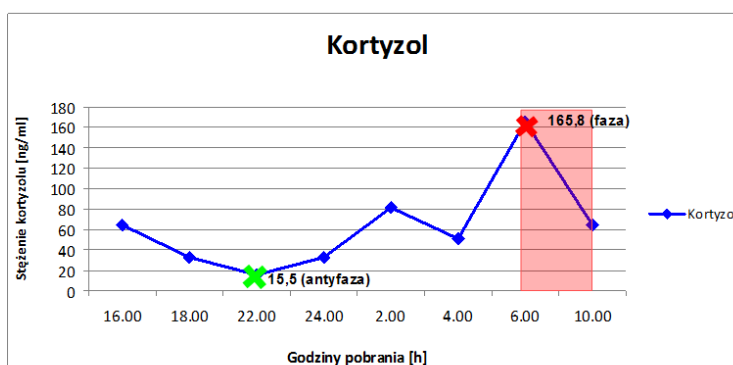
### 4.2.1. Wyniki pacjentów z chorobą Huntingtona

1. Pacjentka A.N 70-letnia w początkowym stadium choroby Huntingtona  
melatonina faza-56,3; antyfaza-1,3 kortyzol faza-165,8; antyfaza-15,5

Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	9,2	4,6
18.00	4,9	
22.00	44,4	
24.00	48,0	
02.00	54,9	N- 70-125
04.00	56,3	77,5
06.00	45,6	
10.00	1,3	



Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	63,9	< 50
18.00	32,4	
22.00	15,5	
24.00	33,4	
02.00	82,0	
04.00	51,4	
06.00	165,8	150-250
10.00	64,2	



Wykres 18. Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 1. (A.N)

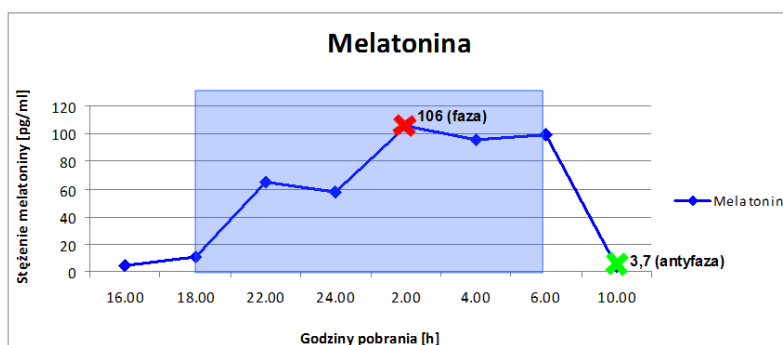


Wykres 19. Zapis aktywności ruchowej osoba nr 1.(A.N)

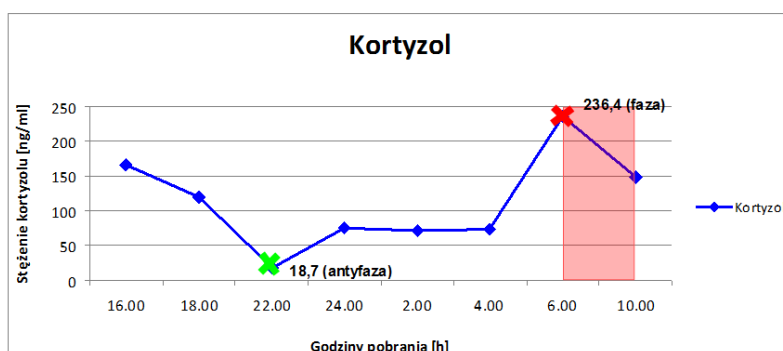


**2. Pacjentka O.O 41-letnia w początkowym stadium choroby Huntingtona**  
**melatonina faza-106; antyfaza-3,7      kortyzol faza-236,4; antyfaza-18,7**

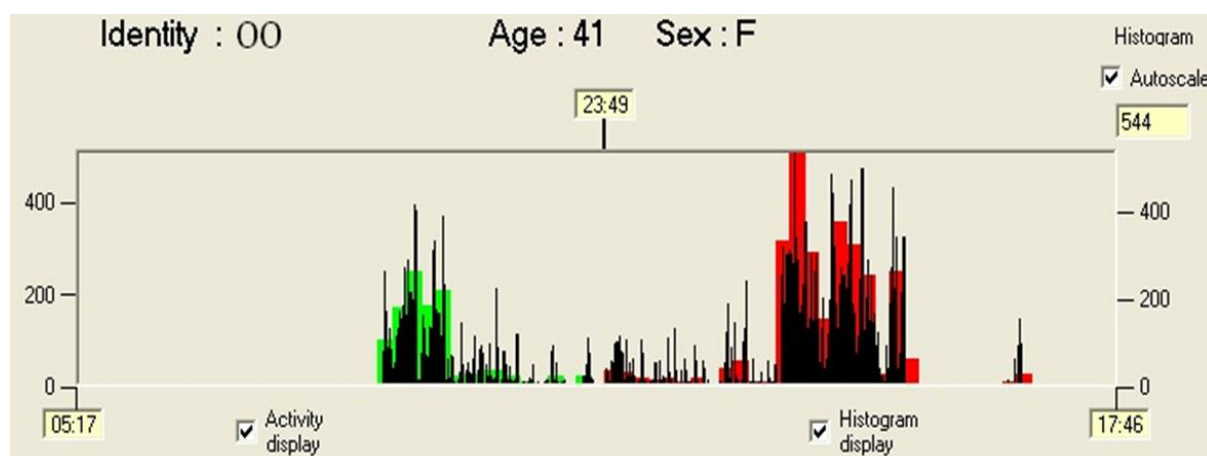
Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	4,7	4,6
18.00	10,6	
22.00	64,7	
24.00	57,9	
02.00	106,0	N- 70-125
04.00	96,0	77,5
06.00	99,3	
10.00	3,7	



Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	165,2	< 50
18.00	119,8	
22.00	18,7	
24.00	74,7	
02.00	70,9	
04.00	72,5	
06.00	236,4	150-250
10.00	147,7	



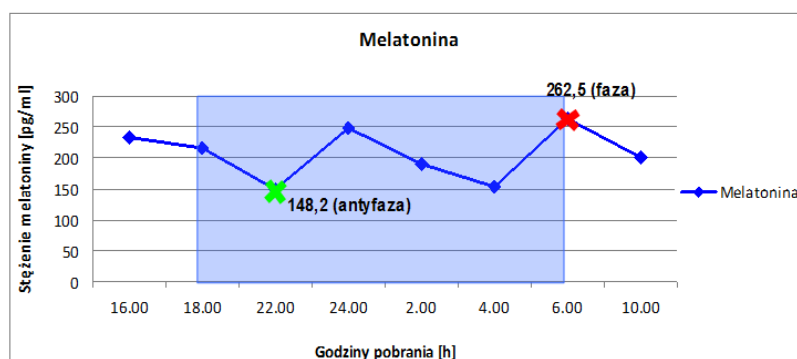
**Wykres 20.** Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 2. (O.O)



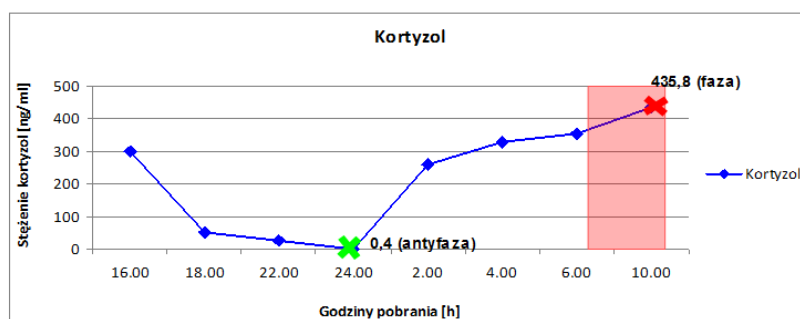
**Wykres 21.** Zapis aktywności ruchowej osoba nr 2 (O.O)

**3. Pacjentka A.P 40-letnia z początkowym stadium choroby Huntingtona**  
**melatonina faza-262,5; antyfaza-148,2 kortyzol faza-435,8; antyfaza-0,4**

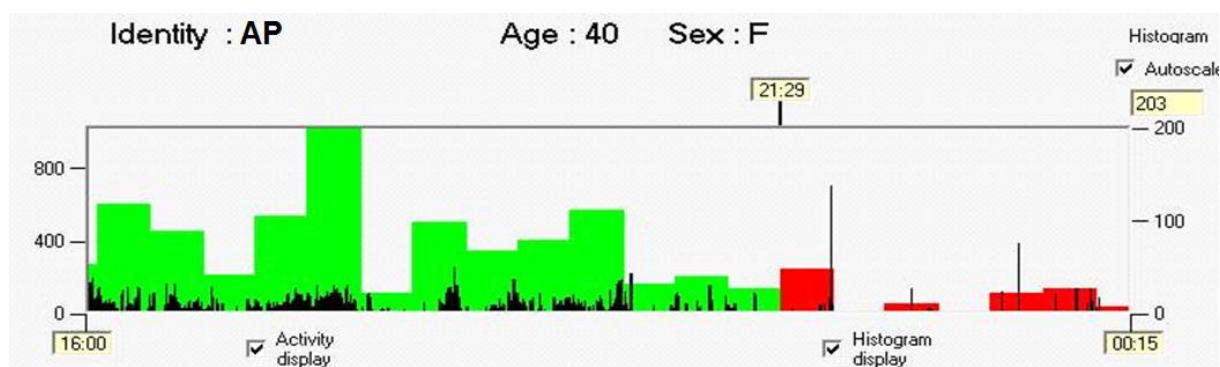
Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	232,8	4,6
18.00	215,9	
22.00	148,2	
24.00	247,4	
02.00	189,1	N- 70
04.00	152,9	77,5
06.00	262,5	
10.00	200,8	



Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	298,4	< 50
18.00	50,5	
22.00	25,2	
24.00	0,4	
02.00	260,6	
04.00	328,9	
06.00	352,3	150-250
10.00	435,8	



**Wykres 22.** Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 3. (A.P)

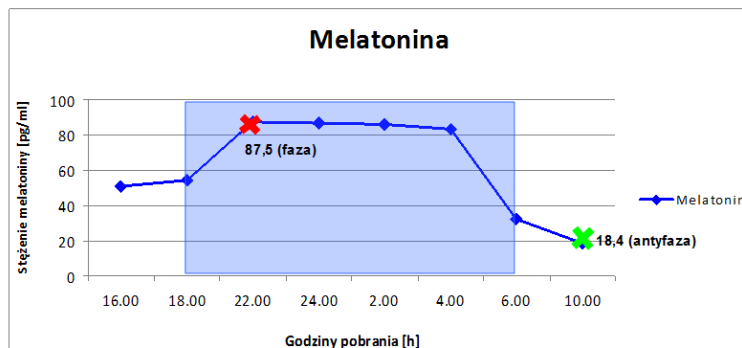


**Wykres 23.** Zapis aktywności ruchowej osoba nr 3 (A.P)

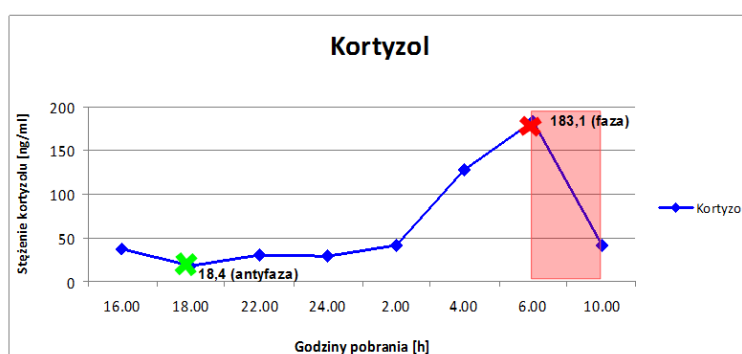


**5. Pacjent S.B 49-letni ze średniozaawansowaną chorobą Huntingtona**  
**melatonina faza-87,5; antyfaza-18,4 kortyzol faza-183,1; antyfaza-18,4**

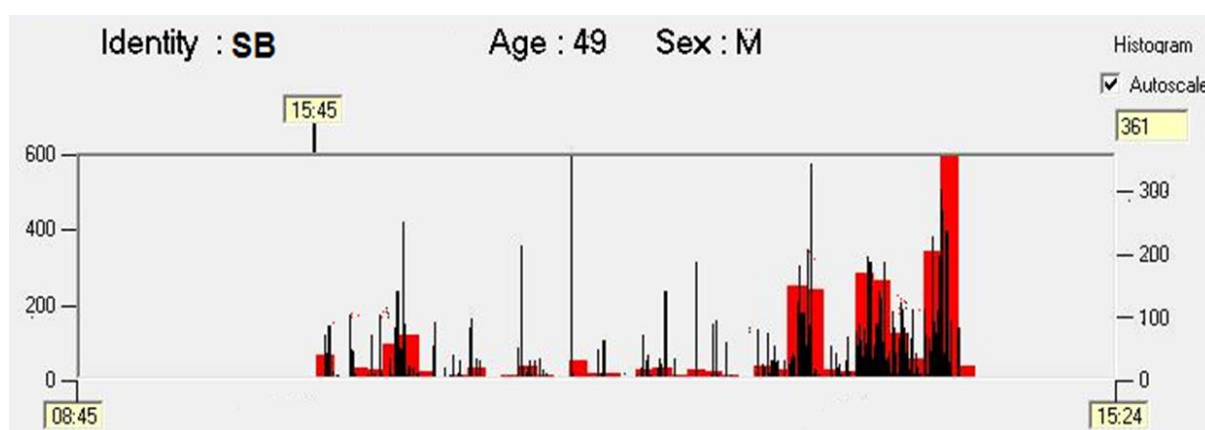
Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	50,7	4,6
18.00	54,2	
22.00	87,5	
24.00	86,7	
02.00	86,4	N- 70-125
04.00	83,7	77,5
06.00	32,4	
10.00	18,4	



Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	37,1	< 50
18.00	18,4	
22.00	31,2	
24.00	29,2	
02.00	42,1	
04.00	128,2	
06.00	183,1	150-250
10.00	41,1	



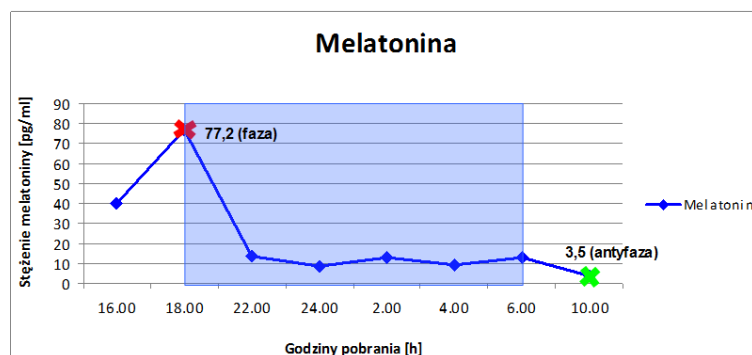
**Wykres 26.** Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 5. (S.B)



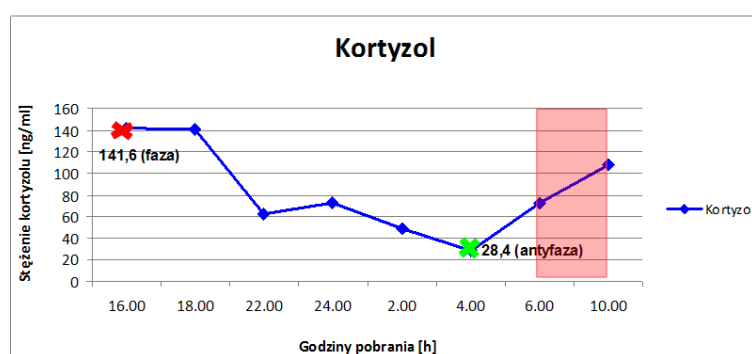
**Wykres 27.** Zapis aktywności ruchowej osoba nr 5.(S.B)

**6. Pacjentka BW 55-letnia ze średniozaawansowaną chorobą Huntingtona**  
**melatonina faza-77,2; antyfaza-3,5      kortyzol faza-141,6; antyfaza-28,4**

