

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Lekarski

Krzysztof Styczeń

***“Ocena laboratoryjnych markerów chorób  
afektywnych”***

*„The assessment of laboratory markers of the affective  
disorders”*

*Praca doktorska*

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Dominika Dudek, prof. UJ

Pracę wykonano w Katedrze Psychiatrii UJ CM  
Prof. dr hab. n. med. Bogdan de Barbaro, prof. UJ

Kraków, 2018

## PODZIĘKOWANIA

*Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi, Pani Profesor Dominice Dudek, za umożliwienie mi rozwijania zainteresowań naukowych, klinicznych, opiekę nad projektem badawczym, którego zwięzczeniem jest niniejsza praca doktorska oraz cenne wskazówki w trakcie jej realizacji.*

*Serdeczne podziękowania składam również Koleżankom i Kolegom, Współautorom artykułów wchodzących w skład niniejszej pracy doktorskiej, Pracownikom Instytutu Farmakologii PAN oraz Kliniki Psychiatrii Dorosłych Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie za przyjacielską i owocną współpracę.*

*Dziękuję również Panu Doktorowi Rafałowi Jaeschke oraz Doktorowi Wojciechowi Datce za udzieloną pomoc teoretyczną i merytoryczną, którą otrzymałem realizując swoje zadania naukowe oraz okazaną mi życzliwość i motywowanie mnie do dalszej pracy.*

*Szczególne podziękowania składam mojej Żonie Kindze za wsparcie i cierpliwość okazywane mi podczas mojej działalności naukowej, klinicznej i dydaktycznej.*

# SPIS TREŚCI

1. Wprowadzenie .....	str. 1
1.1. Markery w chorobach afektywnych .....	str. 1
1.2. Etiopatogeneza zaburzeń afektywnych .....	str. 3
1.3. Mikroelementy w fizjologii człowieka .....	str. 4
1.3.1. Cynk .....	str. 5
1.3.2. Stężenie cynku – dane kliniczne .....	str. 6
1.3.3. Miedź .....	str. 7
1.3.4. Stężenia miedzi – dane kliniczne .....	str. 8
2. Hipotezy badawcze .....	str. 10
3. Metodyka badania .....	str. 11
3.1. Projekt badania .....	str. 11
3.2. Pobieranie, przygotowywanie i przechowywanie materiału biologicznego do badań .....	str. 11
3.3. Miejsce prowadzenia badania .....	str. 11
3.4. Grupa badawcza .....	str. 12
3.4.1. Rekrutacja uczestników badania .....	str. 12
3.4.2. Charakterystyka socjodemograficzna i kliniczna uczestników badania .....	str. 15
3.5. Ograniczenia przeprowadzanego badania .....	str. 17
3.6. Narzędzia diagnostyczne .....	str. 17
3.7. Charakterystyka pomiaru stężenia magnezu, miedzi i cynku w surowicy krwi .....	str. 17
4. Metody statystyczne .....	str. 19
5. Podsumowanie wyników .....	str. 20
5.1. Miedź .....	str. 20
5.2. Cynk .....	str. 20
5.3. Porównanie stężenia miedzi i cynku pomiędzy pacjentami z rozpoznaniem choroby afektywnej dwubiegunowej i jednobiegunowej .....	str. 21
6. Wnioski .....	str. 22
7. Piśmiennictwo .....	str. 24
8. Streszczenie – wersja polskojęzyczna .....	str. 33
9. Streszczenie – wersja anglojęzyczna .....	str. 37
10. Publikacje składające się na dysertację .....	str. 40
10.1. <i>Study of the serum copper levels in patients with major depressive disorder</i> .....	str. 40

10.2. <i>The serum zinc concentration as a potential state marker in patients with major depressive disorder</i> .....	str. 47
10.3. <i>Stężenie cynku i miedzi nie różnicuje choroby afektywnej dwubiegunowej i jednobiegunowej</i> .....	str. 56
11. Oświadczenia współautorów .....	str. 65
12. Aneksy .....	str. 72
12.1. Wykaz skrótów .....	str. 72

# 1. WPROWADZENIE

Zaburzenia afektywne (zaburzenia depresyjne nawracające [*major depressive disorder* – MDD] oraz choroba afektywna dwubiegunowa [*bipolar disorder* – BD]) wiążą się z występowaniem u pacjentów znacznego stopnia niepełnosprawności, zmniejszonej produktywności i jakości życia, znacznymi wskaźnikami współchorobowości, zwiększoną umieralnością oraz istotnym klinicznie ryzykiem popełnienia samobójstwa [1–10]. Stanowią one ciągle rosnący i niezmiernie istotny problem kliniczny i ekonomiczny we współczesnym świecie [12–14]. Szacuje się, że rozpowszechnienie BD wynosi 0,4–1,5% i zależy od przyjętych kryteriów diagnostycznych oraz zastosowanych narzędzi diagnostycznych, natomiast MDD ok. 10%, choć niektórzy autorzy podają większe wartości [15]. Przebieg zarówno BD jak i MDD ma charakter chroniczny, epizodyczny i nawracający [15].

## 1.1. Markery w chorobach afektywnych

Od wielu lat celem prowadzonych badań neuropsychiatrycznych jest znalezienie specyficznych i czułych biomarkerów, które mogłyby posłużyć do stworzenia nowej klasyfikacji chorób psychicznych [16]. Poznanie takich czynników umożliwiłoby uporządkowanie etiologii zaburzeń psychicznych, stawianie prawidłowych rozpoznań, ocenę przebiegu danego zaburzenia jak i dostosowanie prowadzonego leczenia [16]. W obecnie dostępnych klasyfikacjach – DSM–5 czy ICD–10 – granice między niektórymi chorobami, np. chorobami afektywnymi, są niejasne głównie z powodu objawowego klasyfikowania tych zaburzeń, co stanowi istotny problem diagnostyczny i kliniczny [16,17]. Pomimo tego, że choroby afektywne są istotnym problemem klinicznym i wiele pracy włożono, aby poznać ich patofizjologię, do tej pory nie zidentyfikowano czułych i specyficznych markerów biologicznych MDD i BD, które ułatwiłyby klinicytom rozpoznawanie tych zaburzeń oraz ocenę skuteczności stosowanej terapii, czy występowania lekooporności. Aby sprostać wyzwaniom związanym ze zwiększającą się częstością występowania chorób afektywnych oraz problemom, które się z tym wiążą, należy zintensyfikować poszukiwanie najbardziej efektywnych sposobów diagnostycznych jak i terapeutycznych. [4,16,18]. Szczególnie istotnym wydaje się znalezienie biomarkerów w BD, ponieważ przebieg tego zaburzenia jest

zmienny, a w początkowym okresie choroby często niejasny [16]. Dlatego też tak ważne wydaje się być prowadzenie badań nad biomarkerami w chorobach afektywnych. [16]. Identyfikacja takich biomarkerów zaburzeń afektywnych mogłaby okazać się istotnym krokiem na drodze do stworzenia bardziej efektywnych narzędzi przesiewowych i diagnostycznych [16,19].

Biomarkery, a w zasadzie markery biologiczne, definiowane są jako obiektywne i powtarzalne parametry biologiczne, które są mierzalną, stałą cechą choroby, występującą niezmiennie, bez względu na to czy jest to ostra faza choroby, czy okres remisji (marker cechy) lub zmieniającą się w zależności od fazy choroby i odzwierciedlającą nasilenie objawów oraz jej mechanizmy (marker stanu) [16,17,19–22]. Biomarkery mogą również być charakterystycznymi parametrami dla fizjologicznych procesów, odpowiedzi na zastosowane leki [16,17,23], czy wystąpienia choroby w przyszłości [17]. Aby uznać dany biomarker za użyteczny w codziennej praktyce klinicznej, powinien on cechować się znacznym poziomem czułości i swoistości (optymalnie powyżej 80%), jego oznaczenia powinny być niedrogie, a pozyskiwanie materiału do analiz mało inwazyjne [21]. Dostępność takich wskaźników biologicznych mogłaby stanowić duże ułatwienie w pracy klinicystów, za sprawą łatwiejszego i trafniejszego monitorowania postępów terapii, określenia ryzyka nawrotu choroby, stopnia odpowiedzi na zastosowane leczenie czy wskazywania ryzyka wystąpienia lekooporności [16,19,21,24].

Za potencjalne biomarkery depresji uważa się hormony osi hormonalnej – podwzgórze–przysadka–nadnercza (*hypothalamic–pituitary–adrenal* – HPA), aldosteron, markery stanu zapalnego takie jak: interleukina 6 (IL–6), czynnik martwiczy guza alfa (*tumor necrosis factor alpha* – TNF $\alpha$ ), prostaglandyna E2, białko ostrej fazy (*C–Reactive Protein* – CRP); a także neopteryna, czy jony metali (Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) [16,17,25]. Potencjalnymi markerami stresu oksydacyjnego w dużej depresji są malondialdehyd (*Malondialdehyde* – MDA), 8–hydrokso–2'–deoksyguanozyna (*8–Hydroxy–2'–deoxyguanosine* – 8–OHdG), izoprostany, dysmutaza ponadtlenkowa (*SuperOxide dismutase* – SOD), peroksydaza glutationowa [17]. W przypadku BD najbardziej obiecującymi markerami stanu zapalnego są TNF $\alpha$ , IL–4 oraz ich rozpuszczalne receptory: czynnika martwiczego nowotworu 1 (*tumor necrosis factor soluble receptor* – TNFsR1) i interleukiny 2 (sIL–2R), CRP, IL–6, czy IL–1 $\beta$  [26].

## 1.2. Etiopatogeneza zaburzeń afektywnych

Dotychczas nie udało się w pełni określić etiologii zaburzeń afektywnych [27]. Obecnie uważa się, że etiologia depresji jest wieloczynnikowa – uwarunkowania biologiczne (w tym genetyczne), psychologiczne jak i społeczne [27–29]. Istnieją dane kliniczne z badań przeprowadzonych na bliźniętach zarówno jedno– jak i dwujajowych, czy rodzinach obciążonych występowaniem MDD, które wskazują na tło genetyczne zaburzeń depresyjnych [29]. Jednak uważa się, że choroba ta jest głównie związana z czynnikami środowiskowymi, z których jako główny wskazuje się stres [29]. W pracach poświęconych etiologii chorób afektywnych coraz większą uwagę poświęca się procesom neurobiologicznym [16,22,26,28,30], a także psychoneuroendokrynologicznym i psychoimmunologicznym [15]. Uważa się, że przewlekła MDD jest chorobą neuroprogresywną [31] oraz neurodegeneracyjną [30]. Dotychczas wśród potencjalnych przyczyn rozwoju chorób afektywnych wymienia się liczne procesy fizjologiczne i patofizjologiczne, pośród których wymienia się m.in.:

- zmiany w poszczególnych strukturach ośrodkowego układu nerwowego (OUN) – zmniejszona objętość hipokampa [31,32], zmiany w obrębie połączeń ciała migdałowatego z hipokampem [29], zmniejszoną objętość wzgórza (*thalamus*), czy kory czołowej (*frontal cortex*) [29], zmniejszenie gęstości komórkowej w korze przedczołowej [33],
- zmiany w stężeniu czynników neurotropowych – zmniejszenie stężenia neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (*Brain-Derived Neurotrophic Factor* – BDNF) oraz zwiększenie występowania polimorfizmu genu BDNF [33], zmiany w stężeniu innych czynników neurotropowych takich jak: neurotrofina 3 (*neurotrophin 3* – NT-3), neurotrofina 4 (*neurotrophin 4* – NT-4), czy czynnik wzrostu nerwów (*nerve growth factor* – NGF) [27,34,35],
- zmiany w szlakach przekaźnikowych (teorie monoaminowe): serotoninerгіcznym, noradrenergicznym, dopaminergicznym [29], hipoteza GABA–ergiczna (*gamma-aminobutyric acid* – kwas  $\gamma$ -aminomasłowy) [12], hipoteza równowagi adrenergiczno–cholinergicznęj [12], zjawisko adaptacji receptorów  $\beta$ –adrenergicznych na błonie postsynaptycznej (tzw. „ $\beta$ –down regulacja”), zmiany adaptacyjne różnych podtypów receptorów serotoninowych, dopaminowych, cholinergicznęj i GABA–ergicznęj [12],

- zmiany w układzie glutaminergicznym, w szczególności w przewodnictwie za pośrednictwem receptorów kwasu N-metylo-D-asparaginowego (*N-Methyl-D-aspartic acid* – NMDA) oraz ekspresji genów kodujących informację o tych receptorach [36–39], czy powstanie ekscytotoksyczności w wyniku znacznego pobudzenia kanałów jonowych związanych z receptorami glutaminergicznymi [39–41],
- zmiany neuromodulatorów takich jak neuropeptydy, np. neuropeptyd Y, czy prostaglandyny [28],
- wpływ nasilonych stanów emocjonalnych na OUN, które prowadzą do zmian strukturalnych OUN [15],
- zjawisko „rozniecania” (*kindling*) [15],
- procesy zapalne oraz zmiany im towarzyszące [14],
- stres oksydacyjny: zwiększenie peroksydacji lipidów, zmniejszenie aktywności reduktazy glutationowej w korze mózgu i hipokampie, powstawanie zmian w strukturze chromatyny w komórkach zakrętu zębatego (*dentate gyrus*) [31], zwiększenia stężenia stabilnych reaktywnych form tlenu (*reactive oxygen species* – ROS) z zakłóceniem równowagi mechanizmów antyoksydacyjnych [30,42], uszkodzenie przez ROS struktury kwasów tłuszczowych, białek, DNA, a następnie całej komórki [30], indukcja procesów apoptotycznych [41],
- stres nitrozacyjny [15,16,22,26,30,31]: powstawanie reaktywnych form azotu (*reactive nitrogen species* – RNS) z zakłóceniem równowagi mechanizmów antyoksydacyjnych [30], uszkodzenie przez RNS struktury kwasów tłuszczowych, białek, DNA, a następnie całej komórki [30],
- infekcje wirusowe: infekcja wirusem opryszczki (*herpes simplex*) [34,43], wirusem Epstein Barr, czy wirusem Borna [43].

### 1.3. Mikroelementy w fizjologii człowieka

Pierwiastki śladowe pomimo swoich niewielkich stężeń w organizmie pełnią kluczowe role w wielu procesach fizjologicznych niezbędnych dla życia i prawidłowego



rozwoju [44–47]. Zaburzenia ich stężenia lub metabolizmu mogą prowadzić do powstania poważnych zaburzeń metabolicznych, chorób, w tym psychiatrycznych, czy powstania toksyczności [44,45,48]. Wiele enzymów w organizmie ludzkim bezwzględnie wymaga pierwiastków śladowych do utrzymania pełnej funkcjonalności [44]. Zaburzenia metabolizmu pierwiastków śladowych mają również wpływ na funkcjonowanie OUN i neuroprzebieżnictwo [48,49].

### **1.3.1. Cynk**

Cynk w organizmie pełni rolę kofaktora i jest elementem strukturalnym ponad 300 enzymów, izoenzymów i białek nie pełniących enzymatycznych funkcji [18,34,50–55]. Jest on mikroelementem niezbędnym dla wielu enzymów – takich jak np. polimeraza DNA i RNA, fosforylaza nukleotydowa, kwaśna fosfataza, dehydrogenaza alkoholowa, karbopeptydaza, czy anhydraza węglowa oraz wielu innych białek, które są niezbędnym elementem wielu procesów fizjologicznych [55–58]. Wśród najważniejszych procesów fizjologicznych, w których istotną rolę pośrednią lub bezpośrednią pełni cynk wymienia się m.in. wzrost i rozwój organizmu poprzez procesy katalityczne, strukturalne i regulacyjne [57,59], podział komórek [55], aktywacja niektórych hormonów (insuliny, niektórych hormonów płciowych), ochrona przed toksycznym działaniem metali ciężkich, czy regulacja smaku [55,58]. Na poziomie komórkowym cynk pełni niezbędną rolę w takich procesach jak odporność komórkowa i humoralna, metabolizm tłuszczu, naprawa i metabolizm DNA, metabolizm energetyczny komórki, stabilizacja błon komórkowych, reprodukcja, wzrok, funkcje poznawcze [56–64], a także w procesach neurogenezy, synaptogenezy, wzroście neuronów, czy neurotransmisji sygnału [56,59]. Jednak jedną z najistotniejszych ról cynku w organizmie jest aktywny udział tego mikroelementu w procesach antyoksydacyjnych [52,55,61,65], w szczególności w procesach stresu oksydacyjnego [66]. Cynk w zakresie fizjologicznego stężenia chroni zarówno przed procesami stresu oksydacyjnego jak i apoptozy powstałej w ich następstwie [31,65]. Natomiast dysregulacja stężenia jonów cynku prowadzi do nasilenia cytozolowego stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego [66]. Drugim kluczowym pod względem etiopatogenezy zaburzeń afektywnych procesem, w którym cynk pełni istotną rolę, jest funkcjonowanie układu immunologicznego oraz wpływ na procesy stanu zapalnego [34,43,67]. Spośród wszystkich mikroelementów to właśnie cynk jest uważany za jon, który ma największe znaczenie w patofizjologii depresji i lęku [63]. W przypadku niedoboru cynku zaobserwowano u pacjentów liczne objawy psychiatryczne, które są charakterystyczne dla zaburzeń lękowych i afektywnych. Są to m.in.: zaburzenia koncentracji uwagi [68],

zmniejszenie apetytu [18,50], obniżenie libido [18,50], obniżenie i labilność nastroju [18,50,68], drażliwość [18,50], zaburzenia uczenia się [51,53], zaburzenia funkcji poznawczych [18,50,53], dysforia [60,70].

Na poziomie układowym cynk jest elementem niezbędnym do funkcjonowania mózgu. Mózg jest organem, w którym występuje największa pula zgromadzonego cynku [71] oraz jego najwyższe stężenie [40]. Liczne dane wskazują, iż  $Zn^{2+}$  uczestniczy w sposób dynamiczny zarówno w procesach fizjologicznych jak i patofizjologicznych zachodzących w mózgu [66] oraz jest niezbędny dla jego prawidłowego rozwoju [67]. W pośredni sposób cynk wpływa na takie procesy jak modulacja plastyczności, uczenie się i zapamiętywanie, regulacja pobudzenia czy przewodzenie sygnału [67]. Dodatkowo jon ten wpływa też na aktywność takich receptorów jak NMDA, AMPA ( *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* – kwas  $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-isoksazolepropionowy),  $GABA_A$  czy jonotropowych receptorów glicynowych [54], a także bezpośrednio hamuje receptory kinazy syntazy glikogenu 3- $\beta$  (*glycogen synthase kinase 3- $\beta$*  – GSK3- $\beta$ ) [56,72], które są związane z etiologią zaburzeń depresyjnych. Warto zwrócić uwagę, że w strukturach mózgu wyróżniono specjalny rodzaj neuronów zawierających większe stężenia cynku (*zinc containing neurons* – ZCN), w których  $Zn^{2+}$  jest zgromadzony w sposób selektywny w pęcherzykach w dystalnych zakończeniach aksonalnych [51]. Wykazano, że wszystkie ZCNs są neuronami glutaminergicznymi [31,73], natomiast jedynie niektóre neurony glutaminergiczne należą do ZCNs [73]. Fakt ten podkreśla rolę cynku w przewodnictwie glutaminergicznym i współdziałanie cynku w funkcji synaps glutaminergicznych [73]. Uważa się, że cynk może również modulować przewodnictwo serotonergiczne [5,31,74].

W świetle dotychczas opublikowanych danych wydaje się, że modulacja przekazywania glutaminergicznego poprzez receptory NMDA i AMPA, serotonergicznego w szczególności poprzez receptory 5HT1A oraz regulacja stężenia BDNF stanowią najważniejsze elementy działania podobnego do przeciwdepresyjnego jonów cynku [54].

### **1.3.2. Stężenie cynku – dane kliniczne**

Pierwsze doniesienia dotyczące związku niedoboru cynku z zaburzeniami afektywnymi pojawiły się w połowie lat 70-tych [39]. Little i wsp. jako jedni z pierwszych badaczy zwrócili uwagę na możliwość występowania obniżenia stężenia cynku w przebiegu

zaburzeń afektywnych [75]. Wielu autorów w prowadzonych później badaniach zaobserwowało związek obniżenia stężenia cynku w przebiegu MDD, jak również z nasileniem objawów depresyjnych, czy obecnością lekooporności [39,57,65,70,76–78]. Niektóre z badań wykazały, że po włączeniu suplementacji cynkiem [65] lub prowadzenia psychofarmakoterapii [76,77] stężenia osoczowe  $Zn^{2+}$  uległy normalizacji [65]. Co więcej, obniżone stężenie cynku korelowało ze stężeniem markerów stanu zapalnego [57], czy spadkiem stężenia albumin [79,80]. Również suplementacja cynku u pacjentów z MDD prowadziła do wystąpienia pozytywnych efektów w przebiegu leczenia [81,82]. Niektórzy badacze, Maes i wsp. wskazują, że obniżone stężenie cynku jest czułym (w 79%) i specyficznym (w 93%) markerem lekooporności [57,65] oraz stanu zapalnego w przebiegu dużej depresji [65].

W przypadku BD dane nie są jednoznaczne. Epizody maniakalne charakteryzował wzrost stężenia cynku w porównaniu do grupy kontrolnej, jednak nie wykazano istotnych różnic w stężeniu tego pierwiastka u pacjentów z depresją [83]. Wnioski z innych badań nad stężeniem  $Zn^{2+}$  w grupie pacjentów z BD wykazały, że niezależnie od typu BD epizod depresji cechowało obniżenie  $Zn^{2+}$  w surowicy [48]. Dodatkowo w niektórych z przeprowadzonych badań klinicznych nie wykazano związku pomiędzy występowaniem depresji a obniżeniem stężenia cynku [13,45].

Podsumowując powyższe doniesienia kliniczne można stwierdzić, że pomimo niejednoznaczności uzyskiwanych wyników cynk w przebiegu depresji występuje w obniżonych stężeniach, a w wyniku leczenia ulega normalizacji [83].