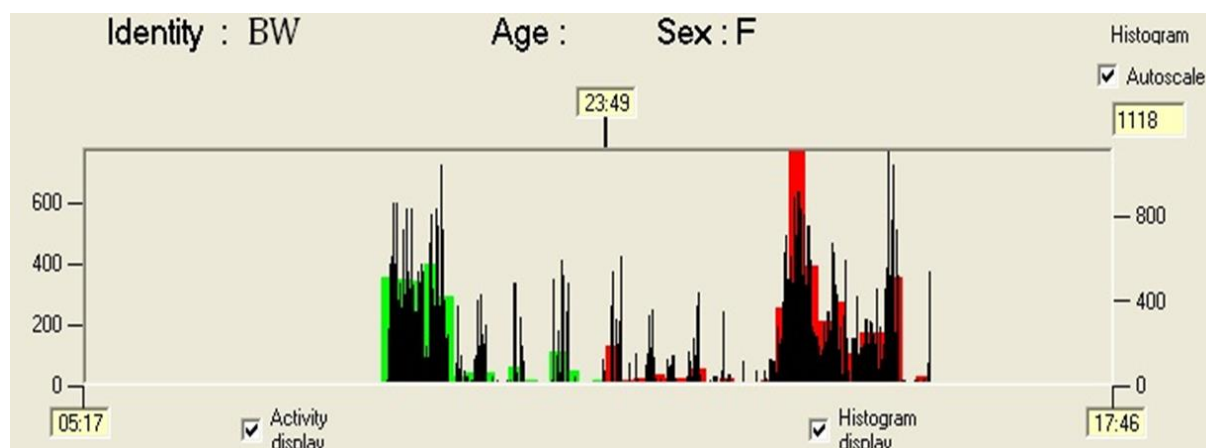
Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	40,0	4,6
18.00	77,2	
22.00	13,3	
24.00	8,8	
02.00	13,0	N- 70
04.00	9,4	77,5
06.00	12,8	
10.00	3,5	



Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	141,6	< 50
18.00	140,9	
22.00	62,6	
24.00	72,2	
02.00	48,7	
04.00	28,4	
06.00	72,8	150-250
10.00	108,0	



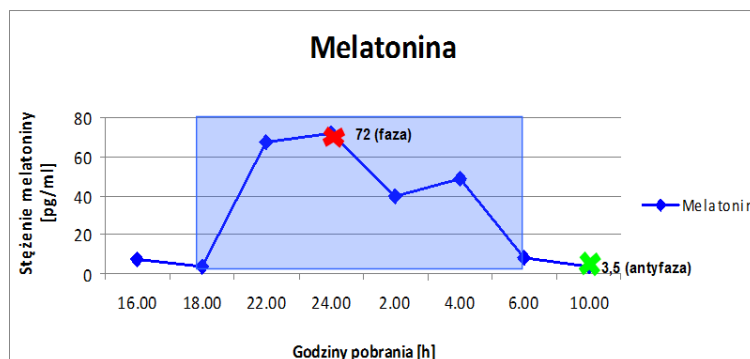
**Wykres 28.** Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 6. (B.W)



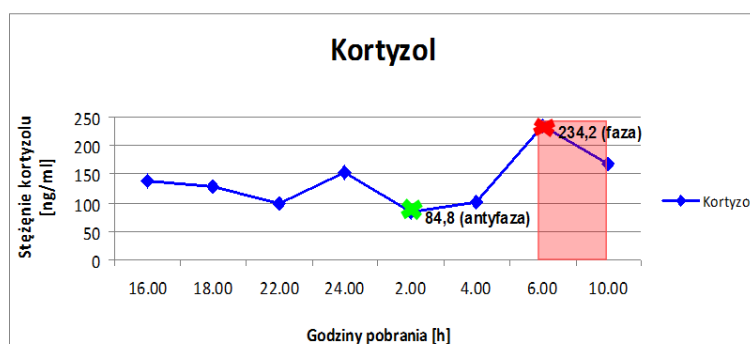
**Wykres 29.** Zapis aktywności ruchowej osoba nr 6 (B.W)

**7. Pacjentka A.M 39-letnia z zaawansowaną chorobą Huntingtona**  
**melatonina faza-72; antyfaza-3,5      kortyzol faza-234,2; antyfaza-84**

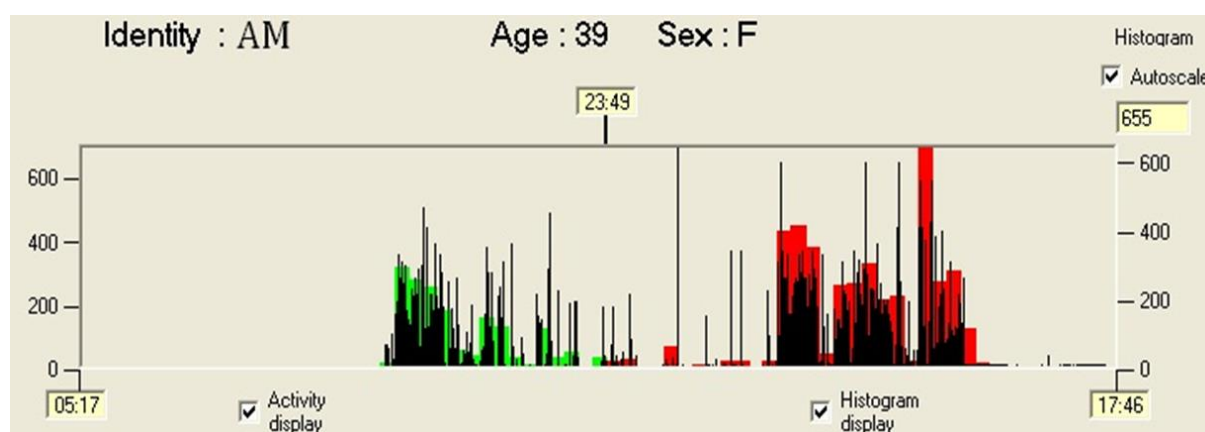
Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	7,7	4,6
18.00	4,0	
22.00	67,6	
24.00	72,0	
02.00	39,6	N- 70-125
04.00	48,6	77,5
06.00	8,3	
10.00	3,5	



Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	137,5	< 50
18.00	128,2	
22.00	98,0	
24.00	153,0	
02.00	84,8	
04.00	102,5	
06.00	234,2	150-250
10.00	169,2	



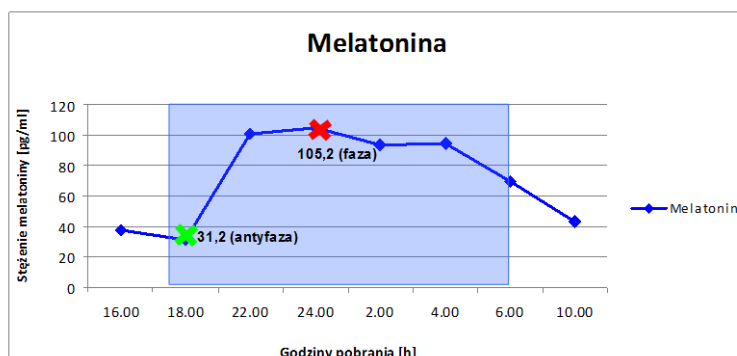
**Wykres 30.** Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 7. (A.M)



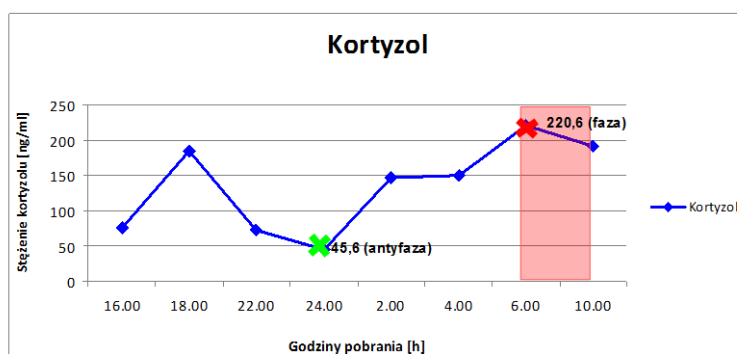
**Wykres 31.** Zapis aktywności ruchowej osoba nr 7.(A.M)

**8. Pacjentka M.W 28-letnia z zaawansowaną chorobą Huntingtona**  
**melatonina faza-105,2; antyfaza-31,2 kortyzol faza-220,6; antyfaza-45,6**

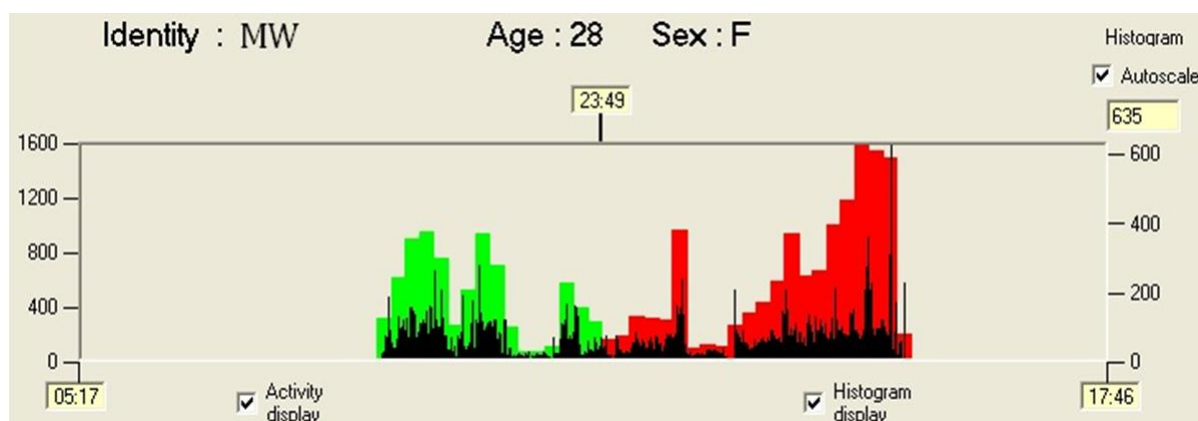
Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	37,3	4,6
18.00	31,2	
22.00	101,2	
24.00	105,2	
02.00	93,7	N- 70-125
04.00	94,6	77,5
06.00	69,6	
10.00	43,2	



Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	75,6	< 50
18.00	184,7	
22.00	73,1	
24.00	45,6	
02.00	146,7	
04.00	150,5	
06.00	220,6	150-250
10.00	191,5	



**Wykres 32.** Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 8. (M.W)



**Wykres 33.** Zapis aktywności ruchowej osoba nr 8.(M.W)

	godz. 16:00	godz. 18:00	godz. 22:00	godz. 24:00	godz. 02:00	godz. 04:00	godz. 06:00	godz. 10:00
Osoba 1 <b>A.N.</b>	9,20	4,90	44,40	48,00	54,90	56,30	45,60	1,30
Osoba 2 <b>O.O.</b>	4,70	10,60	64,70	57,90	106,00	96,00	99,30	3,70
Osoba 3 <b>A.P.</b>	232,80	215,90	148,20	247,40	189,10	152,90	262,50	200,80
Osoba 4 <b>M.Z.</b>	1,00	6,90	21,90	30,30	35,00	45,20	29,70	5,50
Osoba 5 <b>S.B.</b>	50,70	54,20	87,50	86,70	86,40	83,70	32,40	18,40
Osoba 6 <b>B.W.</b>	40,00	77,20	13,30	8,80	13,00	9,40	12,80	3,50
Osoba 7 <b>A.M.</b>	7,70	4,00	67,60	72,00	39,60	48,60	8,30	3,50
Osoba 8 <b>M.W.</b>	37,30	31,20	101,20	105,20	93,70	94,60	69,60	43,20
<b>Średnia</b>	<b>47,93</b>	<b>50,61</b>	<b>68,60</b>	<b>82,04</b>	<b>77,21</b>	<b>73,34</b>	<b>70,03</b>	<b>34,99</b>

**Tabela 9.** Zmiany stężenia melatoniny w surowicy krwi [pg/ml] pacjentów z chorobą Huntingtona

	godz. 16:00	godz. 18:00	godz. 22:00	godz. 24:00	godz. 02:00	godz. 04:00	godz. 06:00	godz. 10:00
Osoba 1 <b>A.N.</b>	63,90	32,40	15,50	33,40	82,00	51,40	165,80	64,20
Osoba 2 <b>O.O.</b>	165,20	119,80	18,70	74,70	70,90	72,50	236,40	147,70
Osoba 3 <b>A.P.</b>	298,40	50,50	25,20	0,40	260,60	328,90	352,30	435,80
Osoba 4 <b>M.Z.</b>	43,60	19,40	12,20	29,00	47,60	101,80	123,70	72,80
Osoba 5 <b>S.B.</b>	37,10	18,40	31,20	29,20	42,10	128,20	183,10	41,10
Osoba 6 <b>B.W.</b>	141,60	140,90	62,60	72,20	48,70	28,40	72,80	108,00
Osoba 7 <b>A.M.</b>	137,50	128,20	98,00	153,00	84,80	102,50	234,20	169,20
Osoba 8 <b>M.W.</b>	75,60	184,70	73,10	45,60	146,70	150,50	220,60	191,50
<b>Średnia</b>	<b>120,36</b>	<b>86,79</b>	<b>42,06</b>	<b>54,69</b>	<b>97,93</b>	<b>120,53</b>	<b>198,61</b>	<b>153,79</b>

**Tabela 10.** Zmiany stężenia kortyzolu w surowicy krwi [ng/ml] pacjentów z chorobą Huntingtona

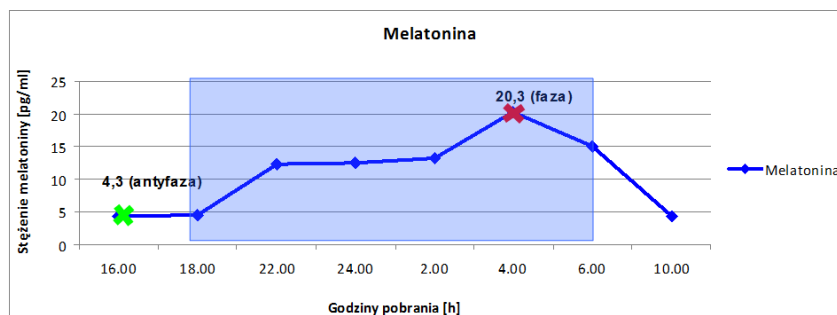


## 4.2.2. Wyniki pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu

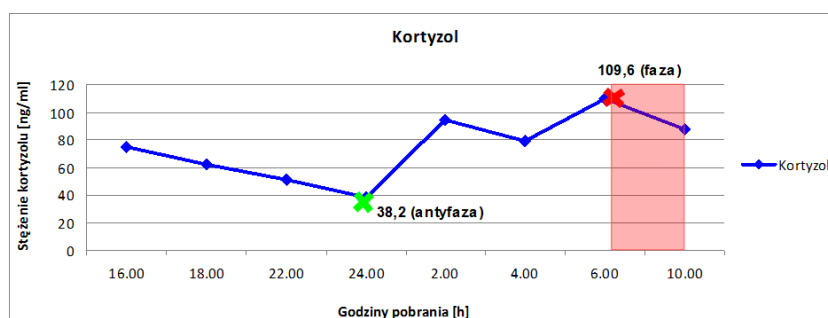
### 1. Pacjentka E.B 61-letnia z udarem niedokrwiennym mózgu

melatonina faza-20,3; antyfaza-4,3 kortyzol faza-109,6; antyfaza-38,2

Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	4,3	4,6
18.00	4,5	
22.00	12,4	
24.00	12,5	
02.00	13,3	N- 70-125
04.00	20,3	77,5
06.00	15	
10.00	4,3	



Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	75	< 50
18.00	62,2	
22.00	50,7	
24.00	38,2	
02.00	94,5	
04.00	79	
06.00	109,6	150-250
10.00	87,8	



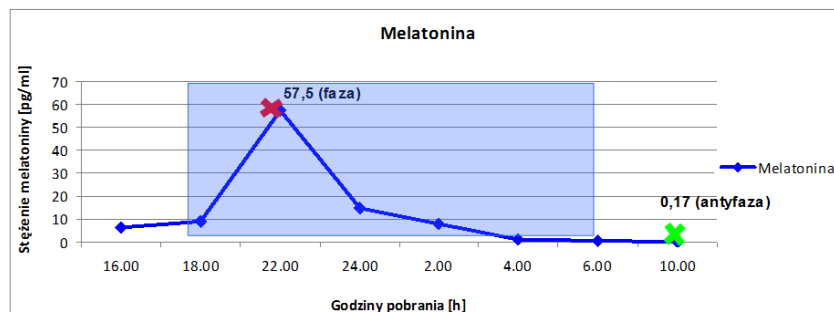
Wykres 34. Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 1. (E.B)



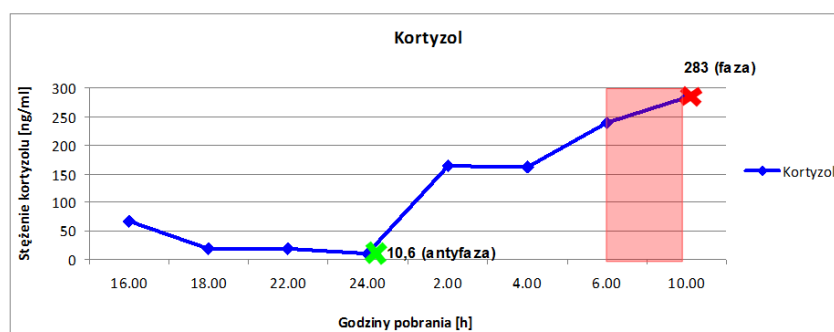
Wykres 35. Zapis aktywności ruchowej osoba nr 1 (E.B)