### **1.3.3. Miedź**

Jony miedzi, podobnie jak jony cynku, pełnią w organizmie ludzkim liczne, istotne funkcje [57,58,84]. Wśród najważniejszych funkcji wymienia się: uczestnictwo w procesach oddychania tlenowego [85], rola kofaktora w licznych reakcjach enzymatycznych [46,55], modulacja metabolizmu katecholamin oraz innych neuroprzekaźników [57,83,86,87], przewodnictwo sygnału w OUN [58], działanie antyoksydacyjne [55,57,83,88,89], synteza różnych hormonów, w tym hormonów tarczycy [55,88,89], uczestnictwo w regulacji funkcji układu odpornościowego [57,83,86,89], oraz wiele innych.

Miedź jest również niezbędnym jonem do funkcjonowania mózgu, choć jej rola jest

mało poznanym zjawiskiem [90]. Wiadomo jednak, że w OUN jony miedzi są potrzebne do podstawowych procesów, takich jak: transmisja sygnału w synapsach, wzrost neuronów, neuroplastyczność, uczenie się i pamięć, modulacja sygnału wywołanego czynnikami wzrostowymi [91]. Dodatkowo mózg jest organem o największym zapotrzebowaniu na energię [85]. Większość tej energii pochodzi z mitochondriów, z procesów oddychania tlenowego, do których jest niezbędna obecność enzymów zawierających jony miedzi jak np. oksydaza cytochromu C [85]. Jony miedzi charakteryzują się również niekompetencyjnym działaniem antagonistycznym względem receptorów NMDA.  $\text{Cu}^{2+}$ , w podobnym stopniu jak jony cynku, hamują wiązanie ligandu – kwasu glutaminowego i glicyny – do kanału jonowego sprzężonego z receptorem NMDA modulując jego działanie [24,85,86,90]. W wyniku uniemożliwienia powiązania się ligandu,  $\text{Cu}^{2+}$  wpływa pośrednio na zablokowanie napływu jonów [85]. Jony miedzi modulują też działanie innych niż NMDA receptorów, np. AMPA/kainowych, kanałów wapniowych typu T i potasowych, GABA, czy receptorów purynowych – P2Y1, P2X4, a także P2X7 [85,89–92].  $\text{Cu}^{2+}$  posiada cechy modulatora allosterycznego receptorów purynowych [91]. Uważa się, że jony miedzi mogą być potencjalnym kompetycyjnym inhibitorem odpowiedzi GABAergicznej, w szczególności w komórkach Purkiniego [65,85]. Dodatkowo jony miedzi zmieniają działanie niektórych czynników neurotroficznych [85,91], np. zmniejszając działanie proliferacyjne BDNF, czy zwiększając proliferację komórek stymulowaną NGF [85].

#### **1.3.4. Stężenie miedzi – dane kliniczne**

Dane dotychczas uzyskane z badań klinicznych dotyczących stężenia miedzi we krwi pozostają niejednoznaczne [24,83] oraz w wielu kwestiach niespójne z badaniami prowadzonymi na modelach zwierzęcych [24]. Jednak wielu badaczy wykazało związek depresji ze zwiększonym stężeniem jonów miedzi w porównaniu do grupy zdrowych ochotników [24,45,65,86,89,93,94]. W przypadku pacjentów z rozpoznaniem BD, różnymi podtypami (I, II i V), w populacji pacjentów maniakałnych w przebiegu BD typu I stężenie miedzi było wyższe niż w grupie kontrolnej, podobnie jak w epizodzie depresji w przebiegu BD typu II i V [48]. Jednak zwiększonego stężenia pierwiastka nie wykazano w grupie pacjentów hipomaniakałnych [48]. Jednak wyniki niektórych badań klinicznych na grupie chorych z depresją jak i BD wykazały, że stężenie miedzi nie różniło się pomiędzy grupą pacjentów z depresją a grupą kontrolną [57,83,95], lub spadkiem stężenia jonu względem

grupy kontrolnej w okresie remisji [95]. Warto podkreślić, że w niektórych badaniach klinicznych zaobserwowano spadek podwyższonego stężenia miedzi w wyniku prowadzonego leczenia przeciwdepresyjnego – citalopramu, imipraminy [57,86,89,94]. Pomimo niespójności otrzymywanych danych niektórzy badacze sugerują, że jony miedzi mogą być markerem cechy MDD [89].

## **2. HIPOTEZY BADAWCZE**

Celem niniejszej pracy była weryfikacja poniższych hipotez badawczych:

- 1.** Czy stężenie surowicze miedzi lub cynku może być markerem stanu u pacjentów z rozpoznaniem MDD?
- 2.** Czy stężenie surowicze cynku lub miedzi może być markerem cechy u pacjentów z rozpoznaniem MDD?
- 3.** Czy stężenie surowicze miedzi lub cynku koreluje ze swoistymi cechami demograficznymi i klinicznymi MDD takimi jak: płeć, wiek, ogólnym czasem trwania choroby, czasem trwania aktualnego epizodu, długością remisji, występowaniem objawów zespołu melancholicznego, zespołu atypowego depresji, objawów psychotycznych, lekooporności, sezonowości zaburzeń, liczbą wszystkich epizodów od momentu zachorowania, liczbą wszystkich hospitalizacji w przebiegu choroby?
- 4.** Czy stężenie miedzi lub cynku może być elementem różnicującym BD od MDD?

## **3. METODYKA BADANIA**

### **3.1. Projekt badania**

Badania przeprowadzono w ramach projektu badawczego De–Me–Ter („Depresja – Mechanizmy – Terapia”), którego celem było określenie zależności między symptomatologią zaburzeń afektywnych a zmianami surowiczych stężeń biopierwiastków, markerów stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego. Projekt De–Me–Ter był realizowany we współpracy pomiędzy Zakładem Zaburzeń Afektywnych Katedry Psychiatrii UJ CM oraz Instytutem Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie. Kwalifikację pacjentów prowadzono w okresie od 21.09.2009 r. do 30.07.2013 r.

W przeprowadzonym badaniu kliniczno–kontrolnym grupę przypadków (*cases*) stanowiły osoby z rozpoznaniem MDD (n=114) lub BD (n=110), a grupę kontrolną (*controls*) – zdrowi ochotnicy (n=50).

Komisja Bioetyczna UJ wyraziła zgodę na przeprowadzenie tego projektu badawczego (decyzja nr KBET/77/B/2009 z dnia 25.06.2009 r.).

### **3.2. Pobieranie, przygotowywanie i przechowywanie materiału biologicznego do badań.**

W przeprowadzonym badaniu od każdego pacjenta i zdrowego ochotnika pobierano maksymalnie 9,8 ml krwi żyłnej z użyciem zamkniętego systemu Monovette. Po powstaniu skrzepu, próbki odwirowywano przez 30 minut z prędkością 1800 RPM. Uzyskaną surowicę przechowywano w temp. –80°C do momentu rozpoczęcia zaplanowanych analiz.

### **3.3. Miejsce prowadzenia badania**

Badanie prowadzono w Klinice Psychiatrii Dorosłych Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie.

### **3.4. Grupa badawcza**

#### **3.4.1. Rekrutacja uczestników badania**

Wśród pacjentów zakwalifikowanych do udziału w badaniu znajdowały się jedynie osoby spełniające jedno z następujących kryterium diagnostycznych:

1. rozpoznanie zaburzenia depresyjnego nawracającego wg DSM–IV–TR (w fazie depresji lub w okresie remisji),
2. rozpoznanie choroby afektywnej dwubiegunowej wg DSM–IV–TR (w fazie depresji lub w okresie remisji)
3. oraz grupa zdrowych ochotników bez stwierdzonej choroby psychicznej.

Wiek zarówno pacjentów włączonych do badania jak i zdrowych ochotników mieścił się w przedziale od 18 do 65 lat. Wszyscy uczestnicy badania wyrazili pisemną świadomą zgodę na udział w tym projekcie naukowym. Każda z osób uzyskała od włączającego do badania lekarza szczegółową informację (w formie ustnej oraz pisemnej) o celach i zasadach prowadzenia badania. W trakcie i po zapoznaniu się z pisemną informacją pacjenci mieli możliwość zadawania pytań, na które uzyskali szczegółowe odpowiedzi. Uczestniczący w badaniu zostali również poinformowani o sposobie szybkiego kontaktu z prowadzącym badanie oraz o możliwości odstąpienia od uczestnictwa w badaniu na każdym z jego etapów, bez podania przyczyny swojej decyzji. Zgoda na przystąpienie do badania uzyskiwana była w formie pisemnej w obecności prowadzącego badanie lekarza. Na formularzu zgody, w dniu jej wyrażenia przez pacjenta, zostały złożone podpisy pacjenta i lekarza. W trakcie przeprowadzonego badania włączono 114 pacjentów z MDD, 110 z BD oraz 50 zdrowych ochotników.

Wśród kryteriów wykluczenia z badania znajdowały się następujące:

1. brak zgody uczestnika na przeprowadzenie badania lub wycofanie zgody w którymkolwiek z etapów badania;
2. zmiana statusu pacjenta na taki, który wiąże się z jego ubezwłasnowolnieniem (np. pozbawienie wolności na podstawie wyroku sądu, postanowienie sądu



o przymusowym leczeniu);

3. rozpoznanie u zakwalifikowanego pacjenta innego niż MDD lub BD poważnego zaburzenia psychicznego (np. schizofrenia, zaburzenie schizoafektywne) lub zaburzeń związanych z nadużywaniem substancji psychoaktywnych (z wyjątkiem uzależnienia od nikotyny lub kofeiny);
4. współwystępowanie lub wystąpienie w trakcie badania u pacjenta poważnych, ostrych lub przewlekłych chorób somatycznych i neurologicznych;
5. występowanie głębokich zaburzeń osobowości; karmienie piersią, obecność lub zajście w ciążę podczas badania.

Do chorób somatycznych wykluczających pacjentów z badania (ze względu na możliwość spowodowania istotnej zmiany stężenia lub aktywności markerów, których pomiary przewidziano w ramach projektu De–Me–Ter) zakwalifikowano:

1. przewlekłe choroby zapalne i autoimmunologiczne;
2. ostre choroby infekcyjne lub zapalne występujące w ciągu miesiąca przed włączeniem do badania;
3. pierwotną niedoczynność kory nadnerczy;
4. niewydolność nerek;
5. przewlekłe zapalenie trzustki;
6. niedoczynność przytarczyc;
7. nadczynność tarczycy;
8. pierwotny hipoadosteronizm;
9. choroby nowotworowe;
10. anemię megaloblastyczną z niedoboru żelaza;
11. talasemię;
12. hemochromatozę;

13. marskość wątroby;
14. chorobę Wilsona;
15. zespół nerczycowy i oparzenia.

Dodatkowym kryterium wykluczającym z badania było przyjmowanie przez pacjenta jednego lub więcej leków wymienionych w tabeli nr 1, które mogły modyfikować badane czynniki.

Tabela 1. Lista leków, których stosowanie było kryterium wykluczającym z uczestnictwa w badaniu.