**2. Pacjentka A.F 55-letnia z udarem niedokrwiennym mózgu**  
**melatonina faza-57,5; antyfaza-0,17 kortyzol faza-283; antyfaza-10,6**

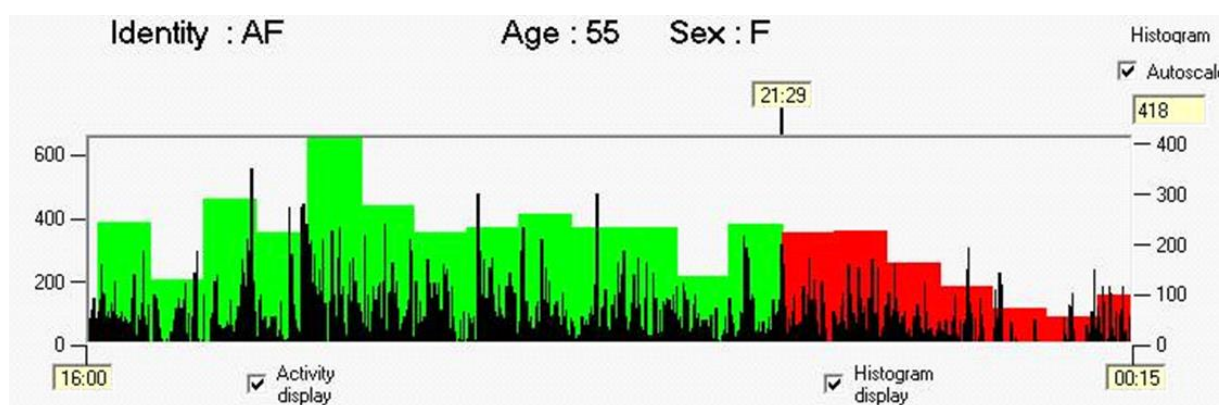
Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	6,4	4,6
18.00	8,9	
22.00	57,5	
24.00	14,6	
02.00	7,7	N- 70-125
04.00	1,2	77,5
06.00	0,45	
10.00	0,17	



Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	68	< 50
18.00	18,7	
22.00	18,2	
24.00	10,6	
02.00	164,2	
04.00	160,5	
06.00	238,2	150-250
10.00	283	



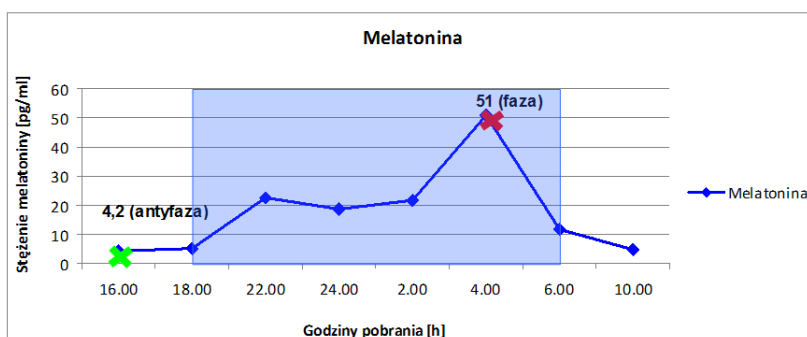
**Wykres 36.** Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 2. (A.F)



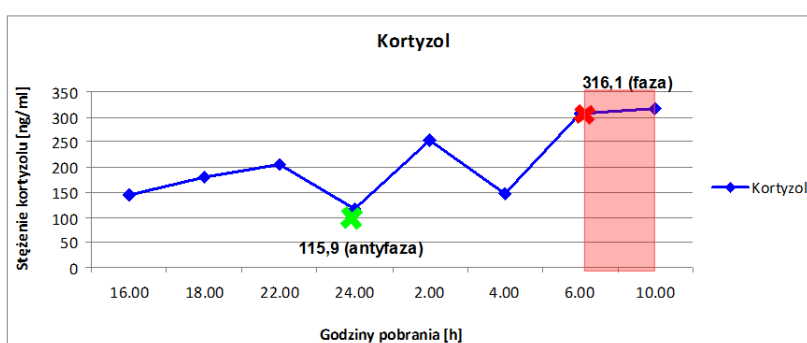
**Wykres 37.** Zapis aktywności ruchowej osoba nr 2 (A.F)

### 3. Pacjentka U.K 84-letnia z udarem niedokrwiennym mózgu melatonina faza-51; antyfaza-4,2 kortyzol faza-316,1; antyfaza-115,9

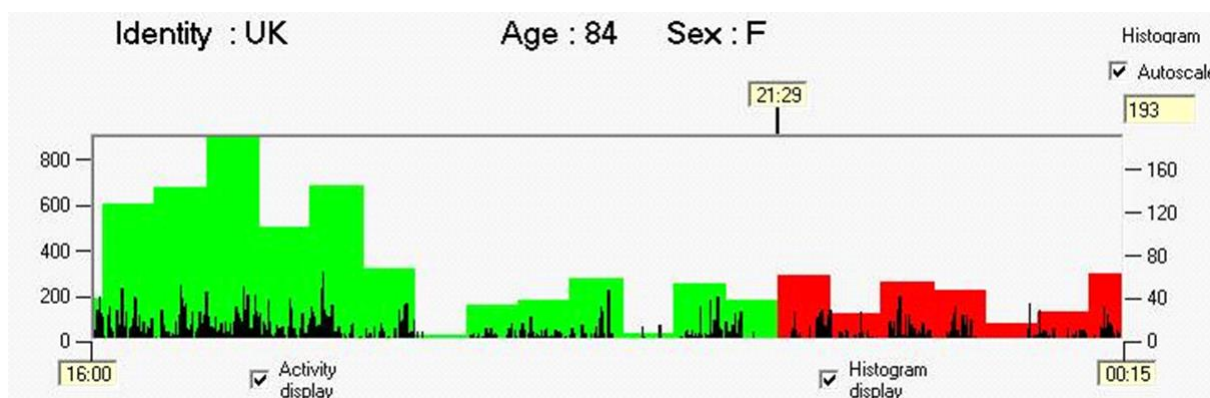
Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	4,2	4,6
18.00	5,4	
22.00	22,7	
24.00	18,7	
02.00	21,7	N- 70-125
04.00	51	77,5
06.00	11,6	
10.00	4,6	



Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	145,6	< 50
18.00	179,7	
22.00	204,6	
24.00	115,9	
02.00	254,6	
04.00	146,8	
06.00	307,8	150-250
10.00	316,1	



Wykres 38. Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 3. (U.K)

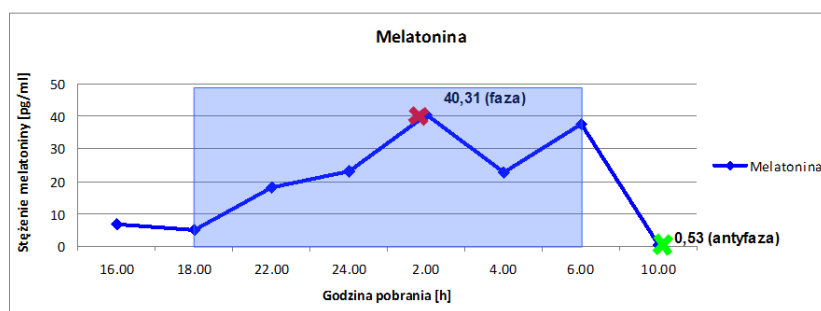


Wykres 39. Zapis aktywności ruchowej osoba nr 3 (U.K)

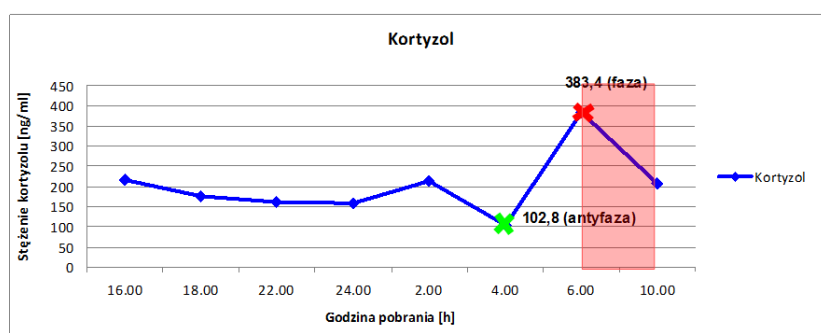
## 4. Pacjent R.K 62-letni z udarem niedokrwiennym mózgu

melatonina faza-40,31; antyfaza-0,53 kortyzol faza-383,4; antyfaza-102,8

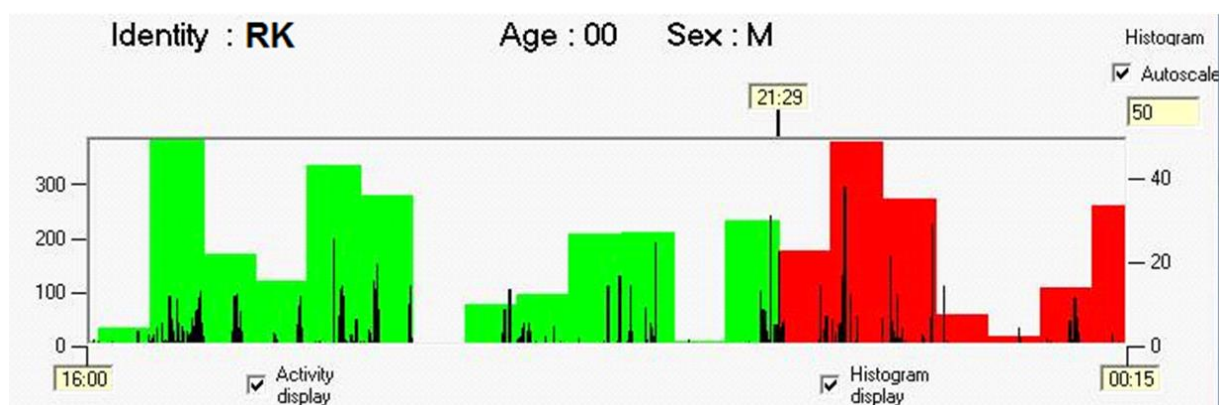
Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	6,71	4,6
18.00	5,1	
22.00	18,21	
24.00	23,04	
02.00	40,31	N- 70-125
04.00	22,79	77,5
06.00	37,71	
10.00	0,53	



Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	216,7	< 50
18.00	175	
22.00	162,8	
24.00	158,9	
02.00	213,5	
04.00	102,85	
06.00	383,4	150-250
10.00	207,1	



Wykres 40. Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 4. (R.K)

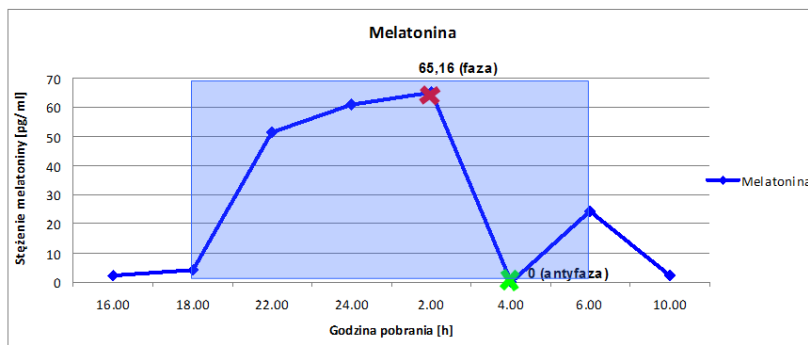


Wykres 41. Zapis aktywności ruchowej osoba nr 4 (R.K)

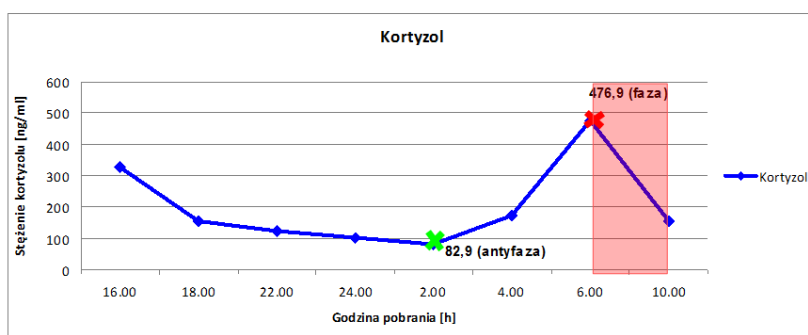
## 5. Pacjent R. M 56-letni z udarem niedokrwiennym mózgu

melatonina faza-65,16; antyfaza-0 kortyzol faza-476,9; antyfaza-82,9

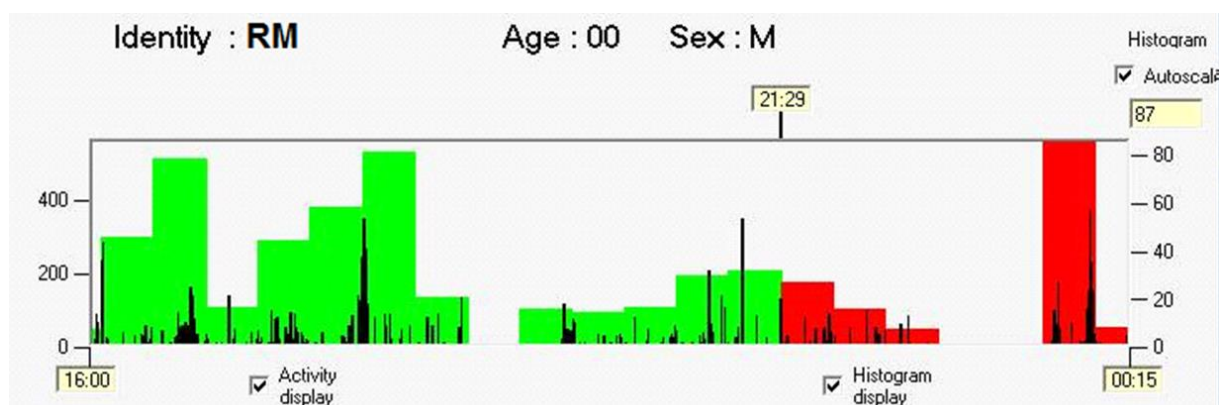
Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	2,1	4,6
18.00	4,3	
22.00	51,39	
24.00	60,86	
02.00	65,16	N- 70-125
04.00	0	77,5
06.00	24,18	
10.00	2,23	



Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	327,4	< 50
18.00	156,6	
22.00	122,6	
24.00	100,9	
02.00	82,9	
04.00	174,2	
06.00	476,9	150-250
10.00	156,6	



Wykres 42. Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi osoba nr 5. (R.M)

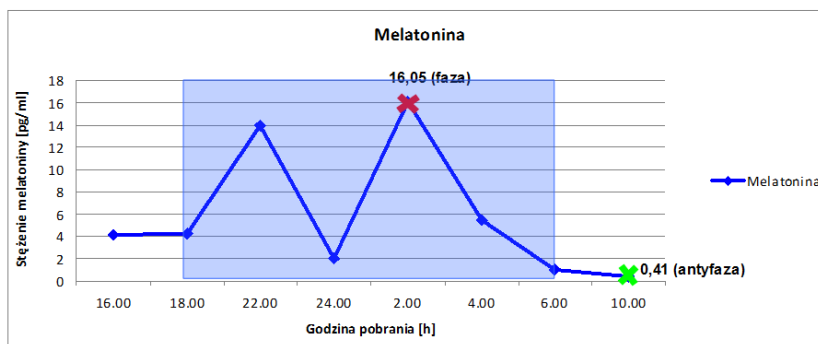


Wykres 43. Zapis aktywności ruchowej osoba nr 5 (R.M)