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ol style="list-style-type: none"><li>1. hydralazyna,</li><li>2. niesterydowe leki przeciwzapalne (kwas acetylosalicylowy, ibuprofen, indometacyna),</li><li>3. tetracyliny,</li><li>4. fluorochinolony,</li><li>5. preparaty wapnia,</li><li>6. preparaty żelaza,</li><li>7. preparaty zawierające jony magnezu, cynku, miedzi,</li><li>8. środki chelatujące</li><li>9. glikokortykosteroidy.</li></ol> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

W trakcie prowadzonego badania rekrutowani pacjenci byli leczeni zgodnie z obecnymi standardami farmakologicznymi dla MDD i BD – w monoterapii lub w terapii łączonej, które były stosowane adekwatnie do obrazu klinicznego choroby. Wśród niektórych pacjentów z rozpoznaniem MDD stosowano również leki stabilizujące nastrój oraz przeciwpsychotyczne. Ich zastosowanie było związane z obecnością objawów psychotycznych lub potencjalizacji leczenia w związku z występującą lekoopornością. Stosowane leki w poszczególnych grupach przedstawiono w tabeli nr 2.

Tabela 2. Leki stosowane w grupie pacjentów z MDD i BD

Leki stosowane w grupie pacjentów z BD	Leki stosowane w grupie pacjentów z MDD
1. selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny ( <i>selective serotonin reuptake inhibitors</i> – SSRI)	1. SSRI
2. selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny ( <i>selective serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors</i> – SNRI)	2. SNRI
3. Mirtazapina	3. trójcykliczne leki przeciwdepresyjne ( <i>tricyclic antidepressants</i> – TCA)
4. Kwetiapina/ Olanzapina	4. Mirtazapina
5. Walproinianiny	5. Atypowe leki przeciwpsychotyczne
6. Lit	6. Lit
7. Lamotrygina	7. Lamotrygina
8. Karbamazepina	

Grupa zdrowych ochotników składała się z 50 osób w wieku 18–65 lat, u których nie występowały żadne poważne i przewlekłe choroby somatyczne; nie rozpoznano w momencie badania, jak i w przeszłości jakichkolwiek zaburzeń i chorób psychicznych; nie występowało uzależnienie od alkoholu ani jakichkolwiek innych substancji psychoaktywnych (oprócz uzależnienia od kofeiny i nikotyny), oraz u których wśród krewnych pierwszego stopnia nie występowały żadne zaburzenia ani choroby psychiczne.

### 3.4.2. Charakterystyka socjodemograficzna i kliniczna uczestników badania

W momencie rekrutacji do badania uzyskano od pacjentów dane demograficzne oraz szczegółowy wywiad lekarski dotyczący zarówno zaburzeń psychicznych, jak i somatycznych

(tabela nr 3). Wszystkie uzyskane dane zostały odpowiednio zakodowane oraz wprowadzone do indywidualnych kart danego pacjenta, a następnie wprowadzone zostały do cyfrowej bazy danych, którą następnie poddano analizie statystycznej.

Tabela 3. Dane demograficzne oraz kliniczne pozyskiwane od pacjentów w trakcie wywiadu.

Dane demograficzne: <ol style="list-style-type: none"><li>1. płeć,</li><li>2. wiek,</li><li>3. miejsce zamieszkania,</li><li>4. poziom wykształcenia,</li><li>5. obecna sytuacja zawodowa,</li><li>6. stan cywilny.</li></ol>
Dane kliniczne: <ol style="list-style-type: none"><li>1. ilość wypalanych papierosów,</li><li>2. spożywanego alkoholu lub innych substancji psychoaktywnych,</li><li>3. dane dotyczące obciążenia rodzinnego zaburzeniami lub chorobami psychicznymi, czy somatycznymi,</li><li>4. ogólny czas trwania choroby,</li><li>5. symptomatologia poszczególnych epizodów choroby:<ol style="list-style-type: none"><li>a. czas trwania aktualnego epizodu,</li><li>b. charakterystyka objawów w aktualnym epizodzie<ol style="list-style-type: none"><li>I. występowanie objawów zespołu melancholicznego,</li><li>II. występowanie objawów zespołu atypowego depresji,</li><li>III. występowanie objawów psychotycznych,</li><li>IV. otrzymywane leczenie,</li><li>V. występowanie lekooporności w aktualnym epizodzie,</li></ol></li><li>c. czas który upłynął od ostatniego epizodu,</li><li>d. czas trwania poprzedniego epizodu,</li></ol></li><li>6. występowanie lekooporności,</li><li>7. sezonowość zaburzeń w przebiegu dotychczasowego leczenia,</li><li>8. liczba wszystkich epizodów od momentu zachorowania,</li><li>9. liczba wszystkich hospitalizacji w przebiegu choroby,</li><li>10. obecność myśli samobójczych i podejmowanych prób samobójczych,</li><li>11. systematyczność leczenia,</li></ol>

- |                                                                                                                                                        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ol style="list-style-type: none"><li>12. związek z ciążą lub okresem poporodowym,</li><li>13. współwystępowanie innych chorób somatycznych.</li></ol> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

### **3.5. Ograniczenia przeprowadzanego badania**

Do ograniczeń prezentowanego badania należą:

- brak modelu prospektywnego badającego dynamikę zmian stężeń poszczególnych mikroelementów u tych samych pacjentów,
- znaczne zróżnicowanie zastosowanego leczenia,
- niemożność oszacowania wpływu leczenia na uzyskane wyniki.

### **3.6. Narzędzia diagnostyczne**

Każdy z rekrutowanych pacjentów oprócz danych demograficznych i danych dotyczących przebiegu choroby został oceniony przez rekrutującego lekarza skalami mierzącymi nasilenie objawów depresyjnych – skalą depresji Montgomery–Asberg (*Montgomery–Asberg Depression Rating Scale – MADRS*) [96], skalą depresji Hamiltona (*Hamilton Rating Scale for Depression – HDRS*) [97], inwentarzem depresji Becka (*Beck Depression Inventory – BDI*) [98] oraz dodatkowo skalą manii Young'a (*Young Mania Rating Scale – YMRS*) [99].

### **3.7. Charakterystyka pomiaru stężenia miedzi i cynku w surowicy krwi.**

Po rozmrożeniu i dokładnym wymieszaniu próbek przeprowadzono analizę ilościową pierwiastków (cynk, miedź) z wykorzystaniem metody płomieniowej atomowej spektrometrii absorpcyjnej (*flame atomic absorption spectrometry – FAAS*). Wybrano ten rodzaj metody oznaczania pierwiastków z powodu jej wysokiej czułości [100] oraz niskich kosztów [37]. W oznaczeniach zastosowano spektrometr firmy Perkin Elmer Model 3110 (USA), płomień acetylen-powietrze (temp. ok. 2300°C, przepływ sprężonego powietrza: 5 l/min, przepływ

acetyleny: 2l/min), oraz lampę katodowo-próżniową HCL firmy Perkin-Elmer. Cynk oznaczano przy długości fali 213,9 nm, a miedź przy 324,8 nm stosując 0,7 mm szerokości szczeliny monochromatora.

Przed rozpoczęciem serii pomiarów, procedura analityczna była optymalizowana (przepływ gazów, pozycja palnika), celem uzyskania wysokiej czułości. Rozcieńczone (1:5) próbki surowicy krwi wprowadzano bezpośrednio do płomienia palnika aparatu. Próbki surowicy rozcieńczano wodą redestylowaną, zaś roztwory wzorcowe przygotowywano w 5% roztworze gliceryny w celu uzyskania lepkości odpowiadającej lepkości próbek badanych. Próbki surowicy rozcieńczano odpowiednio celem dopasowania do liniowego zakresu krzywej kalibracji. Oznaczenie każdej próbki wykonano w trzech powtórzeniach. Dokładność pomiarów określono za pomocą analizy odzysku. Stężenia badanych pierwiastków (cynk, miedź) były odczytywane z krzywej wzorcowej. Dla pomiarów stężeń cynku wynosiła ona dla 94–99%, a dla miedzi 96–103%.

## 4. METODY STATYSTYCZNE

Do analizy różnic w zakresie zmiennych jakościowych wykorzystano test  $\chi^2$ . W celu oceny rozkładu normalnego danych ilościowych zastosowano test Shapiro–Wilka. Ze względu na brak rozkładu normalnego danych ilościowych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Kruskala–Wallisa lub test U Manna–Whitneya. Korelacje pomiędzy zmiennymi ilościowymi – ze względu na brak rozkładu normalnego – analizowane były przy pomocy Korelacji Rang Spearmana. Do przeprowadzenia obliczeń zastosowano licencjonowanego pakietu statystycznego STATISTICA PL.

Wkład doktoranta w realizację niniejszego projektu badawczego objawmował kwalifikację pacjentów do badania i zbieranie danych źródłowych oraz próbek krwi od pacjentów i zdrowych ochotników, selekcję i opracowanie danych źródłowych, opracowanie wyników, analizę piśmiennictwa i opracowanie bibliografii, zredagowanie wstępów, wyników i dyskusji przygotowywanych artykułów, sformułowanie wniosków, adjustację tekstów oraz opracowanie wersji anglojęzycznych artykułów. Wyrażony procentowo wkład doktoranta w przygotowanie poszczególnych artykułów składających się na niniejszą dysertację wyniósł odpowiednio: 53%, 51%, 60%.

## 5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

### 5.1. Miedź

Analiza wariancji nie wykazała istotnego wpływu epizodu choroby (MDD) lub przynależności do grupy zdrowych ochotników na rejestrowane stężenie miedzi (test U Manna–Whitneya,  $p > 0,05$ ). Średnie stężenie miedzi w surowicy pacjentów w fazie depresyjnej, było niższe od stężenia tego pierwiastka rejestrowanego w grupie kontrolnej, jednak nie była to różnica istotna statystycznie ( $p > 0,05$ ). Podobny brak zależności istotnej statystycznej ( $p > 0,05$ ) wykazano w stężeniu miedzi pomiędzy pacjentami w fazie depresyjnej i w fazie remisji. W grupie pacjentów z aktualnym epizodem depresyjnym nie wykazano istotnych statystycznie różnic ( $p > 0,05$ ) w zakresie stężenia miedzi pomiędzy pacjentami spełniającymi oraz niespełniającymi kryteriów odpowiednio: depresji z objawami atypowymi, zespołu melancholicznego, depresji psychotycznej czy oporności na leczenie. Nie wykazano również istotnych korelacji pomiędzy stężeniem miedzi w depresji lub remisji a wiekiem pacjentów oraz takimi parametrami klinicznymi jak: czas trwania choroby, wiek w momencie zachorowania, czas trwania obecnego epizodu depresji lub remisji, średniej ilości epizodów depresyjnych w ostatnim roku, ilości hospitalizacji w ostatnim roku i w całym okresie choroby. Jednak w grupie pacjentów będących w remisji wykazano korelację pomiędzy stężeniem surowiczym miedzi a średnią liczbą nawrotów epizodów chorobowych w ostatnim roku oraz czasem trwania remisji ( $p < 0,05$ ). W wyniku analizy korelacji stężenia miedzi z nasileniem depresji mierzonym skalą HDRS oraz skalą MADRS również nie wykazano istotności statystycznej we wszystkich badanych subpopulacjach ( $p > 0,05$ ).

### 5.2. Cynk

Stężenie cynku w surowicy pacjentów w przebiegu MDD w fazie depresyjnej było istotnie niższe od stężenia tego pierwiastka rejestrowanego w grupie kontrolnej (Test U Manna–Whitneya,  $p = 0,003$ ). Jednak stężenia cynku w grupie osób będących w remisji a zdrowymi ochotnikami nie wykazywały istotnych statystycznie różnic ( $p = 0,348$ ). Podobny brak różnic w stężeniu badanego pierwiastka występował między grupą pacjentów będących



w depresji a pacjentów w remisji ( $p = 0,096$ ).