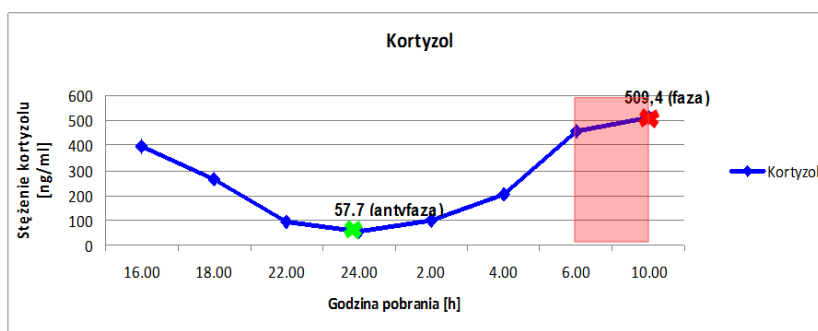
## 6. Pacjent A. Rz 60-letni z udarem niedokrwiennym mózgu

melatonina faza-16,05; antyfaza-0,41 kortyzol faza-509,4; antyfaza-57,7

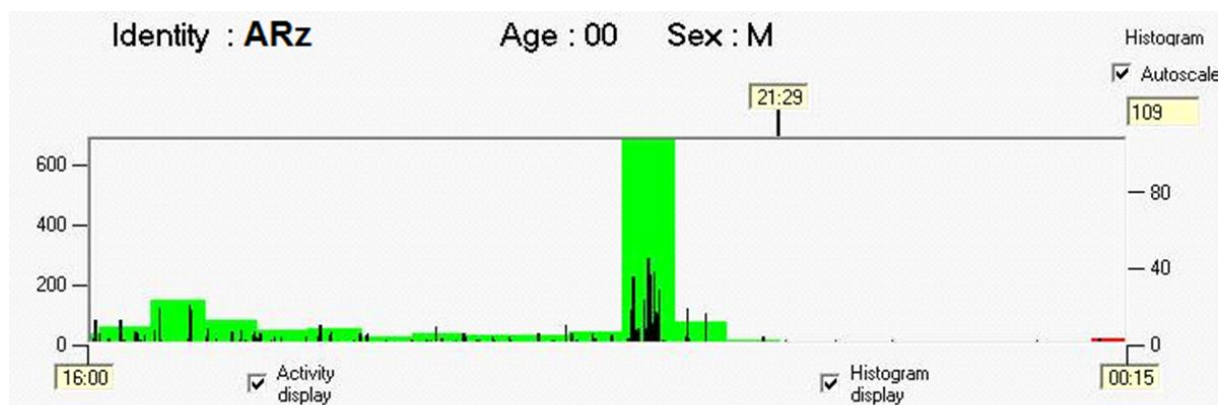
Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	4,12	4,6
18.00	4,2	
22.00	13,98	
24.00	2,05	
02.00	16,05	N- 70-125
04.00	5,51	77,5
06.00	1,01	
10.00	0,41	



Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	397,5	< 50
18.00	262,7	
22.00	92,5	
24.00	57,7	
02.00	99,6	
04.00	206	
06.00	458,8	150-250
10.00	509,4	



Wykres 44. Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 6. (A.Rz)

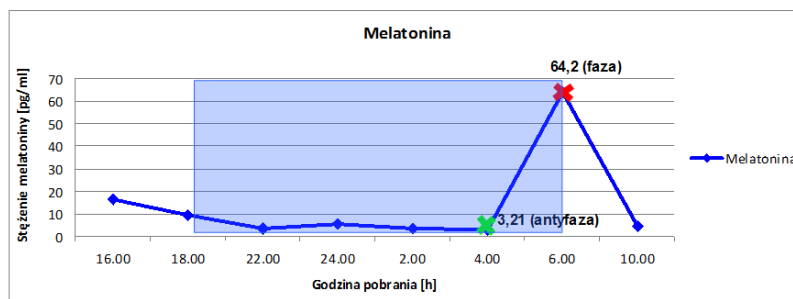


Wykres 45. Zapis aktywności ruchowej osoba nr 6 (A.Rz)

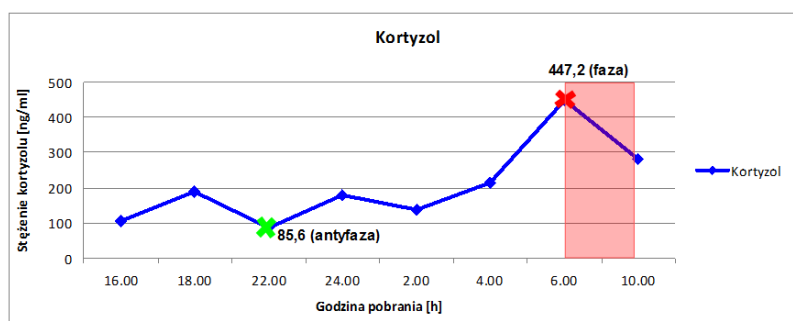
## 7. Pacjent H. W 58-letni z udarem niedokrwiennym mózgu

melatonina faza-64,2; antyfaza-3,21 kortyzol faza-447,2; antyfaza-85,6

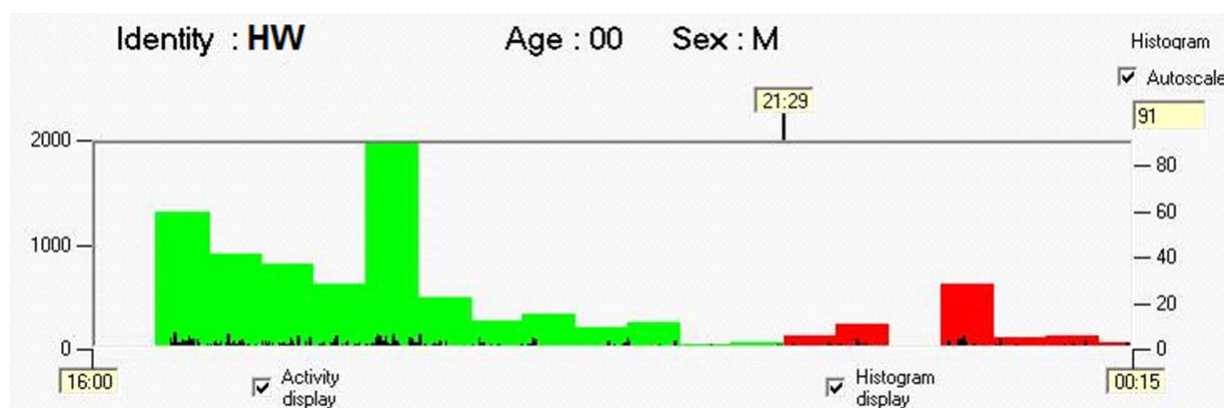
Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	16,58	4,6
18.00	9,29	
22.00	3,27	
24.00	5,51	
02.00	3,58	N- 70-125
04.00	3,21	77,5
06.00	64,2	
10.00	4,49	



Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	106,7	<50
18.00	189,31	
22.00	85,6	
24.00	179,3	
02.00	138,4	
04.00	214,5	
06.00	447,2	150-250
10.00	283,3	



Wykres 46. Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 7. (H.W)



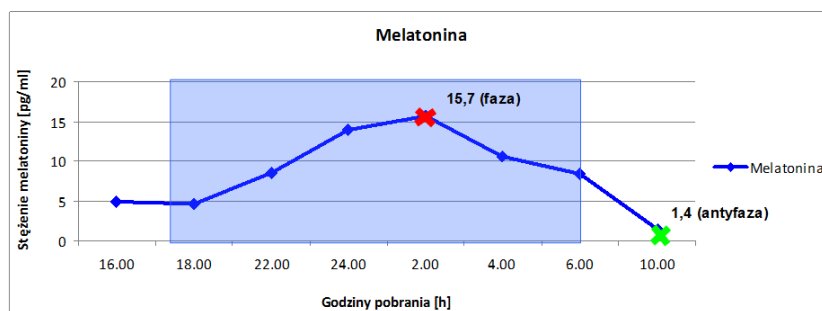
Wykres 47. Zapis aktywności ruchowej osoba nr 7 (H.W)



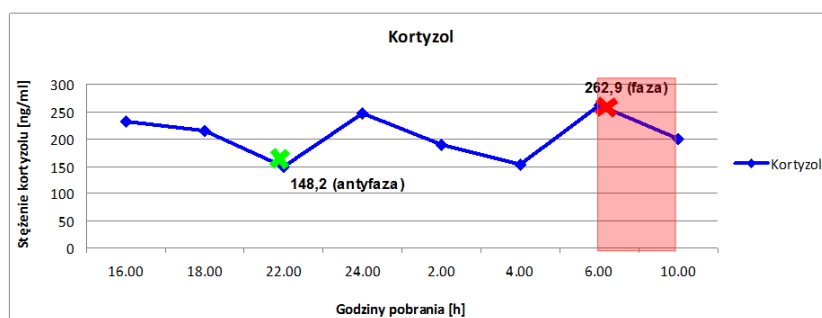
## 8. Pacjent T. K 58-letni z udarem niedokrwiennym mózgu

melatonina faza-15,7; antyfaza-1,4 kortyzol faza-262,9; antyfaza-148,2

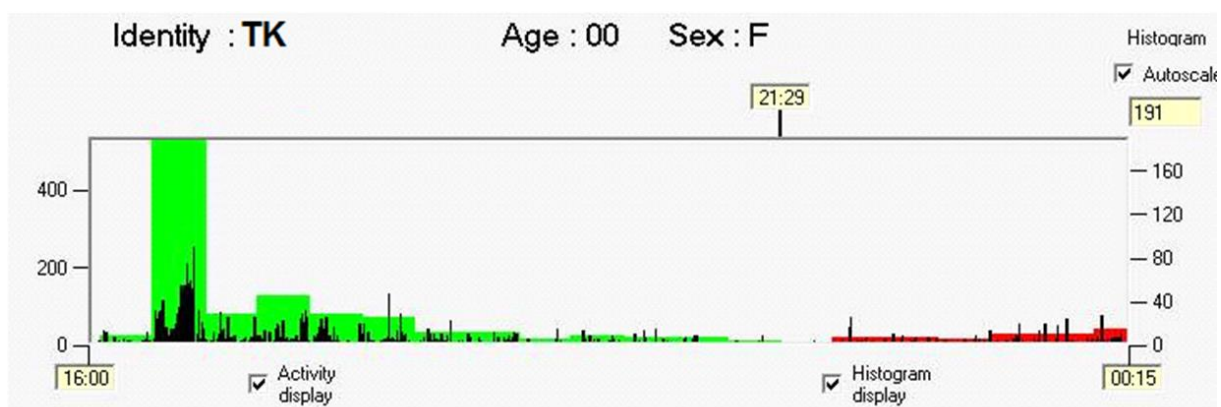
Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	4,9	4,6
18.00	4,7	
22.00	8,6	
24.00	13,9	
02.00	15,7	N- 70-125
04.00	10,6	77,5
06.00	8,4	
10.00	1,4	



Godz.	Stężenie	Wartość ref.
16.00	232,8	< 50
18.00	215,9	
22.00	148,2	
24.00	247,4	
02.00	189,1	
04.00	152,9	
06.00	262,5	150-250
10.00	200,8	



Wykres 48. Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 8. (T.K)



Wykres 49. Zapis aktywności ruchowej osoba nr 8 (T.K)



	godz. 16:00	godz. 18:00	godz. 22:00	godz. 24:00	godz. 02:00	godz. 04:00	godz. 06:00	godz. 10:00
Osoba 1 <b>E.B.</b>	4,30	4,50	12,40	12,50	13,30	20,30	15,00	4,30
Osoba 2 <b>A.F.</b>	6,40	8,90	57,50	14,60	7,70	1,20	0,45	0,17
Osoba 3 <b>U.K.</b>	4,20	5,40	22,70	18,70	21,70	51,00	11,60	4,60
Osoba 4 <b>R.K.</b>	6,71	5,10	18,21	23,04	40,31	22,79	37,71	0,53
Osoba 5 <b>R.M.</b>	2,10	4,30	51,39	60,86	65,16	0,00	24,18	2,23
Osoba 6 <b>A.Rz.</b>	4,12	4,20	13,98	2,05	16,05	5,51	1,01	0,41
Osoba 7 <b>H.W.</b>	16,58	9,29	3,27	5,51	3,58	3,21	64,20	4,49
Osoba 8 <b>T.K.</b>	4,90	4,70	8,60	13,90	15,70	10,60	8,40	1,40
<b>Średnia</b>	<b>6,16</b>	<b>5,80</b>	<b>23,51</b>	<b>18,90</b>	<b>22,94</b>	<b>14,33</b>	<b>20,32</b>	<b>2,27</b>

**Tabela 11.** Zmiany stężenia melatoniny w surowicy krwi [pg/ml] pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu

	godz. 16:00	godz. 18:00	godz. 22:00	godz. 24:00	godz. 02:00	godz. 04:00	godz. 06:00	godz. 10:00
Osoba 1 <b>E.B.</b>	75,00	62,20	50,70	38,20	94,50	79,00	109,60	97,80
Osoba 2 <b>A.F.</b>	68,00	18,70	18,20	10,60	164,20	160,50	238,20	283,00
Osoba 3 <b>U.K.</b>	145,60	179,70	204,60	115,90	254,60	146,80	307,80	316,10
Osoba 4 <b>R.K.</b>	216,70	175,00	162,80	158,90	213,50	102,85	383,40	207,10
Osoba 5 <b>R.M.</b>	327,40	156,60	122,60	100,90	82,90	174,20	476,90	156,60
Osoba 6 <b>A.Rz.</b>	397,50	262,70	92,50	57,70	99,60	206,00	458,80	509,40
Osoba 7 <b>H.W.</b>	106,70	189,31	85,60	179,30	138,40	214,50	447,20	283,30
Osoba 8 <b>T.K.</b>	232,80	215,90	148,20	247,40	189,10	152,90	262,50	200,80
<b>Średnia</b>	<b>196,21</b>	<b>157,51</b>	<b>110,65</b>	<b>113,61</b>	<b>154,60</b>	<b>154,59</b>	<b>335,55</b>	<b>256,76</b>

**Tabela 12.** Zmiany stężenia kortyzolu w surowicy krwi [ng/ml] pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu

## 5. Trudności w badaniach

Trudności w badaniach związane były z procesem rekrutacji pacjentów oraz warunków przeprowadzenia samego badania.

Choroba Huntingtona jest rzadką chorobą uwarunkowaną genetycznie a częstość występowania choroby to 4-8 osób na 100 tys. mieszkańców. Osoby rekrutowane do badań były pacjentami Kliniki Neurologii UM w Poznaniu oraz przesyłani z poznańskiego ośrodka European Huntington's Disease Network (EHDN).

Przed przystąpieniem do badania rytmów, pacjenci zbadani byli przez specjalistę neurologa oraz przeprowadzone zostały badania genetyczne potwierdzające chorobę. Zrekrutowanych do badania zostało 12 osób, jednak zgodę na badanie udzieliło 9 osób. W trakcie badania odpadła jedna osoba, a główne trudności polegały na długotrwałym procesie kwalifikacji związanym z badaniami genetycznymi oraz niechęci pacjentów do wzięcia udziału w badaniu.

Choroba Huntingtona (HD) wiąże się z piętnem i wiele rodzin, w których występuje ukrywa ten fakt, a wiedza na temat tej choroby w społeczeństwie jest niewielka.

U pacjentów narastają z czasem zaburzenia poznawcze, które prowadzą do otępienia a zaburzenia ruchowe mogą być poprzedzone zmianami stanu psychicznego takim jak obniżenie nastroju, labilność emocjonalna, drażliwość, apatia, abulia, zachowania agresywne i autoagresywne.

Do najczęstszych zaburzeń emocjonalnych u pacjentów z chorobą Huntingtona należy depresja, która pojawia się nawet rok przed wystąpieniem objawów ruchowych i dotyczy ok. 60% chorych.

Ze względu na zaburzenia depresyjne pacjenci niechętnie wychodzą z domu i trudno ich było przekonać do pobytu w szpitalu na czas trwania badania. Osoba przeprowadzająca badanie (autorka tej pracy) przebywała z chorymi przez cały czas trwania badania w szpitalu, często karmiąc chorych, wykonując zarówno czynności lekarskie jak i pielęgnacyjne oraz pomoc w toalecie.

Rekrutacja pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu odbywała się na Oddziale Udarowym CM HCP w Poznaniu po wykonaniu badania neurologicznego oraz badania tomografii komputerowej głowy wykluczającym niedokrwienie w podwzgórzu. Początkowo do badania włączono 12 pacjentów lecz 2 pacjentów wycofało się w trakcie badania natomiast 2 osoby odpadły z powodu trudności technicznych wynikających podczas badania.

Pacjenci z udarem niedokrwiennym mózgu z kolei zgłaszali niechęć do przebywania przez 18 godzin w pozycji leżącej w osobnych zaciemnionych salach.

Trudności wynikające z samego przeprowadzenia pobierania materiału do badań, wynikało z częstości pobrań, które odbywały się osiem razy na dobę, w całkowitym zaciemnieniu, tylko wyłącznie z punktowym oświetleniem żyły łokciowej. Problemem również było utrzymanie drożności wkłucia założonego do żyły łokciowej, niemożności podawania z tego dostępu leków oraz w kilku przypadkach zmianę wenflonu podczas trwania badania z wyłącznie punktowym oświetleniem. W czasie badania powyższe procedury wykonywała osobiście autorka tej pracy.