W grupie pacjentów z aktualnym epizodem depresyjnym nie wykazano istotnych statystycznie różnic w medianach stężenia cynku pomiędzy pacjentami spełniającymi oraz niespełniającymi kryteriów odpowiednio: depresji z objawami atypowymi i melancholicznymi, depresji psychotycznej oraz oporności na leczenie. Natomiast w grupie pacjentów w będących w remisji wykazano istotne statystycznie różnice w zakresie stężenia cynku pomiędzy grupą pacjentów spełniających kryteria lekooporności a grupą bez oporności na leczenie (Test U Manna–Whitneya,  $p = 0,035$ ).

Nie wykazano również istotnych korelacji pomiędzy stężeniem cynku a wiekiem pacjentów (będących w epizodzie depresyjnym, remisji oraz całej populacji pacjentów z MDD) oraz takimi parametrami klinicznymi jak: całkowity czas trwania choroby, średnia ilość epizodów depresyjnych w ostatnim roku, średnia ilość hospitalizacji w ostatnim roku oraz liczba wszystkich hospitalizacji, nasilenie depresji mierzonej skalą HDRS i MADRS oraz czas trwania obecnego epizodu depresji lub remisji. Jedyną dodatnią korelację wykazano pomiędzy stężeniem cynku u pacjentów w okresie remisji a średnią liczbą epizodów depresyjnych w ostatnim roku ( $p < 0,05$ ).

### **5.3. Porównanie stężenia miedzi i cynku pomiędzy pacjentami z rozpoznaniem choroby afektywnej dwubiegunowej i jednobiegunowej**

Na potrzeby analizy statystycznej porównania stężeń badanych mikroelementów do grupy BD typu II włączono zarówno pacjentów z rozpoznaniem BD typu II jak i pacjentów z rozpoznaniem BD nie określonych (*bipolar disorder not otherwise specified* – BD NOS). Porównanie stężenia cynku i miedzi w epizodzie depresyjnym pomiędzy grupą pacjentów z rozpoznaniem BD (BD typu I i II) oraz MDD nie wykazało istotnych statystycznie różnic (odpowiednio:  $p = 0,50$ ;  $p = 0,82$ ; Test U Manna–Whitneya). Podobny brak istotności statystycznej uzyskano w przypadku analizy stężeń cynku oraz miedzi w okresie remisji pomiędzy pacjentami z BD (BD typu I i II) i MDD (odpowiednio:  $p = 0,32$ ;  $p = 0,86$ ; Test U Manna–Whitneya). Przeprowadzona analiza ANOVA rang Kruskala–Wallisa stężenia cynku i miedzi we wszystkich grupach (BD typu I vs BD typu II, BD typu I vs MDD, BD typu II vs MDD), zarówno w okresie depresji jak i remisji, nie wykazała obecności istotnych statystycznie różnic ( $p > 0,05$ ). Porównanie stężeń mikroelementów we wczesnej i późniejszej fazie BD oraz MDD również charakteryzowało się brakiem istotności statystycznej ( $p > 0,05$ ).

## 6. WNIOSKI

Przeprowadzone badanie jest pierwszym badaniem, które zostało przeprowadzone na tak dużej grupie pacjentów z BD i MDD oraz największej jak do tej pory grupie kontrolnej. W przeprowadzonym badaniu uwzględniono również największą liczbę zmiennych charakteryzujących szczegółowo obraz klinicznych chorób afektywnych oraz ich przebieg.

Uzyskane dane z przeprowadzonego badania kliniczno-kontrolnego pozwalają stwierdzić, iż stężenie cynku wykazuje jedynie pewne cechy biologicznego markera stanu, jednak są one niewystarczające aby uznać stężenie cynku za marker cechy MDD. Analiza statystyczna wykazała, że stężenie cynku w surowicy w grupie pacjentów w epizodzie depresyjnym w przebiegu MDD jest znacząco niższe od stężenia notowanego w grupie zdrowych ochotników przy braku statystycznej różnicy w stężeniu jonu pomiędzy grupą pacjentów będących w remisji a grupą zdrowych ochotników.

W przypadku stężenia miedzi uzyskane dane nie potwierdzają żadnych cech markera stanu czy cechy MDD. Analiza stężeń miedzi nie wykazała obecności istotnych statystycznie różnic w stężeniu u pacjentów w poszczególnych fazach MDD (depresji, remisji) a grupą zdrowych ochotników.

W wyniku analizy statystycznej uzyskanych wyników wykazano, że jedynymi istotnymi statystycznie różnicami stężenia cynku charakteryzowały się następujące grupy: pacjentów w remisji w przebiegu MDD z cechami lekooporności i bez tych cech w poprzedzającym epizodzie depresyjnym oraz korelacja pomiędzy stężeniem cynku u pacjentów w remisji a średnią ilością epizodów depresyjnym w ostatnim roku. Jednak w większości analizowanych korelacji nie wykazano istotnych statystycznie różnic: pomiędzy fazą ostrą choroby a remisją, czy stężeniem cynku a nasileniem objawów depresyjnych mierzonych odpowiednimi skalami. W przypadku stężeń miedzi większość analizowanych korelacji charakteryzowała się brakiem istotności statystycznej. Wyjątek stanowiły wykazane dodatnie korelacje pomiędzy stężeniem miedzi a średnią liczbą nawrotów epizodów chorobowych w ostatnim roku oraz stężeniem miedzi a czasem trwania remisji w grupie pacjentów będących aktualnie w remisji w przebiegu MDD.

Co więcej, wykazano, że porównanie stężeń poszczególnych mikroelementów pomiędzy chorymi z rozpoznaniem MDD i BD nie jest czynnikiem różnicującym te zaburzenia afektywne, co może sugerować wspólną etiologię.

Dodatkowo należy zauważyć, że uzyskiwane stężenia miedzi i cynku mieściły się w granicach normy stężenia surowiczego, które dla miedzi wynosi: 0,7–1,4  $\mu\text{g/ml}$ ; a dla cynku: 0,5–1,5  $\text{mg/l}$ .

Wśród ograniczeń przedstawianego badania należy wymienić: brak prospektywnego modelu oceniającego dynamikę zmian stężeń badanych mikroelementów u tych samych pacjentów w obu populacjach klinicznych, stosowanie odmiennego leczenia farmakologicznego w porównywanych grupach badawczych oraz brak możliwości oszacowania wpływu na uzyskane wyniki.

Pomimo ograniczeń prezentowanego badania oraz licznych wyników analiz, które nie charakteryzowały się istotnością statystyczną, uzyskane dane mogą stanowić istotne źródło wiedzy na temat roli badanych mikroelementów w patofizjologii zarówno BD jak i MDD. Ze względu na niewielką ilość danych w literaturze oraz niespójność wyników istnieje konieczność prowadzenia dalszych badań w tym obszarze na liczniejszych grupach klinicznych.

## 7. PIŚMIENNICTWO

1. Eby GA, Eby KL. Rapid recovery from major depression using magnesium treatment. *Medical hypotheses*. 2006;67(2):362-70.
2. Saveanu RV, Nemeroff CB. Etiology of depression: genetic and environmental factors. *The Psychiatric clinics of North America*. 2012;35(1):51-71.
3. Sowa-Kucma M, Szewczyk B, Sadlik K, Piekoszewski W, Trela F, Opoka W, et al. Zinc, magnesium and NMDA receptor alterations in the hippocampus of suicide victims. *Journal of affective disorders*. 2013;151(3):924-31.
4. Whiteford HA, Degenhardt L, Rehm J, Baxter AJ, Ferrari AJ, Erskine HE, et al. Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2013;382(9904):1575-86.
5. Vashum KP, McEvoy M, Milton AH, McElduff P, Hure A, Byles J, Attia J. Dietary zinc is associated with a lower incidence of depression: findings from two Australian cohorts. *J Affect Disord*. 2014 Sep;166:249-57. doi: 10.2016/j.jad.2014.05.016. Epub 2014 May 23.
6. Derom ML, Sayon-Orea C, Martinez-Ortega JM, Martinez-Gonzalez MA. Magnesium and depression: a systematic review. *Nutr Neurosci*. 2013;16(5):191-206. doi: 10.1179/1476830512Y.0000000044.
7. Machado-Vieira R, Ibrahim L, Henter ID, Zarate CA Jr. Novel glutamatergic agents for major depressive disorder and bipolar disorder. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012 Feb;100(4):678-87. doi: 10.2016/j.pbb.2011.09.010. Epub 2011 Sep 25.
8. Amani R, Saeidi S, Nazari Z, Nematpour S. Correlation between dietary zinc intakes and its serum levels with depression scales in young, female students. *Biol Trace Elem Res*. 2010 Nov;137(2):150-8. doi: 10.1007/s12011-009-8572-x. Epub 2009 Dec 15.
9. Fujii RK, Goren A, Annunziata K, Mould-Quevedo J. Prevalence, awareness, treatment and burden of major depressive disorder: Estimates from the National Health and Wellness Survey in Brasil. *Value in Health Regional Issues*. Volume 1, Issue 2, December 2012, Pages 235-243.
10. Rodrigues AA, Rosa AR, Kunz M, Bruna A, Kapczynski F. Bipolar disorder: staging and neuroprogression. *Psychiatr Pol*. 2014 Mar-Apr;48(2):231-43.
11. Nowak Gabriel. "Cynk w fizjologii oraz patofizjologii i terapii depresji". Red. G. Nowak, Kraków 2001, s. 5-6.
12. Zięba A., Dudek D. Cynk: Rola w procesach plastyczności mózgu. "Depresja:

- Patofizjologia, terapia, depresje lekooportne”. Red. G. Nowak, Kraków 2001 S. 57-64.
13. Nguyen PH, Grajeda R, Melgar P, Marcinkevage J, DiGirolamo AM, Flores R, Martorell R. Micronutrient supplementation may reduce symptoms of depression in Guatemalan women. *Arch Latinoam Nutr.* 2009 Sep;59(3):278-86.
  14. Furtado M, Katzman MA. Examining the role of neuroinflammation in major depression. *Psychiatry Res.* 2015 Sep 30;229(1-2):27-36. doi: 10.1016/j.psychres.2015.06.009. Epub 2015 Jun 21.
  15. Redakcja naukowa II wydania: S. Pużyński, J. Rybakowski, J. Wciórka – „Choroby afektywne nawracające”, S.305-394, „Psychiatria. Psychiatria Kliniczna” Tom 2, Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2011.
  16. Kalia M, Costa E Silva J. *Biomarkers of psychiatric disease: current status and future prospects.* *Metabolism.* 2015 Mar;64(3 Suppl 1):S11-5. doi: 10.1016/j.metabol.2014.10.026. Epub 2014 Oct 30.
  17. Lopresti AL, Maker GL, Hood SD, Drummond PD. A review of peripheral biomarkers in major depression: the potential of inflammatory and oxidative stress biomarkers. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2014 Jan 3;48:102-11. doi: 10.1016/j.pnpbp.2013.09.017. Pub 2013 Oct 5.
  18. Siwek M, Wróbel A, Dudek D, Nowak G, Zięba A. 2005. The role of zinc in the pathogenesis and treatment of affective disorders. *Psychiatr. Pol.* 2005;34(5):899-909.
  19. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS.* 2010 Nov;5(6):463-6 doi: 10.1097/COH.0b013e32833ed177.
  20. Szewczyk B, Poleszak E, Sowa-Kucma M, Siwek M, Dudek D, Ryszewska-Pokrasiewicz B, et al. Antidepressant activity of zinc and magnesium in view of the current hypotheses of antidepressant action. *Pharmacol Rep.* 2008;60(5):588-9.
  21. Schneider B, Prvulovic D, Oertel-Knochel V, Knochel C, Reinke B, Grexa M, et al. Biomarkers for major depression and its delineation from neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol.* 2011;95(4):703-17. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.08.001
  22. Huang TL, Lin CC. Advances in biomarkers of major depressive disorder. *Adv Clin Chem.* 2015;68:177-204. doi: 10.1016/bs.acc.2014.11.003. Epub 2015 Jan 7.
  23. Niciu MJ, Mathews DC, Nugent AC, Ionescu DF, Furey ML, Richards EM, Machado-Vieira R, Zarate CA Jr. Developing biomarkers in mood disorders research through the use of rapid-acting antidepressants. *Depress Anxiety.* 2014 Apr;31(4):297-307. doi: 10.1002/da.22224. Epub 2013 Dec 18.
  24. Siwek M, Wrobel A, Dudek D, Nowak G, Zieba A. The role of copper and

- magnesium in the pathogenesis and treatment of affective disorders. *Psychiatr Pol.* 2005;39(5):911-20.
25. Robert Vink, Mihai Nechifor. "Magnesium in the Central Nervous System", George A. Eby, Karen L. Eby, Harald Murck, "Magnesium and major depression", S. 313-330, 2011. University of Adelaide Press.
  26. Ayorech Z, Tracy DK, Baumeister D, Giaroli G. Taking the fuel out of the fire: evidence for the use of anti-inflammatory agents in the treatment of bipolar disorders. *J Affect Disord.* 2015 Mar 15;174:467-78. doi: 10.1016/j.jad.2014.12.015. Epub 2014 Dec 12.
  27. Villanueva R. Neurobiology of major depressive disorder. *Neural. Plast.* 2013;2013:873278. doi:1155/2013/873278. Pub 2013 Oct 9.
  28. Zięba A., Dudek D. – Cynk: Rola w procesach plastyczności mózgu. S. 57-64, "Depresja: Patofizjologia, terapia, depresje lekooporne", Red. G. Nowak, Kraków 2001.
  29. Fakhoury M. New insights into the neurobiological mechanisms of major depressive disorder. *Gen Hosp Psychiatry.* 2015 Mar-Apr;37(2):172-7. doi: 10.1016/genhosppsy.2015.01.005. Epub 2015 Jan 16.
  30. Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M (2011) A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011 Apr 29;35(3):676-92. doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.05.004.
  31. Swardfager W, Herrmann N, McIntyre RS, Mazereeuw G, Goldberger K, Cha DS, Schwartz Y, Lanctot KL. Potential roles of zinc in the pathophysiology and treatment of major depressive disorder. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013 Jun;37(5):911-29. doi: 10.1016/neubiorev.2013.03.018. Epub 2013 Apr 6.
  32. Dou X, Tin X, Zheng Y, Huang J, Shen Z, Li H, Wang X, Mo F, Wang W, Wang S, Shen H. Psychological stress induced hippocampus zinc dyshomeostasis and depression-like behavior in rats. *Behav Brain Res.* 2014 Oct 15;273:133-8. doi: 10.1016/j.bbr.2014.07.040. Epub 2014 Aug 1.
  33. Menard C, Hodes GE, Russo SJ. Pathogenesis of depression: insights from human and rodent studies. *Neuroscience.* 2016 May 3;321:138-162. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.05.053. Epub 2015 May 30.
  34. Szewczyk B, Kubera M, Nowak G. The role of zinc in neurodegenerative

- inflammatory pathways in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011 Apr 29;35(3):693-701. doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.02.010. Epub 2010 Feb 13.
35. Rodrigues AA, Rosa AR, Kunz M, Bruna A, Kapczynski F. Bipolar disorder: staging and neuroprogression. *Psychiatr Pol*. 2014 Mar-Apr;48(2):231-43.
36. Sowa-Kućma M, Szewczyk B, Sadlik K, Piekoszewski W, Trela F, Opoka W, Poleszak E, Pilc A, Nowak G. Zinc, magnesium and NMDA receptor alterations in the hippocampus of suicide victims. *J Affect Disord*. 2013 Dec;151(3):924-31. doi: 10.1016/j.jad.2013.08.009. Epub 2013 Aug 17.
37. Dionisio AGG, Dantas de Jesus AM, Stabile Amais R, Donati GL, Miranda KA, Guerra MBB, Nobrega JA, Pereira-Filho ER. Old and new flavors of flame (furnace) atomic absorption spectrometry. *International Journal of Spectroscopy*, volume 2011 (2011), Article ID 262715, 30 pages. doi: 10.1155/2011/262715.
38. Machado-Vieira R, Ibrahim L, Henter ID, Zarate CA Jr. Novel glutamatergic agents for major depressive disorder and bipolar disorder. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012 Feb;100(4):678-87. doi: 10.1016/j.pbb.2011.09.10. Epub 2011 Sep 25.
39. Ghasemi M, Phillips C, Trillo L, De Miguel Z, Das D, Salehi A. The role of NMDA receptors in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;47C:336-58. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.08.017
40. Pałucha A., Pilc A.. Cynk: Rola w procesach plastyczności mózgu. S.39-55, "Układ glutaminianergiczny – interakcja z cynkiem", Red. G. Nowak, Kraków 2001.
41. Vink Robert, Nechifor Mihai, "Magnesium in the Central Nervous System". Valentina Trapani, Lucia Mastrototaro and Federica I. Wolf, "Magnesium and the Yin-Yang interplay in apoptosis", S. 85-98, 2011. University of Adelaide Press.
42. Alturfan AA, Zegin E, Daiyerli N, Alturfan EE, Gumustas MK, Aytac E, Aslan M, Balkis N, Aksu A, Yigit G, Uslu E, Kokoglu E. Investigation of zinc and copper levels in methimazole-induced hypothyroidism: relation with the oxidant-antioxidant status. *Folia Biol (Praha)*. 2007;53(5):183-8.
43. Kubera M. Cynk: Rola w procesach plastyczności mózgu. S. 65-89, "Immunologiczne aspekty zaburzeń homeostazy cynku w depresji", Red. G. Nowak, Kraków 2001.
44. Sullivan JF, Blotcky AJ, Jetton MM, Hahn HK, Burch RE. *Serum levels of selenium, calcium, copper, magnesium, manganese and zinc in various human diseases*. *J Nutr*. 1979 Aug;109(8):1432-7.
45. Narang RL, Gupta KR, Narang AP, Singh R (1991) Levels of copper and zinc in depression. *Indian J Physiol Pharmacol* 35:272-4.

46. Pyatskowitz JW, Prohaska JR. Rodent brain and heart catecholamine levels are altered by different models of copper deficiency. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2007 Mar;145(2):275-81. Epub 2007 Jan 12.
47. Naylor GJ, Smith AH, Bryce-Smith D, Ward NI. *Trace elements in manic depressive psychosis*. *J Affect Disord*. 1985 Mar-Apr;8(2):131-6.
48. Mustak MS, Rao TS, Shanmugavelu P, Sundar NM, Menon RB, Rao RV, Rao KS. *Assessment of serum macro and trace element homeostasis and the complexity of inter-element relations in bipolar mood disorders*. *Clin Chim Acta*. 2008 Aug;394(1-2):47-53. doi: 10.1016/j.cca.2008.04.003. Epub 2008 Apr 8.
49. Prohaska JR, Smith TL. Effect of dietary or genetic copper deficiency on brain catecholamines, trace metals and enzymes in mice and rats. *J Nutr*. 1982 Sep;112(9):1706-17.
50. Siwek M, Szewczyk B, Dudek D, Styczeń K, Sowa-Kućma M, Młyniec K, Siwek A, Witkowski L, Pochwat B, Nowak G. Zinc as a marker of affective disorders. *Pharmacol Rep*. 2013;65(6):1512-8.
51. Christopher J. Frederickson. *Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons*. *International Review of Neurobiology*. 1989, vol. 31:s145-238.
52. Salgueiro MJ, Zubillaga M, Lysionek A, Sarabia MI, Caro R, De Paoli T, Hager A, Weill R, Boccio J. *Zinc as an essential micronutrient, a review*. *Nutrition Research*, 2000, vol. 20, No. 5, pp 737-755.
53. Szewczyk B, Poleszak E, Sowa-Kućma M, Siwek M, Dudek D, Ryszewska-Pokraśniewicz B, Radziwoń-Zaleska M, Opoka W, Czekał J, Pilc A, Nowak G. Antidepressant activity of zinc and magnesium in view of the current hypotheses of antidepressant action. *Pharmacol Rep*. 2008 Sep-Oct;60(5):588-9.
54. Szewczyk B. *Zinc homeostasis and neurodegenerative disorders*. *Front Aging Neurosci*. 2013 Jul 19;5:33. doi: 10.3389/fnagi.2013.00033. eCollection2013.
55. Osredkar J, Sustar N (2011) Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance. *J Clin Toxicol* S3:001. doi:10.4172/2161-0495.S3-001.
56. Nowak G. *Zinc, future mono/adjunctive therapy for depression: Mechanisms of antidepressant action*. *Pharmacol Rep*. 2015 Jun; 67(3):659-62. doi: 10.1016/j.pharep.2015.01.015. Epub 2015 Feb 8.
57. Maes M, Vandoolaeghe E, Neels H, Demedts P, Wauters A, Meltzer HY, et al (1997) Lower serum zinc in major depression is a sensitive marker of treatment resistance and of the immune/inflammatory response in that illness. *Biol Psychiatry*, 42:349–358.