Przed rozpoczęciem badania pacjenci, rodziny chorych oraz personel oddziału zostali poinformowani o konieczności całkowitego zaciemnienia pomieszczenia. Chorzy podczas badania nie mogli oglądać telewizji, odbierać telefonów, wstawać do toalety oraz przez cały czas znajdowali się w pozycji leżącej i półleżącej pod ciągłą obserwacją lekarza będącego autorką pracy.

## 6. Dyskusja

Większość procesów w organizmach żywych podlega cyklicznej zmienności w postaci samopodtrzymujących się oscylacji zjawisk fizjologicznych, nazywanych rytmami biologicznymi.

Najważniejszym modulatorem aktywności zegara biologicznego u ssaków, umiejscowionego w jądrze nadskrzyżowaniowym (SCN), znajdującym się w podwzgórzu, jest światło słoneczne lub sztuczne. Bodźce świetlne oraz rytmiczna aktywność SCN są najważniejszymi nadawcami i synchronizatorami rytmów biologicznych. Cechą charakterystyczną dla rytmów okołodobowych jest wrażliwość na światło, które

- a) przesuwa fazę rytmu: przyspieszając (*phase advance*), kiedy bodziec świetlny działa w drugiej połowie nocy lub opóźniając (*phase delay*), kiedy przesunięcie fazy do tyłu występuje w wyniku ekspozycji na światło w pierwszej połowie nocy;
- b) zakłóca przebieg danego parametru w danym cyklu (tzw. efekt „ostry” działania światła) nie powodując przesunięcia fazy rytmu. [4]

Zaburzenia rytmów okołodobowych mogą prowadzić do wzrostu zachorowań na choroby somatyczne, psychiczne a także neurodegeneracyjne.

Klasycznym przykładem jest rytm okołodobowego wydzielania melatoniny, której synteza przebiega stopniowo w szyszynce, niewielkim tworze stanowiącym część podwzgórza.

Podstawową rolą fizjologiczną melatoniny jest kontrola rytmów biologicznych m.in. okołodobowego rytmu sen-czuwanie i zmian temperatury ciała . [9,10,106]

Stężenie melatoniny we krwi zaczyna wzrastać późnym wieczorem, osiągając najwyższe wartości między godziną 2 a 3 w nocy wynosząc 80-150pg/ml, po czym łagodnie obniża się pod wpływem bodźców świetlnych do wartości 10-20 pg/ml nad ranem. [97]

Kortyzol zwany również hormonem stresu jest glikokortykosteroidem, wytwarzanym przez warstwę pasmowatą kory nadnerczy. Istnieje rytm dobowy wydzielania kortyzolu, który regulowany jest przez centralny układ nerwowy a profil rytmu dobowego jest zależny od pory snu i czuwania. Wydzielanie kortyzolu w godzinach wieczornych jest niskie, pomiędzy

godziną 23:00 a 4:00 jego stężenie wynosi  $<50$  ng/ml. Największe stężenie kortyzolu osiąga między godziną 6:00 a 8:00 i wynosi 150-250ng/ml.

W wydzielaniu kortyzolu występuje duża zmienność. Zmiany stężenia są widoczne w godzinach snu, a także w fazach oświetlenia. Rytm może być zaburzony poprzez stres psychiczny lub fizyczny, pracę zmianową oraz różne choroby, do których zalicza się zespół Cushinga i przewlekłą niewydolność nerek. W ciągu kilku minut od wystąpienia stresu dochodzi do wzrostu wydzielania kortyzolu poprzez wzrost wydzielania podwzgórzowego CRH i przysadkowego ACTH. Gdy reakcja na stres jest przedłużona ma to również wpływ na zaburzenie dobowego wydzielania kortyzolu. [78]

U badanych przez nas pacjentów z chorobą Huntingtona oraz udarem niedokrwiennym mózgu chcieliśmy określić, na podstawie profilu okołodobowego melatoniny i kortyzolu, prawidłowości lub nieprawidłowości w zakresie rytmów biologicznych oraz stwierdzić przydatność oznaczania stężenia melatoniny i kortyzolu do oceny stopnia zaawansowania choroby Huntingtona.

Do analizy wyników wykorzystaliśmy metodę cosinorową, która podaje trzy parametry charakteryzujące daną częstotliwość takich jak MESOR, amplitudę oraz przesunięcie fazowe. Metoda ta jest często stosowana do oceny zmienności rytmów biologicznych.

Selmaoui i współpracownicy, do wyznaczenia parametrów rytmów okołodobowych, zastosowali w swoim badaniu również metodę cosinorową. Badanie przeprowadzili na 31 zdrowych osobach w wieku od 20-30 lat oznaczając poziom melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi, trzykrotnie w odstępach dwóch tygodni, w godzinach 11-20 oraz pomiędzy 22 a 8 rano. Stwierdzono, że melatonina i kortyzol są stabilnymi i dobrymi znacznikami do oceny rytmów okołodobowych. [98]

Kolejnym badaniem, które wykazało dużą skuteczność oceny rytmów biologicznych na podstawie stężenia melatoniny i kortyzolu było przeprowadzone przez Premkumar i współpracowników doświadczenie przeprowadzone u zdrowych naukowców, przebywających w Arktyce. Przez ponad rok byli oni narażeni na ekstremalne warunki atmosferyczne, a na podstawie stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi oceniono ich rytmy biologiczne. Krew do analizy pobierano 4x na dobę w godzinach 8.00, 15.00, 20.00 i

2.00 w nocy. Badania wykazały, że rytm dobowy kortyzolu była porównywalny latem polarnym oraz zimą, natomiast dobowe wydzielanie melatoniny było wyższe podczas zimy polarnej a wzrost ten utrzymywał się przez cały dzień. Wpłynęło to istotnie na lepszą jakość snu w okresie zimowym . [87]

Pierwszym badaniem, w którym szczegółowo opisano rytm dobowy melatoniny u pacjentów z chorobą Huntingtona (HD) było badanie przeprowadzone przez Aziz Ahmad i jego współpracowników. Badanie to przeprowadzono na grupie dziewięciu chorych i dziewięciu zdrowych osobach stanowiących grupę kontrolną. Krew pobierano z żyły łokciowej co 45 minut od godz. 16.30 przez 24 godziny. Stwierdzono opóźniony wzrost wydzielania melatoniny w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast nie było statystycznej różnicy w średnim dobowym stężeniu melatoniny u pacjentów z chorobą Huntingtona i grupą kontrolną. Wysłano wniosek, że stężenie melatoniny w surowicy krwi jest odwrotnie proporcjonalne do zaawansowania choroby. [15] Opóźniony początek wydzielania melatoniny u pacjentów z HD, przypominający zespół opóźnionej fazy snu może wynikać bezpośrednio z patologii w oscylacji molekularnej jądra nadskrzyżowaniowego (SCN), spowodowane przez toksyczne działanie zmutowanego białka huntingtyny. [14,22,24,120]

Zaburzenia snu u pacjentów z chorobą Huntingtona obejmują częste nocne przebudzenia, opóźniony i skrócony REM oraz zwiększone okresowe ruchy kończyn.[75,76]

Z innych doniesień wynikających z pracy Alders i współpracowników, w której badano 10 pacjentów z zaawansowaną chorobą Huntingtona, wyniki nie pozwoliły jednoznacznie wysunąć hipotezy, że istnieje zależność pomiędzy chorobą Huntingtona a zaburzeniami rytmów okołodobowych. Jednakże w tym badaniu oznaczano poziom melatoniny w ślinie u pacjentów z HD. Przebywali oni również jak pacjenci w naszym badaniu w zaciemnionym pomieszczeniu, unikając wysiłku fizycznego. Badanie przeprowadzono jedynie pomiędzy godziną 21.00 a 1.00 w nocy. U jednego pacjenta stwierdzono stężenie melatoniny w ślinie wynoszące 4pg/ml (norma) przed godz. 22.00, u 4 pacjentów pomiędzy 22 a północą , u jednego przed 1.00 w nocy.[1]

W naszych badaniach u pacjentów z chorobą Huntingtona, w porównaniu do grupy kontrolnej, nie obserwowaliśmy statystycznych różnic amplitudy, fazy i MESOR w oznaczonym we krwi poziomie melatoniny. Natomiast podobnie jak w pracy Aziz Ahmad i współpracownicy, stwierdziliśmy opóźniony początek wydzielania melatoniny.

U pacjentów z początkową chorobą Huntingtona zaobserwowaliśmy, że okołodobowy rytm melatoniny był prawidłowy lub nieznacznie zaburzony z fazą przypadającą u jednego z pacjentów o godzinie 2.00 a u dwóch chorych o godzinie 4.00. Natomiast u pacjentów ze średniozaawansowaną i zaawansowaną chorobą zaobserwowaliśmy u jednego z chorych opóźniony początek dziennego wydzielania melatoniny, a u 4 chorych przyspieszoną fazę wydzielania melatoniny przypadającą na godzinę 18.00 lub 22.00 oraz 24.00. Porównując średnie stężenie melatoniny u naszych pacjentów z chorobą Huntingtona i grupą kontrolną nie stwierdzono odchyłań istotnych statystycznie. Natomiast stężenie melatoniny w grupie pacjentów z chorobą Huntingtona było zróżnicowane w zależności od stopnia zaawansowania choroby i wieku pacjenta. Wysokie stężenie melatoniny, podobnie jak w grupie kontrolnej, obserwowaliśmy o godzinie 2.00 i 4.00. Jednakże w przeciwieństwie do grupy kontrolnej o północy odnotowaliśmy najwyższe stężenie melatoniny wynoszące 82,04. O godzinie 2.00 w nocy średnie stężenie melatoniny u pacjentów z chorobą Huntingtona wyniosło 77,21 pg/ml a w grupie kontrolnej 85,3 pg/ml. Prawidłowe stężenie melatoniny pomiędzy 2.00 a 3.00 w nocy powinno wynosić 80-150 pg/ml, tak więc u pacjentów z chorobą Huntingtona obserwowaliśmy spadek stężenia melatoniny. O godzinie 4.00 średnie stężenie melatoniny u pacjentów z chorobą Huntingtona wyniosło 73,34 pg/ml, a w grupie kontrolnej 95,29 pg/ml, zatem u pacjentów z chorobą Huntingtona i tym razem zaobserwowaliśmy spadek stężenia melatoniny. Natomiast u pacjentów w grupie kontrolnej o godzinie 22.00 średnie stężenie melatoniny było niskie i wynosiło 16,1 pg/ml podczas gdy u pacjentów z chorobą Huntingtona zaobserwowaliśmy stężenie 68,60 pg/ml. U naszych pacjentów wystąpiły zakłócenia wydzielania melatoniny polegające na przesunięciu fazy melatoniny.

W innych chorobach neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimera i Parkinsona zaobserwowano również zaburzenia rytmów okołodobowych. Istnieje coraz więcej dowodów, że układy regulujące rytmy okołodobowe wpływają na patologię AD i PD. [37,38]

Coogan i współpracownicy stwierdzili podwyższony poziom kortyzolu zarówno rano jak i wieczorem u osób z łagodną i umiarkowaną chorobą Alzheimera. Natomiast spadek stężenia melatoniny wystąpił już w fazie przedklinicznej choroby Alzheimera, co wynika z zaburzeń biosyntezy melatoniny. [31,101]

W najnowszym badaniu rytmów biologicznych przeprowadzonych w roku 2014 Videnovic i współpracownicy ocenili dobowe wydzielanie melatoniny u pacjentów z chorobą Parkinsona z nadmierną sennością w ciągu dnia oraz bez zaburzeń snu. U pacjentów bez dziennej senności nie obserwowano statystycznych różnic dobowego wydzielania melatoniny

w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast pacjenci z chorobą Parkinsona i nadmierną sennością w ciągu dnia mieli istotną statystycznie obniżoną amplitudę stężenia melatoniny. Stwierdzono, że u podstaw nadmiernej senności w ciągu dnia pacjentów z chorobą Parkinsona może być obniżony poziom melatoniny.[114] W literaturze dostępne są także doniesienia o niskim poziomie melatoniny w przebiegu depresji. Wahlund w swojej pracy udowodnił, że melatonina może być używana jako marker w depresji.[46,116]

W chorobie Huntingtona zmniejszający się poziom melatoniny może przyczyniać się do stopniowej neurodegeneracji, dlatego też suplementacja melatoniny może być korzystna w tej chorobie jak i również w innych chorobach neurodegeneracyjnych.

Działanie nasenne melatoniny opisywane jest już od lat sześćdziesiątych dwudziestego wieku, Wpływa ona na subiektywną ocenę jakości snu, skraca czas zasypiania i zwiększa efektywność snu, a istotna dla jej działania jest mała toksyczność.[97] U podstaw zaburzeń neurodegeneracyjnych leży stres oksydacyjny oraz dysfunkcja mitochondriów, również u osób starszych obserwujemy stopniowy spadek stężenia melatoniny w surowicy krwi. Zasadnym może być podawanie melatoniny doustnie w dawkach 3-9mg na dobę.[26, 44,92]

W swej pracy Srinivasan i współpracownicy podawali grupie 10 pacjentów w starszym wieku, z bezsennością pierwotną wynikającą z otępienia i depresji, przez 21 dni 3mg melatoniny doustnie. Innej grupie pacjentów z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi oraz z chorobą Alzheimera przez 4 miesiące podawano 6mg melatoniny. Wykazano, że podawanie 3 mg melatoniny przed snem zmniejsza zaburzenia snu. Natomiast długotrwałe podawanie pacjentom z chorobą Alzheimera melatoniny w dawce 6-9mg na dobę poprawiło również jakość snu. Wysłunięto wniosek, że podawanie melatoniny również poprawia funkcje poznawcze u chorych z AD.

Przewlekły stres i depresja występujące u pacjentów z chorobą Huntingtona mogą się przyczyniać do aktywacji osi HPA, co mierzone jest stężeniem kortyzolu w osoczu. Nieprawidłowa aktywność osi HPA odgrywa rolę w zaburzeniach lękowych, depresyjnych, a związek ten został dobrze poznany. Zmniejszający się poziom melatoniny może przyczyniać się do stopniowej neurodegeneracji w chorobie Huntingtona stąd suplementacja melatoniny może być również korzystna u osób z HD. [17,82,99,111]

W badaniu przeprowadzonym przez Aziz Ahmad i współpracowników wysunięto tezę, że zaburzenia osi podwzgórze-przysadka nadnercza (HPA) może przyczyniać się do dynamiki wydzielania kortyzolu u pacjentów z chorobą Huntingtona, co z kolei może



spowodować wiele z objawów występujących w tej chorobie. Celem tej pracy było przeprowadzenie szczegółowej analizy osi HPA u chorych na HD w stosunku do nasilonych objawów klinicznych. W omawianym badaniu brało udział ośmiu chorych we wczesnym etapie choroby badawczym oraz grupa osób zdrowych. Mierzono poziom kortyzolu w surowicy krwi co 10 minut i oceniano szybkość wydzielania oraz dobowe zmiany poziomu tego hormonu. Stwierdzono, że szybkość wydzielania kortyzolu i amplituda profilu dobowego kortyzolu była znacznie wyższa u pacjentów HD w porównaniu z kontrolą. Stężenia kortyzolu u pacjentów były zwiększone szczególnie rano i wczesnym popołudniem. Wysznięto wnioski, że dysfunkcja osi HPA jest wczesną cechą HD i może przyczynić się do niektórych objawów choroby.[13,65] Również Hartmann i współpracownicy w swojej pracy wykazuje aktywację osi HPA, u pacjentów z chorobą Parkinsona jak i chorobą Alzheimera. Przebadano 12 chorych z AD, 12 z PD oraz 10 osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną. Oceniano stężenie kortyzolu w surowicy krwi w cyklu 24 godzinnym, pobierając krew do badania co 15minut. Stwierdzono wyższe całkowite stężenie kortyzolu zarówno u pacjentów z AD o 56% jak i również u chorych z PD o 52%. [46]

Stres związany jest z aktywacją autonomicznego układu nerwowego oraz osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej (PPN), co powoduje wzrost wydzielania katecholamin i glikokortykoidów. Istotną rolę odgrywają glikokortykoidy, które zwrotnie hamują aktywność osi PPN.

Stres psychogeny może powodować zmiany w wydzielaniu neuroprzekaźników w OUN. Przyczynia się również do zaburzeń w układzie hormonalnym oraz wpływa na czynność układu immunologicznego, co może doprowadzić do zaburzeń wegetatywnych, nerwicowych oraz chorób psychosomatycznych. Natomiast stres biologiczny prowadzi do aktywacji autonomicznego układu nerwowego. Pobudzenie układu współczulnego powoduje wystąpienie tachykardii, tachypnoe oraz odpływu krwi ze skóry do mięśni szkieletowych. Skutki aktywacji osi HPA mogą wystąpić po kilku godzinach i utrzymywać się nawet do kilku dni.

W naszych badaniach poziomu kortyzolu we krwi u pacjentów z chorobą Huntingtona, podobnie jak w pracy Aziz Ahmad i współpracowników, stwierdziliśmy statystycznie istotne odchylenie fazy kortyzolu ( $p < 0,05$ ) w porównaniu z grupą kontrolną. Amplituda dobowego profilu kortyzolu była znacznie wyższa u pacjentów z HD w porównaniu z kontrolą. Ponadto stężenie kortyzolu w grupie pacjentów z chorobą Huntingtona było zróżnicowane w zależności od stopnia zaawansowania choroby i wieku pacjenta. Najwyższe stężenie

kortyzolu, podobnie jak w grupie kontrolnej, obserwowaliśmy o godzinie 6.00 lub 10.00. Wysoki poziom kortyzolu obserwowaliśmy również w momencie rozpoczęcia badania czyli o godz. 16.00. O godzinie 6.00 średnie stężenie kortyzolu u pacjentów z chorobą Huntingtona było ponad dwukrotnie wyższe niż w grupie kontrolnej i wynosiło 198,61 ng/ml, natomiast w grupie kontrolnej wyniosło 69,5 ng/ml. Prawidłowe stężenie kortyzolu stwierdzono pomiędzy 6.00 a 8.00 i wahało się w granicach 150-250 ng/ml, natomiast do spadku dochodzi pomiędzy 23.00 a 4.00. U badanych przez nas pacjentów z chorobą Huntingtona w tych godzinach obserwowaliśmy nadal podwyższony poziom kortyzolu. O godzinie 2.00 średnie stężenie kortyzolu u pacjentów z HD wynosiło 97,93 ng/ml, a w grupie kontrolnej 38,4 ng/ml, natomiast o godzinie 4.00 średnie stężenie kortyzolu u pacjentów z płasawicą Huntingtona wyniosło nawet 120,53 ng/ml, podczas gdy w grupie kontrolnej było niższe i wyniosło 58,1 ng/ml.

Drugą grupą badanych przez nas pacjentów byli chorzy z udarem niedokrwiennym mózgu. Pojawiły się jak dotychczas prace, w których opisywane są zaburzenia rytmu okołodobowego pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu spowodowane zarówno zmianami wydzielania melatoniny jak i kortyzolu. [72]

Fiorina i współpracownicy przeprowadzili badanie u pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu, w którym oceniano dzienne i nocne stężenie melatoniny w moczu, które porównano ze stężeniem kortyzolu w surowicy krwi. Do badania zakwalifikowano 13 pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu porównując wyniki z pięcioma zdrowymi osobami. Stężenie melatoniny wydzielanej w nocy u pacjentów z udarem niedokrwiennym, zarówno w fazie ostrej (3dni) jak i przewlekłej (dwa tygodnie od wystąpienia udaru), okazało się obniżone wynosząc 560,01 ng/ml, natomiast w grupie kontrolnej było prawidłowe i wynosiło 3063,0 ng/ml. Stwierdzono istotne statystycznie obniżenia stężenia „nocnej” melatoniny, natomiast nie stwierdzono różnic w stężeniu melatoniny w moczu pomiędzy grupą kontrolną a chorymi w odniesieniu do wydalania dobowego. Obserwowano podobnie jak w naszym badaniu podwyższone stężenie kortyzolu w surowicy krwi u pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu, co może tłumaczyć również zaburzenia snu, nastroju w tej grupie chorych.

Natomiast w badaniach przeprowadzonych przez Meng He i współpracowników, zaobserwowano zaburzenia wydzielania rytmu około dobowego melatoniny, podczas wystąpienia udaru niedokrwiennego mózgu. U szczurów wywoływano udar niedokrwienny

mózgu poprzez zamknięcie tętnicy środkowej mózgu. Nie stwierdzono jednak korelacji pomiędzy wielkością obszaru niedokrwienia a amplitudą przesunięcia fazowego melatoniny, natomiast wysunięto wniosek, iż udar niedokrwienny mózgu wywołuje zaburzenia regulacji układu podwzgórzowo- przysadkowo-nadnerczowego obserwowane również w naszym badaniu. [27, 60, 72,81,123]

Jak opisali Gupta i współpracownicy mózg jest pozbawiony mechanizmów obronnych i reakcji oksydacyjnych, zatem jest w większym stopniu narażony na uszkodzenia, w których pośredniczą reaktywne formy tlenu (ROS). Istnieje coraz więcej dowodów, że stres oksydacyjny prowadzi do neurodegeneracji. Naukowcy wysunęli hipotezę, według której proces starzenia jest wynikiem niewydolności szyszynki, powodująca niedobór melatoniny i związane z nim obniżenie stosunku melatonina/serotonina. Jedną z najnowszych teorii, mówi o istotnej roli melatoniny w procesach antyoksydacyjnych. Uszkodzenia spowodowane przez wolne rodniki prowadzą do śmierci komórki i są jedną z istotnych przyczyn procesu starzenia. Melatonina jest jednym z najsilniej działających zmiataczy wolnych rodników a stopniowe zmniejszanie się jej stężenia może to być powodem zarówno starzenia jak i powstawania chorób, w których wolne rodniki odgrywają znaczącą rolę, takich jak nowotwory, choroba Alzheimera, Parkinsona.

Niedobór melatoniny związany ze stopniowym obniżaniem się jej poziomu z wiekiem powoduje zwiększoną wrażliwość mózgu na uszkodzenia przez wolne rodniki.

W udarze niedokrwiennym mózgu, trzeciej co do wielkości przyczynie zgonów oraz najczęstszej przyczynie niepełnosprawności osób dorosłych, na skutek reperfuzji naczyń dochodzi do wytwarzania wolnych rodników co może leżeć u podstaw opóźnionej śmierci neuronów. W badaniu Pei Z. i współpracowników przeprowadzonym na dorosłych samcach szczurów, podczas udaru niedokrwiennego mózgu wywołanego zwężeniem tętnicy środkowej mózgu, podawano dootrzewnowo melatoninę w dawce jednorazowej 5mg/kg.mc lub w wielokrotnych dawkach w chwili wystąpienia udaru, po godzinie oraz trzy godziny od wystąpienia objawów. Wysunięto wnioski iż podanie pojedynczej dawki melatoniny lub jej wielu wstrzyknięć powoduje zmniejszenie obszaru niedokrwionego, gdy podawanie rozpoczniemy w ciągu 2 godzin od wystąpienia tego niedokrwienia co może być dowodem na antyoksydacyjne działanie melatoniny. [55, 81]

W naszych badaniach u pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu obserwowaliśmy statystycznie istotne zwiększenie stężenie melatoniny jak i kortyzolu ( $p < 0,05$ ) w porównaniu z grupą kontrolną, którą stanowili zdrowi studenci.

Stężenie melatoniny w grupie pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu było zróżnicowane, podobnie jak wykazał w swoim badaniu Meng He z zespołem i nie zależało od rozległości ogniska niedokrwiennego.[72] Najwyższe stężenie melatoniny podobnie jak w grupie kontrolnej, obserwowaliśmy o godzinie 4 rano i wynosiło u pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu 22,5 pg/ml podczas gdy w grupie kontrolnej 85,3 pg/ml. Prawidłowe stężenie melatoniny pomiędzy 2.00 a 3.00 w nocy powinno wynosić 80-150 pg/ml. Natomiast u pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu obserwowaliśmy spadek stężenia melatoniny. Ponadto wyższe wartości melatoniny u pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu obserwowaliśmy również o godzinie 22.00 i 6.00. Średnie stężenie melatoniny u pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu o godzinie 22.00 wyniosło 23,5 pg/ml a godzinie 6.00 -16,6 pg/ml . Natomiast w grupie kontrolnej o godzinie 22.00 wyniosło 16,1 pg/ml a o godzinie 6.00 rano -76,0 pg/ml, zatem u pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu obserwowaliśmy spadek stężenia melatoniny.

U pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu obserwowaliśmy również istotną statystycznie różnicę w stężeniu kortyzolu w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych. Najwyższe stężenie kortyzolu u pacjentów, podobnie jak w grupie kontrolnej obserwowaliśmy o godzinie 6.00 i 10.00. Wysoki poziom kortyzolu obserwowaliśmy również w momencie rozpoczęcia badania czyli o godz. 16.00 . Natomiast o godzinie 6.00 średnie stężenie kortyzolu u pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu było ponad czterokrotnie wyższe niż w grupie kontrolnej i wynosiło 335,55 ng/ml, podczas gdy w grupie kontrolnej wyniosło 69,5 ng/ml. O godzinie 10.00 średnie stężenie kortyzolu u pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu było prawie dwukrotnie wyższe niż w grupie kontrolnej i wyniosło 255,5 ng/ml, natomiast w grupie kontrolnej wyniosło 180,2 ng/ml. Prawidłowe stężenie kortyzolu pomiędzy 6.00 a 8.00 waha się pomiędzy 150-250 ng/ml, a do spadku dochodzi pomiędzy 23.00 a 4.00. Natomiast u pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu w tych godzinach obserwowaliśmy nadal podwyższony poziom kortyzolu. O godzinie 2.00 średnie stężenie kortyzolu u pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu było 154,6 ng/ml a w grupie kontrolnej 38,4 ng/ml. Natomiast o godzinie 4.00 średnie stężenie kortyzolu u pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu wynosiło 154,6 ng/ml, w grupie kontrolnej było niższe i wyniosło zaledwie 58,1 ng/ml.

W przeprowadzonym przez nas badaniu zarówno u osób z chorobą Huntingtona jak i z udarem niedokrwiennym mózgu ocenialiśmy również aktywność ruchową na podstawie rejestracji zapisu aparatu Actiwatch firmy Cambridge.

Morton i współpracownicy w swoich badaniach, na podstawie modelu transgenicznej myszy R6/2 z HD, wykazali zakłócenia rytmu około dobowego. U myszy obserwowano zwiększoną aktywność w ciągu dnia zamiast w nocy, związaną ze zmniejszeniem ekspresji SCN. [48,64, 75,76, 112]

Natomiast w innych badaniach Morton i wsp. u 8 pacjentów z chorobą Huntingtona przebywających w warunkach domowych za pomocą Actiwatch firmy Cambridge oceniano aktywność ruchową i nie wykazało istotnych różnic w ciągu dnia w porównaniu do grupy kontrolnej, natomiast wykazały zwiększoną aktywność pacjentów z chorobą Huntingtona w nocy, która nie była wywołana tylko poprzez ruchy płasawice. [75,76]

W naszych badaniach podobnie jak w badaniu Morton wykazaliśmy zwiększoną aktywność pacjentów z chorobą Huntingtona w nocy, która nie była wywołana przez ruchy mimowolne.

Z kolei tak samo jak inni autorzy w swoich pracach wykazaliśmy, że stężenie melatoniny u badanych przez nas pacjentów z chorobą Huntingtona nie było istotnie statystycznie niższe w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast faza melatoniny jest przesunięta w zależności od stopnia zaawansowania choroby. U naszych chorych obserwowaliśmy przesunięcie fazy na godzinę 6 rano lub 22 i 24 w nocy.

U badanych pacjentów z chorobą Huntingtona oraz udarem niedokrwiennym mózgu wykazaliśmy, że stężenie kortyzolu jest istotnie statystycznie wyższe w porównaniu z grupą kontrolną. U chorych z udarem niedokrwiennym mózgu stężenie melatoniny jest wyraźnie niższe w porównaniu z grupą kontrolną, co potwierdzone zostało również przez innych autorów.

Należy podkreślić, że w cytowanych doniesieniach innych autorów nie zbadano jednocześnie rytmu okołodobowego melatoniny i kortyzolu u pacjentów z chorobą Huntingtona. W badaniach innych autorów uczestniczyła również mała grupa z HD licząca najwyżej 9 osób.

Nie zbadano jednocześnie jak w naszym badaniu w warunkach szpitalnych pacjentów cierpiących na chorobę Huntingtona oraz chorych z udarem niedokrwiennym mózgu.

W większości badań poziom melatoniny oznaczany był w ślinie i moczu, co nie jest tak dokładnym badaniem jak oznaczenie w surowicy krwi.

Melatonina ze względu na swoje działanie antyoksydacyjne, neuroprotektoryjne może wspomóc leczenie zaburzenia snu u pacjentów z HD, z kolei podana w ciągu dwóch godzin od wystąpienia udaru niedokrwiennego zmniejsza obszar niedokrwienia.

## 7. Wnioski

1. Zakłócenie działania SCN u pacjentów z chorobą Huntingtona może wpływać na nieprawidłowe wydzielanie melatoniny. Nie wykazaliśmy istotnie statystycznie niższego stężenia melatoniny w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast faza melatoniny jest przesunięta w zależności od stopnia zaawansowania choroby.
2. Zaburzenia endokrynologiczne układu podwzgórze-przysadka-nadnercza mogą wpływać na zmiany w wydzielaniu kortyzolu u chorych z HD. Stężenie kortyzolu u pacjentów z chorobą Huntingtona jest istotnie statystycznie wyższe w porównaniu z grupą kontrolną.
3. U pacjentów z chorobą Huntingtona wykazano zwiększoną aktywność ruchową w nocy, która nie była wywołana przez ruchy płasawicze.
4. U pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu zaburzenia rytmów okołodobowych mogą być związane z nieprawidłowym wydzielaniem melatoniny i kortyzolu. Wykazaliśmy istotnie statystycznie niższe stężenie melatoniny u chorych z udarem w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast stężenie kortyzolu u tych pacjentów jest istotnie statystycznie wyższe w porównaniu z grupą kontrolną.

## 8. Streszczenie

Podczas badań prowadzonych na mysim modelu (myszy R6/2) choroby Huntingtona wykazano, że występują zaburzenia ekspresji genów w obrębie głównego synchronizatora rytmów okołodobowych zlokalizowanego w jądrze nadskrzyżowaniowym (SCN) w mózgu. Potwierdzeniem tych obserwacji było wykrycie zaników w obrębie podwzgórza u pacjentów z wczesnoobjawową HD, prowadzącego do zaburzeń cyklu sen-czuwanie.

Melatonina uczestniczy w kontrolowaniu większości rytmów biologicznych człowieka, także tych związanych z procesem starzenia, chorobami psychicznymi i psychosomatycznymi. Wykazano, że sterydy produkowane w nadnerczach są hormonami odpowiedzialnymi za regulację funkcjonowania układu immunologicznego organizmu. Zmiany endokrynologiczne u pacjentów z HD między innymi podwyższony poziom kortyzolu, mogą powodować zaburzenia funkcjonowania osi podwzgórze-przysadka-nadnercza. Niektóre słabo poznane zjawiska w przebiegu HD mogą być wywołane przez zaburzenia endokrynologiczne i postępujący proces neurodegeneracyjny. Pozostaje do ustalenia czy u pacjentów z HD występuje uszkodzenie neuronów SCN, które prowadzi do zaburzeń rozrusznika rytmów okołodobowych.

**Materiał i metody:** Po wykonaniu rutynowych badań laboratoryjnych i klinicznych przebadano 8 pacjentów z mutacją w obrębie genu IT-15 w różnym stopniu zaawansowania choroby Huntingtona oraz 8 pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu w cyklu 18-godzinnym. Pacjenci przebywali w odizolowanym pomieszczeniu, w pozycji półleżącej i w całkowitym zaciemnieniu od godziny 18.00 do 6.00 kolejnego dnia. Próbkę krwi do analizy stężenia melatoniny i kortyzolu pobierano w godzinach 16.00, 18.00, 22.00, 24.00, 2.00, 4.00, 6.00, 10.00. Stężenie melatoniny i kortyzolu zostało oznaczone przy pomocy metody ELISA firmy IBL Hamburg. Podczas analizy rytmu określone zostały acrophase i bathyphase. Aktywność ruchową oraz nasilenie typowych dla HD ruchów mimowolnych monitorowano przez okres 18 godzin za pomocą Actiwatch Cambridge.

**Wyniki:** U pacjentów z HD zaobserwowano zaburzenia rytmu okołodobowego kortyzolu oraz przesunięcie fazy melatoniny, a u pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu zaburzenia zarówno wydzielania melatoniny i kortyzolu.



## 9. Summary

Marked disruption of expression of the circadian clock genes in the suprachiasmatic nuclei (SCN), the principal circadian pacemaker in the hypothalamus, has been shown in a transgenic model of Huntington's disease (R6/2 mice). Recently significant neurodegeneration in the hypothalamus of early HD patients has also been observed, leading finally to disintegration of sleep-wake cycle and circadian timing.