58. Etebary S, Nikseresht S, Sadeghipour HR, Zarrindast MR (2010) Postpartum depression and role of serum trace elements. *Iran J Psychiatry* 5:40-6.
59. Maret W, Sandstead HH. *Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation*. *J Trace Elem Med Biol*. 2006;20(1):3-18. Epub 2006 Feb 21.
60. Arnaud J, Touvier M, Galan P, Andriollo-Sanchez M, Ruffieux D, Roussel AM, Hercberg S, Favier A. Determinants of serum zinc concentrations in a population of French middle-age subjects. *Eur J Clin Nutr*. 2010 Oct;64(10):1057-64. doi: 10.1038/ejcn.2010.118. Epub 2010 Jul 28.
61. Maserejian NN, Hall SA, McKinlay JB. *Low dietary or supplemental zinc is associated with depression symptoms among women, but not men, a population-based epidemiological survey*. *J Affect Disord*. 2012 Feb;136(3):781-8. doi: 10.1016/j.jad.2011.09.039. Epub 2011 Oct 24.
62. Młyniec K, Budziszewska B, Reczyński W, Sowa-Kućma M, Nowak G. The role of the GPR39 receptor in zinc deficient-animal model of depression. *Behav Brain Res*. 2013 Feb 1;238:30-5. doi: 10.1016/j.bbr.2012.10.020. Epub 2012 Oct 23.
63. Młyniec K, Davies CL, de Agüero Sanchez IG, Pytka K, Budziszewska B, Nowak G. Essential elements in depression and anxiety. Part I. *Pharmacol Rep*. 2014 Aug;66(4):534-44. doi: 10.1016/j.pharep.2014.03.001. Epub 2014 Apr 2.
64. Amani R, Saeidi S, Nazari Z, Nematpour S. Correlation between dietary zinc intakes and its serum levels with depression scales in young, female students. *Biol Trace Elem Res*. 2010 Nov;137(2):150-8. doi: 10.1007/s12011-009-8572x. Epub 2009 Dec 15.
65. Russo AJ (2011) Analysis of plasma zinc and copper concentration, and perceived symptoms, in individuals with depression, post-zinc and anti-oxidant therapy. *Nutr Metab Insights* 17:19-27. doi: 10.4137/NMI.S6760.
66. Sensi SL, Paoletti P, Koh JY, Aizenman E, Bush AI, Hershfinkel M. The neurophysiology and pathology of brain zinc. *J Neurosci*. 2011 Nov 9;31(45):16076-85. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3454-11.2011.
67. Gapys B, Raszeja-Specht A, Bielarczyk H. Rola Zn w procesach fizjologicznych i patologicznych organizmu. *Diagn Lab* 2014;50(1):45-52.
68. Schlegel-Zawadzka M. Cynk: Źródła, biodostępność, metabolizm, preparaty cynku. s.7-26, „Cynk w fizjologii oraz patofizjologii i terapii depresji”, Red. G. Nowak, Kraków 2001.
69. Krocza B., Nowak G. Cynk: Rola w procesach plastyczności mózgu . S. 91-109, “Rola cynku w mechanizmie działania leków przeciwdepresyjnych. Implikacje

- terapeutyczne.”, Red. G. Nowak, Kraków 2001.
70. Maes M, D’Haese PC, Scharpe S, D’Hondt P, Cosyns P, De Broe ME. Hipozincemia in depression. *J Affect Disord.* 1994 Jun;31(2):135-40.
71. Skangiel-Kramska J., Czupryn A. Cynk: Rola w procesach plastyczności mózgu. S.27-38, „Cynk w fizjologii oraz patofizjologii i terapii depresji”, Red. G. Nowak, Kraków 2001.
72. Nowak G, Szewczyk B, Pilc A. Zinc and depression. An update. *Pharmacol Rep.* 2005 Nov-Dec;57(6):713-8.
73. Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, Frederickson CJ, Thompson RB. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *J Nutr.* 2000 May;130(5S Suppl):147S-83S.
74. Letho SM, Ruusunen A, Tolmunen T, Voutilainen S, Tuomainen TP, Kauhanen J. Dietary zinc intake and the risk of depression in middle-aged men: a 20-year prospective follow-up study. *J Affect Disord.* 2013 Sep;150(2):682-5. doi: 10.1016/j.jad.2013.03.027. Epub 2013 May 2.
75. Little KY, Castellanos X, Humphries LL, Austin J. Altered zinc metabolism in mood disorder patients. *Biol Psychiatry.* 1989 Oct;26(6):646-8.
76. Schlegel-Zawadzka M, Zieba A, Dudek D, Krosniak M, Szymaczek M, Nowak G. (2002). Effects of depression and antidepressant therapy on serum zinc levels. In: Roussel AM, Anderson RA, Favrier AE. (eds) *Trace Elements in Man and Animals* 10. Springer, Boston MA.
77. Siwek M, Dudek D, Zięba A, Nowak G. Stężenie cynku w surowicy jako obwodowy marker zaburzeń depresyjnych. *Farmakoterapia w Psychiatrii i Neurologii.* 2006;3-4:141-149.
78. Siwek M, Dudek D, Schlegel-Zawadzka M, Morawska A, Piekoszewski W, Opoka W, Zięba A, Pilc A, Popik P, Nowak G. Serum zinc level in depressed patients during zinc supplementation of imipramine treatment. *J Affect Disord.* 2010 Nov;126(3):447-52. doi: 10.1016/j.jad.2010.04.024. Epub 2010 May 20.
79. Maes M, De Vos N, Demedts P, Wauters A, Neels H. Lower serum zinc in major depression in relation to changes in serum acute phase proteins. *J Affect Disord.* 1999 Dec;56(2-3):189-94.
80. Salimi S, Kianpoor M, Abassi MR, Abdani M, Moghaddam ES. Lower total serum protein, albumin and zinc in depression in an Iranian population. *Journal of Medical Sciences.* 2008;8:587-590.

81. Ranjbar E, Kasaei MS, Mohammad-Shirazi M, Nasrollahzadeh J, Rashidkhani B, Shams J, Mostafavi SA, Mohammadi MR. Effects of zinc supplementation in patients with major depression: a randomized clinical trial. *Iran J Psychiatry*. 2013 Jun;8(2):73-9.
82. Salari S, Khomand P, Arasteh M, Yousefzamani B, Hassanzadeh K. Zinc sulphate: A reasonable choice for depression management in patients with multiple sclerosis: A randomized, double-blind placebo-controlled clinical trial. *Pharmacol Rep*. 2015 Jun;67(3):606-9. doi: 10.1016/j.pharep.2015.01.002. Epub 2015 Jan 19.
83. Gonzalez-Estecha M, Trasobares EM, Tajima K, Cano S, Fernandez C, Lopez JL, Unzeta B, Arroyo M, Fuentenebro F. Trace elements in bipolar disorder. *J Trace Elem Med Biol*. 2011 Jan;25 Suppl 1:S78-3. doi: 10.1016/j.temb.2010.10.015. Epub 2011 Jan 15.
84. Crayton JW, Walsh WJ (2007) Elevated serum copper levels in women with a history of post-partum depression. *J Trace Elem Med Biol* 21:17-21.
85. Scheiber IF, Mercer JF, Dringen R. Metabolism and functions of copper in brain. *Prog Neurobiol*. 2014 May;116:33-57. doi: 10.1016/j.pneurobio.2014.01.002. Epub 2014 Jan 17.
86. Schlegel-Zawadzka M, Zięba A, Dudek D, Krośniak M, Szymaczek M, Nowak G (1999) Serum Trace Elements in Animal Models and Human Depression. Part II. Copper. *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 14: 447-451.
87. Kaya MC, Bez Y, Selek S, Fatih Karababa I, Bulut M, Savaş HA, Celik H, Herken H (2012) No effect of antidepressant treatment on elevated serum ceruloplasmin level in patients with first-episode depression: a longitudinal study. *Arch Med Res* 43:294-7. doi: 10.1016/j.arcmed.2012.05.006.
88. Collins JF, Klevay LM. *Copper*. *Adv Nutr*. 2011 Nov;2(6):520-2. doi: 10.3945/an.111.001222. Epub 2011 Nov 3.
89. Młyniec K, Gaweł M, Doboszevska U, Starowicz G, Pytka K, Davies CL, Budziszewska B. Essential elements in depression and anxiety. Part II. *Pharmacol Rep*. 2015 Apr;67(2):187-94. doi: 10.1016/j.pharep.2014.09.009.
90. Marchetti C, Baranowska-Bosiacka I, Gavazzo P. Multiple effects of copper on NMDA receptors currents. *Brain Res*. 2014 Jan 13;1542:20-31. doi:10.1016/j.brainres.2013.10.029. Epub 2013 Oct 23.
91. D'Ambrosi N, Rossi L. Copper at synapse: Release, binding and modulation of neurotransmission. *Neurochem Int*. 2015 Nov;90:36-45.

doi:10.1016/j.neuint.2015.07.006. Epub 2015 Jul 15.

92. Stys PK, You H, Zamponi GW (2012) Copper dependent regulation of NMDA receptors by cellular prion protein: implications for neurodegenerative disorders. *J Physiol* 590:1357-68. doi: 10.1113/jphysiol.2011.225276.
93. Manser WW, Khan MA, Hasan KZ (1989) Trace element studies on Karachi population. Part IV: Blood copper, zinc, magnesium and lead levels in psychiatric patients with depression, mental retardation and seizure disorders. *J Pak Med Assoc* 39:269-74.
94. Młyniec K, Ostachowicz B, Krakowska A, Reczyński W, Opoka W, Nowak G. Chronic but not acute antidepressant treatment alters serum zinc/copper ratio under pathological/ zinc-deficient conditions in mice. *J Physiol Pharmacol.* 2014 Oct;65(5):673-8.
95. Ali SA, Peet M, Ward NI. Blood levels of vanadium, caesium and other elements in depressive patients. *J Affect Disord.* 1985 Sep;9(2):187-91.
96. Montgomery SA, Asberg M. A new depression scale designed to be sensitive to change. *Br J Psychiatry.* 1979;134:382-9.
97. Hamilton M. A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1960;23:56-62.
98. Beck AT, Steer RA, Carbin MG. Psychometric properties of the Beck Depression Inventory: Twenty-five years of evaluation. *Clinical Psychology Review, Volume 8, Issue 1, 1988, Pages 77-100.*
99. Young RC, Biggs JT, Ziegler VE, Meyer DA. A rating scale for mania: reliability, validity and sensitivity. *Br J Psychiatry.* 1978;133:429-35.
100. Subramanian KS. Determination of metals in biofluids and tissues: sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, Volume 51, Issue 3, February 1996, Pages 291-319.*

## 8. STRESZCZENIE

*" Ocena laboratoryjnych markerów chorób afektywnych "*

**Wprowadzenie:** Brak jednoznaczności etiologii zaburzeń afektywnych (zarówno choroby afektywnej dwubiegunowej – BD, jak i jednobiegunowej – MDD) oraz liczne trudności diagnostyczne i kliniczne z nimi związane spowodowały, że ogromny wysiłek naukowców jest wkładany w poszukiwanie markerów biologicznych dla tych zaburzeń. Poznanie takich czynników umożliwiłoby stworzenie nowej klasyfikacji, stawianie prawidłowych rozpoznań oraz możliwość lepszego dostosowania stosowanego leczenia. W ostatnim czasie naukowcy zajmujący się zagadnieniem biomarkerów w chorobach afektywnych zwracali szczególną uwagę na teorię wiążącą stan zapalny oraz stres oksydacyjny z etiologią zaburzeń depresyjnych. Pośród licznych markerów tych stanów, szczególną uwagę zwraca się na niektóre mikroelementy, takie jak cynk, miedź, czy magnez. Jony te, w szczególności cynk i miedź, są nie tylko niezbędnymi elementami wielu białek uczestniczących w stanie zapalnym i stresie oksydacyjnym, ale i w bezpośredni sposób uczestniczą w przewodzeniu sygnału w ośrodkowym układzie nerwowym. Miedź i cynk są współodpowiedzialne za modulację działania przekaźnictwa glutaminergicznego, poprzez takie receptory jak NMDA, AMPA, GABA, czy serotoninerbicznego (jony cynku), co jest spójne z teorią monoaminową zaburzeń afektywnych. Dotychczasowe badania kliniczne wykazały, że w przypadku cynku obserwuje się zmniejszenie jego stężenia we krwi pacjentów z rozpoznaniem zaburzeń depresyjnych nawracających. W przypadku stężeń jonów miedzi dotychczasowe dane są niejednoznaczne, jednak wiele z nich wskazuje, że stężenie miedzi w przebiegu depresji jest podwyższone.