Melatonin participates in the control of the several biological rhythms including those associated with aging and affective and psychosomatic diseases. Importantly, adrenal corticosteroids were in the first hormonal factors considered to be regulators of the diurnal rhythm of the immune system. Endocrine changes in HD patients, including increased cortisol levels, may be due to alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Interestingly, some poorly understood components in HD may as well be due to neuroendocrine disturbances and progressive neurodegeneration. It remains to be determined whether HD patient, with progression of the disease, have disrupted function within the SCN that in turn may lead to disturbances of other SCN-dependent physiological rhythms.

**Material and methods:** after routine clinical and laboratory examination , 8 patients with IT-15 gene mutation, divided into early, mid-and advanced stages of HD and 8 patients with ischemic stroke, were examined in constant routine condition for 18 hours. During the evening and at night from 18.00-6.00 they were lying in supine positions in complete darkness. Blood samples for analysis both melatonin and cortisol were taken at: 16.00, 18.00, 22.00, 24.00, 2.00, 4.00, 6.00, 10.00. Serum melatonin concentration was analyzed using Melatonin Elisa Kit and cortisol serum concentration by Cortisol Elisa Kit (IBL Hamburg). For the rhythms analysis peak, acrophase and bathyphase were determined. Locomotor activity and typical motor deficit in HD such as inability to inhibit spontaneous movement was monitored 18 hour by the means of Actiwatch Cambridge UK.

**Results:** we observed changes mainly endogenous circadian rhythm of cortisol and melatonin phase shift in in patients with HD and changes mainly endogenous circadian rhythm of melatonin and cortisol in patients with ischemic stroke.

## 10. Piśmiennictwo

1. ALDERS J., SMITS M., KREMER B., NAARDING P. The role of melatonin in sleep disturbances in end-stages Huntington's disease. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 2009; 21: 226-227
2. ANDERSON, K. E. & MARDER, K. S. 2001. An overview of psychiatric symptoms in Huntington's disease. *Curr. Psychiatry Rep*, 3, 379-88.
3. ANDREW, S. E., GOLDBERG, Y. P., KREMER, B., TELENUS, H., THEILMANN, J., ADAM, S., STARR, E., SQUITIERI, F., LIN, B., KALCHMAN, M. A. & ET AL. 1993. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet*, 4, 398-403.
4. ANDRYS-WAWRZYŃIAK I., JABŁECKA A. Chronobiologia, chronofarmakologia i ich miejsce w medycynie. *Farmacja Współczesna* 2008; 1: 94-108
5. ANGELI, A., FRAJRIA, R., DOGLIOTTI, L., CROSAZZO, C., RIGOLI, F. & CERESA, F. 1978. Differences between temporal patterns of plasma cortisol and corticosteroid-binding globulin binding capacity throughout the twenty-four hour day and the menstrual cycle. *J Endocrinol. Invest*, 1, 31-8.
6. ARENDT J., BHANJI S., ET AL.: Plasma melatonin levels in anorexia. *Br. J. Psychiatry* 1992; 161: 361-4.
7. ARENDT J., DEACON S.: Treatment of circadian rhythm disorders – melatonin. *Chronobiol. Int.*, 1997; 14: 185-204.
8. ARENDT J, SKENE DJ. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med Rev.* 2005 Feb;9(1):25-39.
9. ARENDT J. Melatonin and human rhythms. *Chronobiol Int.* 2006;23(1-2):21-37
10. ARENDT J. Melatonin: characteristics, concerns, and prospects. *J.Biol. Rhythms.*2005; 20:291–303.
11. AVERY TH, DAHL K, SAVAGE MY, BRENGELMANN GL, LARSEN LH, KENNY MA, EDER DN, VITELLO MV, PRINZ PN; Circadian temperature and cortisol rhythm during a constant routine are phase – delayed in hypersomnic winter depression; *Biol. Psychiatry* 1997, 1; 42(7): 636
12. AYLWARD, E. H., ANDERSON, N. B., BYLSMA, F. W., WAGSTER, M. V., BARTA, P. E., SHERR, M., FEENEY, J., DAVIS, A., ROSENBLATT, A., PEARLSON, G. D. & ROSS, C. A. 1998. Frontal lobe volume in patients with Huntington's disease. *Neurology*, 50, 252-8.
13. AZIZ, N. A., PIJL, H., FROLICH, M., VAN DER GRAAF, A. W., ROELFSEMA, F. & ROOS, R. A. 2009b. Increased hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in Huntington's disease. *J.Clin. Endocrinol. Metab.*, 94, 1223-8.

14. AZIZ N.A, SWAAB DF, PIJL H, ROOS RA. Hypothalamic dysfunction and neuroendocrine and metabolic alterations in Huntington's disease: clinical consequences and therapeutic implications. *Rev. Neurosci.* 2007;18:223–251
15. AZIZ NA, PIJL H, FRÖLICH M, SCHRÖDER-VAN DER ELST JP, VAN DER BENT C, ROELFSEMA F, ROOS RA. Delayed onset of the diurnal melatonin rise in patients with Huntington's disease. *J. Neurol.* 2009 Dec;256(12):1961-5
16. BHAGWAGAR, Z., HAFIZI, S. & COWEN, P. J. 2005. Increased salivary cortisol after waking in depression. *Psychopharmacology*, 182, 54-7.
17. BJORKQVIST, M., PETERSEN, A., BACOS, K., ISAACS, J., NORLEN, P., GIL, J., POPOVIC, N., SUNDLER, F., BATES, G. P., TABRIZI, S. J., BRUNDIN, P. & MULDER, H. 2006. Progressive alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.*, 15, 1713-21.
18. BRANDON S. L., PHYLLIS C. Z. : “Zaburzenia okołodobowe rytmów snu i czuwania”, *Medycyna Praktyczna* 2007, nr 10, 80-85
19. BRANDT J. Cognitive impairments in Huntington's disease: insights into the neuropsychology of striatum. *Elsevier*; 1991, 241–264.
20. BROWN, E. S., VARGHESE, F. P. & MCEWEN, B. S. 2004. Association of depression with medical illness: does cortisol play a role? *Biol Psychiatry*, 55, 1-9.
21. BROWN R.C., LOCKWOOD A.H., SONAWANE B.R.: Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. *Environ.Health.Perspect* 113, 1250-1256 (2005)
22. CAJOCHEM C, JEWETT ME, DIJK DJ. Human circadian melatonin rhythm phase delay during a fixed sleep-wake schedule interspersed with nights of sleep deprivation. *J Pineal Res.* 2003;35:149–157
23. CARDINALI D.P., BRUSCO L.I., ET AL.: Melatonin in sleep disorders and jet-lag. *Neuro. Endocrinol. Lett.*, 2002; 23, 9-13
24. CATTANEO, E., ZUCCATO, C. & TARTARI, M. 2005. Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci*, 6, 919-30.
25. CHATTERJEE, A., ANDERSON, K. E., MOSKOWITZ, C. B., HAUSER, W. A. & MARDER, K. S. 2005. A comparison of self-report and caregiver assessment of depression, apathy, and irritability in Huntington's disease. *J Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, 17, 378-83.
26. CHEN HY, CHEN TY, LEE MY, CHEN ST, HSU YS, KUO YL, CHANG GL, WU TS, LEE EJ. Melatonin decreases neurovascular oxidative/nitrosative damage and protects against early increases in the blood-brain barrier permeability after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Pineal Res.* 2006 ;41, 175-82.
27. CHEUNG RT. The utility of melatonin in reducing cerebral damage resulting from ischemia and reperfusion. *J Pineal Res.* 2003 ;34, 153-60.

28. CLAUSTRAT, B., CHAZOT, G., BRUN, J., JORDAN, D. & SASSOLAS, G. 1984. A chronobiological study of melatonin and cortisol secretion in depressed subjects: plasma melatonin, a biochemical marker in major depression. *Biol Psychiatry*, 19, 1215-28.
29. CONNEALLY, P. M. 1984. Huntington disease: genetics and epidemiology. *Am J Hum Genet*, 36, 506-26.
30. COPINSCHI G<sup>1</sup>, SPIEGEL K, LEPROULT R, VAN CAUTER E Pathophysiology of human circadian rhythms. *Novartis Found Symp*. 2000;227:143-57;
31. COOGAN A. SCHUTOVÁ B., HUSUNG S., FURCZYK K, BAUNE B., KROPP P., HÄBLER F., THOME J. The circadian system in Alzheimer's disease: disturbances, mechanisms, and opportunities. *Biol Psychiatry*. 2013 1;74(5):333-9.
32. CRAUFURD, D., THOMPSON, J. C. & SNOWDEN, J. S. 2001. Behavioral changes in Huntington Disease. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol*, 14, 219-26.
33. CUPPS, T. R. & FAUCI, A. S. 1982. Corticosteroid-mediated immunoregulation in man. *Immunol Rev*, 65, 133-55.
34. DAVIES S., RAMSDEN D.B.: Huntington's disease. *Mol. Pathol.*, 2001;
35. DIFIGLIA, M., SAPP, E., CHASE, K. O., DAVIES, S. W., BATES, G. P., VONSATTEL, J. P. & ARONIN, N. 1997. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*, 277, 1990-3.
36. DORN, L. D., LUCKE, J. F., LOUCKS, T. L. & BERGA, S. L. 2007. Salivary cortisol reflects serum cortisol: analysis of circadian profiles. *Ann Clin Biochem*, 44, 281-4.
37. FERTL E, AUFF E, DOPPELBAUER A, WALDHAUSER F. Circadian secretion pattern of melatonin in Parkinson's disease. *Journal of neural transmission*. 1991;3, 41-47
38. FERTL E, AUFF E, DOPPELBAUER A, WALDHAUSER F. Circadian secretion pattern of melatonin in de novo parkinsonian patients: evidence for phase-shifting properties of l-dopa. *Journal of neural transmission*. 1993;5, 227-234
39. FIORINA P., G.LATTUADA, C.SILVESTRINI, O.PONARI, DALL'AGLIO. SCAND. J. Disruption of Nocturnal Melatonin Rhythm and Immunological Involvement in Ischaemic Stroke Patients. *Immunol*. 50, 228-231, 1999
40. GALLAGHER, T. F., YOSHIDA, K., ROFFWARG, H. D., FUKUSHIMA, D. K., WEITZMAN, E. D. & HELLMAN, L. 1973. ACTH and cortisol secretory patterns in man. *J Clin Endocrinol Metab*, 36, 1058-68
41. GAWLIK O., NOWAK J. Zaburzenia rytmów biologicznych w depresji . poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych. *Postępy Psychiatrii i Neurologii* 2006.
42. GONZALEZ DE AGUILAR JL, RENE F, DUPUIS L, LOEFFLER JP. Neuroendocrinology of neurodegenerative diseases. Insights from transgenic mouse models. *Neuroendocrinology*. 2003;78:244-252

43. GOUTHIÈRE L., MAUVIEUX B., DAVENNE B., WATERHOUSE J. Complementary methodology in the analysis of rhythmic data, using examples from a complex situation, the rhythmicity of temperature in night shift workers. *Biological Rhythm Research* 2005; 36(3): 177 – 193
44. GUPTA Y.K., MADHUR GUPTA M., KOHLI K. Neuroprotective role of melatonin in oxidative stress vulnerable brain. *Indian J. Physiol Pharmacol* 2003; 47 (4) : 373–386
45. HALBREICH, U., ASNIS, G. M., SHINDLEDECKER, R., ZUMOFF, B. & NATHAN, R. S. 1985. Cortisol secretion in endogenous depression. I. Basal plasma levels. *Arch Gen Psychiatry*, 42, 904-8.
46. HARTMANN A., VELDHUIS J., DEUSCHLE M., STANDHARDT H., HEUSER I. Twenty-Four Hour Cortisol Release Profiles in Patients With Alzheimer's and Parkinson's Disease Compared to Normal Controls: Ultradian Secretory Pulsatility and Diurnal Variation. *Neurobiology of Aging* 1997, 285–289
47. HO, A. K., SAHAKIAN, B. J., BROWN, R. G., BARKER, R. A., HODGES, J. R., ANE, M. N., SNOWDEN, J., THOMPSON, J., ESMONDE, T., GENTRY, R., MOORE, J. W. & BODNER, T. 2003. Profile of cognitive progression in early Huntington's disease. *Neurology*, 61, 1702-6.
48. HOCKLY, E., CORDERY, P. M., WOODMAN, B., MAHAL, A., VAN DELLEN, A., BLAKEMORE, C., LEWIS, C. M., HANNAN, A. J. & BATES, G. P. 2002. Environmental enrichment slows disease progression in R6/2 Huntington's disease mice. *Ann Neurol*, 51, 235-42.
49. HOFMAN M. : „The human circadian clock“, *Chronobiol int.* 2000, 245-259
50. HUCKLEBRIDGE, F., HUSSAIN, T., EVANS, P. & CLOW, A. 2005. The diurnal patterns of the adrenal steroids cortisol and dehydroepiandrosterone (DHEA) in relation to awakening. *Psychoneuroendocrinology*, 30, 51-7.
51. HUGHES AJ, DANIEL SE, KILFORD L, LEES AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1992 Mar;55(3):181–184
52. JURKOWLANIEC E. : “Podstawowe mechanizmy snu i czuwania”, *Sen* 2002, t.2, nr 1, 56-57
53. KARASEK M., STAWERSKA R.: Circadian serum melatonin rhythm in women with hyperprolactinemia. *Neuro. Endocrinol. Lett.*, 2004; 25: 411-4.
54. KARASEK M., PAWLIKOWSKI M.: Circadian variations in plasma melatonin, F.S.H, L.H., prolactin, and testosterone levels in infertile men. *J. Pineal. Res.*, 1990; 9: 149-57
55. KARASEK M.; Znaczenie kliniczne melatoniny, *Postępy Nauk Medycznych* 10/2007, s. 395-398
56. KILIC E, KILIC U, REITER RJ, BASSETTI CL, HERMANN DM Prophylactic use of melatonin protects against focal cerebral ischemia in mice: role of endothelin converting enzyme-1. *J Pineal Res.* 2004 Nov;37(4):247-51.

57. KLAWE J., KLAWE- TAFIL M. : „Fizjologia rytmu snu i czuwania”, *Postępy Medycyny Doświadczalnej*, t.3, nr 52, Warszawa 1999, 497
58. LERMAN EB, Clinical aspects of human circadian rhythms, *J Biol Rhythms*, 2005; 20(4):375-86
59. KLERMAN EB, GERSHENGORN HB, DUFFY JF, KRONAUER RE. Comparisons of the variability of three markers of the human circadian pacemaker. *J Biol Rhythms*. 2002;17:181–193
60. KILIC U<sup>1</sup>, KILIC E, REITER RJ, BASSETTI CL, HERMANN DM Signal transduction pathways involved in melatonin-induced neuroprotection after focal cerebral ischemia in mice. *J Pineal Res*. 2005;38(1):67-71.
61. KORBUT R., WORON J. : „Wpływ starzenia na rytmy biologiczne człowieka-implikacje terapeutyczne”, *Endokrynologia Polska* 2005, t.1, nr 6, 20-22
62. KREMER HP, ROOS RA, DINGJAN G, MARANI E, BOTS GT. Atrophy of the hypothalamic lateral tuberal nucleus in Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1990;49:371–382
63. KREMER HP, ROOS RA, DINGJAN GM, BOTS GT, BRUYN GW, ET AL. The hypothalamic lateral tuberal nucleus and the characteristics of neuronal loss in Huntington's disease. *Neurosci Lett*. 1991;132:101–104
64. LAZIC, S. E., GROTE, H. E., BLAKEMORE, C., HANNAN, A. J., VAN DELLEN, A., PHILLIPS, W. & BARKER, R. A. 2006. Neurogenesis in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease: effects of environmental enrichment. *Eur J Neurosci*, 23, 1829-38.
65. LEBLHUBER F, PEICHL M, NEUBAUER C, REISECKER F, STEINPARZ FX, ET AL. Serum dehydroepiandrosterone and cortisol measurements in Huntington's chorea. *J Neurol Sci*. 1995;132:76–79
66. LEWANDOWSKI H. M. : „Zegar biologiczny u ssaków”, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, t.3, 1999
67. LEWIS P.ROWLAND, TIMOTHY A. PEDLEY : *Neurologia Merritta*, t.II, 2012
68. LEWIS P.ROWLAND, TIMOTHY A. PEDLEY : *Neurologia Merritta*, t.III, 2012
69. LEWY AJ, CUTLER NL, SACK RL. The endogenous melatonin profile as a marker for circadian phase position. *J Biol Rhythms*. 1999;14:227–236.
70. LI, X. J., LI, S. H., SHARP, A. H., NUCIFORA, F. C., JR., SCHILLING, G., LANAHAN, A., WORLEY, P., SNYDER, S. H. & ROSS, C. A. 1995. A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature*, 378, 398-402.
71. LUPIEN, S. J., DE LEON, M., DE SANTI, S., CONVIT, A., TARSHISH, C., NAIR, N. P., THAKUR, M., MCEWEN, B. S., HAUGER, R. L. & MEANEY, M. J. 1998. Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nat Neurosci*, 1, 69-73.

72. MENG HE, LIU T, BORJIGIN J, WANG M Ischemic stroke destabilizes circadian rhythms *Journal of Circadian Rhythms* 2008
73. MILLER, G. E., CHEN, E. & ZHOU, E. S. 2007. If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans. *Psychol Bull*, 133, 25-45.
74. MISHIMA K., TOZAWA T.: Melatonin secretion rhythm disorders in patients with senile dementia of Alzheimer's type with disturbed sleep-waking. *Biol. Psychiatry* 1999; 15: 417-21.
75. MORTON AJ, WOOD NI, HASTINGS MH, HURELBRINK C, BARKER RA, MAYWOOD ES. Disintegration of the sleep-wake cycle and circadian timing in Huntington's disease. *J Neurosci*. 2005 ;25(1):157–163.
76. MORTON J, SKYE R. RUDIGER S, NIGEL I., WOOD N, SAWIAK S, GREGORY C. BROWN G, CLIVE J. MCLAUGHLAN C, TIMOTHY R. KUCHEL T, RUSSELL G. SNELL R, RICHARD L.M. FAULL R, C. SIMON BAWDEN C. Early and progressive circadian abnormalities in Huntington's disease sheep are unmasked by social environment. *Hum. Mol. Genet.* (2014)
77. NOWAK Z. J., ZAWILSKA B. J. : „Melatonina i jej rola w funkcji systemu okołodobowego”, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 1999, 453-456
78. NOWAK Z. J., ZAWILSKA B. J. : „Rytmika okołodobowa i zegar biologiczny ”, *Sen* 2002, t.2, 128
79. NOWAK Z. J., ZAWILSKA B. J. : „Postępy fizjologii”, *Acta Physiologica Polonica*, nr 33, 1995,
80. PAULSEN, J. S., READY, R. E., HAMILTON, J. M., MEGA, M. S. & CUMMINGS, J. L. 2001a. Neuropsychiatric aspects of Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 71, 310-4.
81. PEI Z., SHIU FUN PANG, CHEUNG R. Administration of Melatonin After Onset of Ischemia Reduces the Volume of Cerebral Infarction in a Rat Middle Cerebral Artery Occlusion Stroke Model. *Stroke*. 2003; 34: 770-775
82. PETERSEN A.; BJÓRKQVIST M. Hypothalamic-endocrine aspects in Huntington's disease. *European Journal of Neuroscience* vol.24 2006, 961-967
83. PFLANZ, S., BESSON, J. A., EBMEIER, K. P. & SIMPSON, S. 1991. The clinical manifestation of mental disorder in Huntington's disease: a retrospective case record study of disease progression. *Acta Psychiatr Scand*, 83, 53-60.
84. POKRYSZKO-DRAGAN A., ZAGRAJEK M.M., SŁOTWIŃSKI K.: Taupatie – choroby zwyrodnieniowe ośrodkowego układu nerwowego związane z patologią białka tau. *Postępy. Hig. Med. Dośw.* -2005, 386-391
85. PRACKA D., PRACKI T.: Chronobiologia rytmu sen-czuwanie. *Sen*, 2002, 2, Supl. A, A7-A12.

86. PRACKI T. I WSP.: Znaczenie pomiaru aktywności ruchowej w badaniach nad snem. *Sen*, 2008, 8 (1), 10-14.
87. PREMKUMAR M.; SABLE T; DHANWAL D; DEWAN R Circadian Levels of Serum Melatonin and Cortisol in relation to Changes in Mood, Sleep, and Neurocognitive Performance, Spanning a Year of Residence in Antarctica *J. Neurol.* 2009; 256(12): 1961–1965.
88. RAFF, H., RAFF, J. L., DUTHIE, E. H., WILSON, C. R., SASSE, E. A., RUDMAN, I. & MATTSON, D. 1999. Elevated salivary cortisol in the evening in healthy elderly men and women: correlation with bone mineral density. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 54, 479-83.
89. RANEN, N. G., STINE, O. C., ABBOTT, M. H., SHERR, M., CODORI, A. M., FRANZ, M. L., CHAO, N. I., CHUNG, A. S., PLEASANT, N., CALLAHAN, C. & ET AL. 1995. Anticipation and instability of IT-15 (CAG)<sub>n</sub> repeats in parent-offspring pairs with Huntington disease. *Am J Hum Genet*, 57, 593-602.
90. REITER RJ, TAN DX, LEON J, KILIC U, KILIC E. When melatonin gets on your nerves: its beneficial actions in experimental models of stroke. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005 ;230(2):104-17.
91. REITER RJ, CABRERA J, SAINZ RM, MAYO JC, MANCHESTER LC, TAN DX. Melatonin as a pharmacological agent against neuronal loss in experimental models of Huntington's disease, Alzheimer's disease and parkinsonism. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;890:471-85.
92. REITER RJ, TAN DX, QI W, MANCHESTER LC, KARBOWNIK M, CALVO JR Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol Signals Recept.* 2000 ;9(3-4):160-71.
93. ROOS, R. A. 2010. Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet J Rare Dis*, 5, 40.
94. ROSS, C. A. 2004. Huntington's disease: new paths to pathogenesis. *Cell*, 118, 4-7.
95. ROSS, C. A. & TABRIZI, S. J. 2011. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol*, 10, 83-98.
96. ROSS C.A, POIRIER M.: Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med.*, 2004; 10(Suppl.): S10–S17
97. RUTKOWSKA D, TORLIŃSKA T, Rytmy biologiczne a melatonina, *Nowiny Lekarskie*, 1998, 67(5):600-611
98. SELMAOUI B, TOUITOU Y. Reproducibility of the circadian rhythms of serum cortisol and melatonin in healthy subjects: a study of three different 24-h cycles over six weeks. *Life Sci.* 2003;73(26):3339-49.
99. SHIRBIN CA, CHUA P, CHURCHYARD A, LOWNDES G, HANNAN AJ, PANG TY, CHIU E, STOUT JC Cortisol and depression in pre-diagnosed and early stage Huntington's disease. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(11):2439-47



- 100.** SKENE DJ<sup>1</sup>, DEACON S, ARENDT J. Use of melatonin in circadian rhythm disorders and following phase shifts. *Acta Neurobiol Exp* 1996;56(1):359-62.
- 101.** SLATS D, CLAASSEN JA, VERBEEK MM, OVEREEM S. Reciprocal interactions between sleep, circadian rhythms and Alzheimer's disease: focus on the role of hypocretin and melatonin. *Ageing research reviews*. 2013;12(1):188–200
- 102.** SMITH, M. A., BRANDT, J. & SHADMEHR, R. 2000. Motor disorder in Huntington's disease begins as a dysfunction in error feedback control. *Nature*, 403, 544-9
- 103.** SOKOŁOWSKA D., WENDORFF J. Rola wolnych rodników w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych. *Studia Medyczne* 2009;16; 49-53
- 104.** SOLIVERI, P., MONZA, D., PIACENTINI, S., PARIDI, D., NESPOLO, C., GELLERA, C., MARIOTTI, C., ALBANESE, A. & GIROTTI, F. 2002. Cognitive and psychiatric characterization of patients with Huntington's disease and their at-risk relatives. *Neurol Sci*, 23 Suppl 2, S105-6.
- 105.** SONESON, C., FONTES, M., ZHOU, Y., DENISOV, V., PAULSEN, J. S., KIRIK, D. & PETERSEN, A. 2010. Early changes in the hypothalamic region in prodromal Huntington disease revealed by MRI analysis. *Neurobiol Dis*, 40, 531-43.
- 106.** SRINIVASAN V, PANDI-PERUMAL SR, MAESTRONI GJ, ESQUIFINO AI, HARDELAND R, CARDINALI DP Role of melatonin in neurodegenerative diseases. *Neurotox Res*. 2005;7(4):293-318
- 107.** SRINIVASAN V., PANDI-PERUMAL SR., CARDINALI DB., POEGGELER B., HARDELAND R. Melatonin in Alzheimer's disease and other neurodegenerative Disorders. *Behavioral and Brain Functions* 2006
- 108.** SZWED A., MIŁOWSKA K.: Rola białek w chorobach neurodegeneracyjnych. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*;66: 187-195
- 109.** TROJANOWSKI J.Q., BLENNOW K.: Biological markers of amyloid b-related mechanisms in Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.*, 2010; 223: 334–346
- 110.** UZUN S., KOZUMPLIK O., FOLNEGOVIC-SMALC V.: Alzheimer's dementia: current data review. *Coll. Antropol.* 35, 1333–1337 (2011)
- 111.** VAN DUIJN, E., SELIS, M. A., GILTAY, E. J., ZITMAN, F. G., ROOS, R. A., VAN PELT, H. & VAN DER MAST, R. C. 2010. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning in Huntington's disease mutation carriers compared with mutation-negative first-degree controls. *Brain Res Bull*, 83, 232-7.
- 112.** VAN RAAMSDONK, J. M., PEARSON, J., ROGERS, D. A., BISSADA, N., VOGL, A. W., HAYDEN, M. R. & LEAVITT, B. R. 2005. Loss of wild-type huntingtin influences motor dysfunction and survival in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum Mol Genet*, 14, 1379-92.
- 113.** VAN SOMEREN E, NAGTEGAAL E. Improving melatonin circadian phase estimates. *Sleep Med*.2007;8:590–601.

- 114.** VIDENOVIC A., NOBLE C., REID K, PENG J, TUREK F., MARCONI A , RADEMAKER A, PHD,<sup>4</sup> TANYA SIMUNI T, ZADIKOFF C, PHYLLIS C. Circadian melatonin rhythm and excessive daytime sleepiness in Parkinson's disease. *JAMA Neurol.* 2014; 71(4): 463–469.
- 115.** VOULTSIOS A, KENNAWAY DJ, DAWSON D. Salivary melatonin as a circadian phase marker: validation and comparison to plasma melatonin. *J Biol Rhythms.* 1997;12:457–466
- 116.** WAHLUND B. Melatonin in psychiatric disorders – subtyping affective disorder. *Biological signals and receptors.* 1999 Jan-Apr;8(1–2):120–125.
- 117.** WAMELEN D., N. AZIZ A. ANINK J., STEENHOVEN R., ANGELONI D., FRASCHINI F., JOCKERS R., R., . SWAAB D. Suprachiasmatic Nucleus Neuropeptide Expression in Patients with Huntington's Disease. *Sleep.* 2013; 36(1): 117–125.
- 118.** WAWROCKA A., KRAWCZYNSKI M. Choroby neurodegeneracyjne powodowane przez ekspansję powtórzeń trójnukleotydowych. *Nowiny Lekarskie* 2006, 75, 4, 389–393
- 119.** WETTERBERG L.: Melatonin and clinical application. *Reprod. Nutr. Develop.*, 1999; 39: 367-82
- 120.** WYATT JK, RITZ-DE CECCO A, CZEISLER CA, DIJK DJ; Circadian temperature and melatonin rhythms, sleep, and neurobehavioral function in humans on a 20 – h day; *Am J Physiol*; 1999; 277(4,2): R1152 – 63
- 121.** ZAWILSKA J.B., CZARNECKA K. (2006) Melanopsyna – nowo odkryty chronobiologiczny receptor światła. „*Post. Biologii Komórki*” 33: 229-246.
- 122.** ZISAPEL N.: Melatonin and sleep. *Aktualności Neurologiczne* 2003; 3: 173-80.
- 123.** ZOU LY· CHEUNG RT, LIU S, LI G, HUANG L. Melatonin reduces infarction volume in a photothrombotic stroke model in the wild-type but not cyclooxygenase-1-gene knockout mice. *J Pineal Res.* 2006

## 11. Spis tabel

- Tabela 1.** Test Kruskala-Wallisa dla fazy  $p=0,5734$
- Tabela 2.** Analiza wariancji  $p<0,0500$
- Tabela 3.** Analiza wariancji post hoc  $p=0,000447$
- Tabela 4.** Test Kruskala-Wallisa dla mesor  $p=0,0466$
- Tabela 5.** Test Kruskala-Wallisa dla amplitury  $p=0,3743$
- Tabela 6.** Test Kruskala-Wallisa dla fazy  $p=0,0004$
- Tabela 7.** Test Kruskala-Wallisa dla mesor  $p=0,0180$
- Tabela 8.** Zmiany stężenia melatoniny w surowicy krwi [pg/ml] w grupie kontrolnej
- Tabela 9.** Zmiany stężenia kortyzolu w surowicy krwi [ng/ml] w grupie kontrolnej
- Tabela 10.** Zmiany stężenia melatoniny w surowicy krwi [pg/ml] pacjentów z chorobą Huntingtona
- Tabela 11.** Zmiany stężenia kortyzolu w surowicy krwi [ng/ml] pacjentów z chorobą Huntingtona
- Tabela 12.** Zmiany stężenia melatoniny w surowicy krwi [pg/ml] pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu
- Tabela 13.** Zmiany stężenia kortyzolu w surowicy krwi [ng/ml] pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu

## 12. Spis wykresów

- Wykres 1.** *Uśredniony profil melatoniny u osób zdrowych*
- Wykres 2.** *Uśredniony profil kortyzolu u osób zdrowych*
- Wykres 3.** *Wartości średnie i przedziały ufności dla fazy z podziałem na poszczególne grupy*
- Wykres 4.** *Wartości średnie i przedziały ufności dla amplitudy z podziałem na poszczególne grupy*
- Wykres 5.** *Wartości średnie i przedziały ufności dla MESORa z podziałem na poszczególne grupy*
- Wykres 6.** *Wartości średnie i przedziały ufności dla fazy z podziałem na poszczególne grupy*
- Wykres 7.** *Wartości średnie i przedziały ufności dla MESORa z podziałem na poszczególne grupy*
- Wykres 8.** *Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 1. (W.B)*
- Wykres 9.** *Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 2. (A.D)*
- Wykres 10.** *Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 3. (A.P)*
- Wykres 11.** *Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 4. (N.C)*
- Wykres 12.** *Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 5.(P.T)*
- Wykres 13.** *Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi -osoba nr 6. (I.O)*
- Wykres 14.** *Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 7 (E.K)*
- Wykres 15.** *Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi -osoba nr 8. (An.P)*
- Wykres 16.** *Zmiany stężenia melatoniny w grupie kontrolnej*
- Wykres 17.** *Zmiany stężenia kortyzolu w grupie kontrolnej*
- Wykres 18.** *Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 1. (A.N)*
- Wykres 19.** *Zapis aktywności ruchowej osoba nr 1.(A.N)*
- Wykres 20.** *Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 2. (O.O)*
- Wykres 21.** *Zapis aktywności ruchowej osoba nr 2 (O.O)*
- Wykres 22.** *Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 3. (A.P)*
- Wykres 23.** *Zapis aktywności ruchowej osoba nr 3 (A.P)*
- Wykres 24.** *Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 4. (M.Z)*
- Wykres 25.** *Zapis aktywności ruchowej osoba nr 4.(M.Z)*
- Wykres 26.** *Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 5. (S.B)*
- Wykres 27.** *Zapis aktywności ruchowej osoba nr 5.(S.B)*
- Wykres 28.** *Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 6. (B.W)*
- Wykres 29.** *Zapis aktywności ruchowej osoba nr 6 (B.W)*
- Wykres 30.** *Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 7. (A.M)*
- Wykres 31.** *Zapis aktywności ruchowej osoba nr 7.(A.M)*
- Wykres 32.** *Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 8. (M.W)*
- Wykres 33.** *Zapis aktywności ruchowej osoba nr 8.(M.W)*
- Wykres 34.** *Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 1. (E.B)*

- Wykres 35.**      *Zapis aktywności ruchowej osoba nr 1 (E.B)*
- Wykres 36.**      *Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 2. (A.F)*
- Wykres 37.**      *Zapis aktywności ruchowej osoba nr 2 (A.F)*
- Wykres 38.**      *Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 3. (U.K)*
- Wykres 39.**      *Zapis aktywności ruchowej osoba nr 3 (U.K)*
- Wykres 40.**      *Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 4. (R.K)*
- Wykres 41.**      *Zapis aktywności ruchowej osoba nr 4 (R.K)*
- Wykres 42.**      *Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi  
osoba nr 5. (R.M)*
- Wykres 43.**      *Zapis aktywności ruchowej osoba nr 5 (R.M)*
- Wykres 44.**      *Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 6. (A.Rz)*
- Wykres 45.**      *Zapis aktywności ruchowej osoba nr 6 (A.Rz)*
- Wykres 46.**      *Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 7. (H.W)*
- Wykres 47.**      *Zapis aktywności ruchowej osoba nr 7 (H.W)*
- Wykres 48.**      *Zmiany stężenia melatoniny i kortyzolu w surowicy krwi - osoba nr 8. (T.K)*
- Wykres 49.**      *Zapis aktywności ruchowej osoba nr 8 (T.K)*