**Hipotezy badawcze:** Celem niniejszej pracy była weryfikacja poniższych hipotez badawczych:

1. Czy stężenie surowicze miedzi lub cynku w surowicy może być markerem stanu u pacjentów z rozpoznaniem MDD?
2. Czy stężenie surowicze cynku lub miedzi może być markerem cechy u pacjentów z rozpoznaniem MDD?
3. Czy stężenie surowicze miedzi lub cynku koreluje ze swoistymi cechami

demograficznymi i klinicznymi MDD takimi jak: płeć, wiek, ogólnym czasem trwania choroby, czasem trwania aktualnego epizodu, długością remisji, występowaniem objawów zespołu melancholicznego, zespołu atypowego depresji, objawów psychotycznych, lekooporności, sezonowości zaburzeń, liczbą wszystkich epizodów od momentu zachorowania, liczbą wszystkich hospitalizacji w przebiegu choroby?

4. Czy stężenie miedzi lub cynku może być elementem różnicujących BD od MDD?

**Metodyka badania:** W przeprowadzonym badaniu kliniczno–kontrolnym włączono 114 osób z rozpoznaniem MDD oraz 110 z BD (zgodnie z kryteriami DSM–IV–TR), natomiast grupę kontrolną stanowiło 50 zdrowych ochotników. Rekrutację osób do badania prowadzono w okresie od 21.09.2009 r. do 30.07.2013 r. wśród pacjentów Kliniki Psychiatrii Dorosłych Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Od każdego z uczestników pobierano maksymalnie 9,8 ml krwi żyłnej. Po powstaniu skrzepu, próbki odwirowywano przez 30 minut z prędkością 1800 RPM. Uzyskaną surowicę przechowywano w temp.  $-80^{\circ}\text{C}$  do momentu rozpoczęcia zaplanowanych analiz. Po rozmrożeniu i dokładnym wymieszaniu próbek przeprowadzono analizę ilościową pierwiastków (cynk, miedź) z wykorzystaniem metody płomieniowej atomowej spektrometrii absorpcyjnej (*flame atomic absorption spectrometry* – FAAS). Przed rozpoczęciem serii pomiarów, procedura analityczna była optymalizowana (przepływ gazów, pozycja palnika), celem uzyskania wysokiej czułości. Próbkę surowicy rozcieńczano odpowiednio celem dopasowania do liniowego zakresu krzywej kalibracji. Oznaczenie każdej próbki wykonano w trzech powtórzeniach. Dokładność pomiarów określono za pomocą analizy odzysku. Stężenia badanych pierwiastków (cynk, miedź) były odczytywane z krzywej wzorcowej. Dla pomiarów stężeń cynku wynosiła ona dla 94–99%, a dla miedzi 96–103%.

Każdy z rekrutowanych pacjentów oprócz danych demograficznych i danych dotyczących przebiegu choroby został oceniony przez rekrutującego lekarza skalami mierzącymi nasilenie objawów depresyjnych – skalą depresji MADRS, HDRS, BDI oraz YMRS.

Do analizy różnic w zakresie zmiennych jakościowych wykorzystano test  $\chi^2$ . W celu oceny rozkładu normalnego danych ilościowych zastosowano test Shapiro–Wilka. Ze względu na brak rozkładu normalnego danych ilościowych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Kruskala–Wallisa lub test U Manna–Whitneya. Korelacje pomiędzy

zmiennymi ilościowymi – ze względu na brak rozkładu normalnego – analizowane były przy pomocy Korelacji Rang Spearmana. Do przeprowadzenia obliczeń zastosowano licencjonowanego pakietu statystycznego STATISTICA PL.

**Wyniki:** W przeprowadzonym badaniu kliniczno–kontrolnym wykazano, że stężenie cynku w surowicy w grupie pacjentów w epizodzie depresyjnym w przebiegu MDD jest znacząco niższe od stężenia notowanego w grupie zdrowych ochotników. Co więcej, nie wykazano statystycznej różnicy w stężeniu jonu pomiędzy grupą pacjentów będących w remisji a grupą zdrowych ochotników, fazą ostrą choroby a remisją, czy stężeniem cynku a nasileniem objawów depresyjnych mierzonych odpowiednimi skalami. Jedynymi istotnymi statystycznie różnicami stężenia cynku charakteryzowały się następujące grupy: pacjentów w remisji w przebiegu MDD z cechami lekooporności i bez tych cech w poprzedzającym epizodzie depresyjnym oraz korelacja pomiędzy stężeniem cynku u pacjentów w remisji a średnią ilością epizodów depresyjnym w ostatnim roku.

W przypadku analizy stężeń miedzi nie wykazano obecności istotnych statystycznie różnic w stężeniu u pacjentów w poszczególnych fazach MDD (depresji, remisji) a grupą zdrowych ochotników, czy w pośród większości analizowanych korelacji. Jedynie w grupie pacjentów będących aktualnie w remisji w przebiegu MDD wykazano dodatnią korelację pomiędzy stężeniem miedzi a średnią liczbą nawrotów epizodów chorobowych w ostatnim roku oraz stężeniem miedzi a czasem trwania remisji.

Dodatkowo należy zauważyć, że uzyskiwane stężenia miedzi i cynku mieściły się w granicach normy stężenia surowiczego, które dla miedzi wynosi: 0,7–1,4  $\mu\text{g/ml}$ ; a dla cynku: 0,5–1,5  $\text{mg/l}$ .

**Wnioski:** Przeprowadzone badanie jest pierwszym badaniem, które zostało przeprowadzone na dużej grupie pacjentów z BD i MDD oraz największej jak do tej pory grupie kontrolnej. W przeprowadzonym badaniu uwzględniono również największą liczbę zmiennych charakteryzujących szczegółowo obraz klinicznych chorób afektywnych oraz ich przebieg.

Uzyskane dane w badanej grupie pacjentów z MDD pozwalają stwierdzić, iż stężenie cynku wykazuje pewne cechy biologicznego markera stanu. Dane te są jednak niewystarczające, aby uznać stężenie cynku za marker cechy MDD. W przypadku stężenia miedzi uzyskane dane nie potwierdzają żadnych cech markera stanu czy cechy MDD.

Co więcej porównanie stężeń poszczególnych mikroelementów pomiędzy chorymi z rozpoznaniem MDD i BD nie jest czynnikiem różnicującym te zaburzenia afektywne, co może sugerować wspólną etiologię.

Wśród ograniczeń przedstawianego badania należy wymienić: brak prospektywnego modelu oceniającego dynamikę zmian stężeń badanych mikroelementów u tych samych pacjentów w obu populacjach klinicznych, stosowanie odmiennego leczenia farmakologicznego w porównywanych grupach badawczych oraz brak możliwości oszacowania wpływu zróżnicowanego leczenia na uzyskane wyniki.

Pomimo ograniczeń prezentowanego badania oraz licznych wyników analiz, które nie charakteryzowały się istotnością statystyczną, uzyskane dane mogą stanowić istotne źródło wiedzy na temat roli badanych mikroelementów w patofizjologii zarówno BD jak i MDD. Ze względu na niewielką ilość danych w literaturze oraz niespójność wyników istnieje konieczność prowadzenia dalszych badań w tym obszarze na liczniejszych grupach klinicznych.



## 9. SUMMARY

*„The assessment of laboratory markers of the affective disorders”*

**Introduction:** The ambiguous etiology of affective disorders (bipolar disorder – BD and major depressive disorder – MDD) and numerous diagnostic and clinical difficulties in those disorders resulted in a great effort of scientist that has been put into search for biological markers of affective disorders. Discovering such biomarkers would allow to organize or create a new classification of affective disorders, diagnose more precisely and adjust in a more adequate way the used treatment. Recently scientist that investigate the issue of biomarkers in affective disorders mostly focus on the connection between the inflammatory and oxidative stress theory and the etiology of major depression. Among many markers of those processes some microelements, like zinc, magnesium and copper especially attract attention. Those ions, especially zinc and copper, are not only necessary elements of numerous proteins involved in inflammatory and oxidative stress processes but also in a direct way participate in neurotransmission of signal in central nervous system. Copper and zinc are also coresponsible for modulation of glutaminergic neurotransmission, via NMDA, AMPA, GABA receptors, and serotonergic neurotransmission (zinc ions). This is coherent with monoamine theory of affective disorders. Previously conducted clinical trials demonstrated that in the group of MDD patients the blood concentration of zinc is lowered. The clinical data obtained about the copper levels in affective patients is ambiguous, however most of them report the elevation of copper concentration.

**The studied hypothesis:** The aim of presented study was to verify the following hypothesis:

1. Can the serum concentration of copper or zinc be a state marker in patients with MDD?
2. Can the serum concentration of copper or zinc be a trait marker in patients with MDD?
3. Are there any correlations between serum concentration of zinc or copper and such clinical and demographic traits as: sex, age, global time of disorder, length of the episode or remission, presence of melancholic or atypical syndrome, presence of

psychotic symptoms or drug resistance, seasonal pattern, total number of episodes, total number of psychiatric hospitalizations?

#### 4. Can serum concentration of copper or zinc differentiate BD from MDD?

**Methodology:** In the presented case–control study 114 patients diagnosed with MDD, 110 with BD (according to DSM–IV–TR criteria) and 50 healthy volunteers were recruited. The enrolment was conducted during the period between 21.09.2009 and 30.07.2013 among the in–patients and the out–patients of the Department of Psychiatry of University Hospital in Cracow. From each patient and healthy volunteer no more than 9.8ml of blood was obtained from a brachial vein. After the clot formation the blood samples were centrifuged for 30 minutes at 1800 RPM. The obtained serum samples were stored at –80 °C until use. After the serum samples were defrosted and mixed the quantitative analyze of copper and zinc was done using the flame atomic absorption spectrometry. Gases flow and burner position were optimized before measurements to achieve high sensitivity. The samples were diluted appropriately to fit into the linear range of calibration curves. For all serum samples determinations were performed in triplicate. The accuracy was tested by means of recovery analysis, which for zinc was in the range of 94–99% and copper of 96–103%.

Besides the demographic and clinical data that was obtained, the severity of depressive symptoms was measured using the MADRS, HDRS, BDI and YMRS.

The test  $\chi^2$  was used to analyse the differences between the quality variables. Shapiro–Wilk test was performed in order to evaluate the normal distribution of quantitative data. Because of absence of the normal distribution of data we used the Kruskal–Wallis ANOVA or Mann–Whitney U–test. Correlations between quantitative variables – due to lack of normal distribution - were analysed with the Spearman’s Rank Correlation. For the statistical analysis the STATISTICA PL programme was used.

**Results:** In the presented case–control study the analysis showed that zinc serum concentration among patients in MDD depressive episode is significantly lower than those obtained in the healthy volunteers group. Moreover, there was no statistically significant difference in levels of zinc between following groups: patients in remission and healthy volunteers, acute phase of MDD and remission, zinc concentration and severity of depressive symptoms measured by adequate rating scales. The only statistically significant differences in zinc levels were obtained in following groups: patients with MDD in remission with and

without features of drug resistance in the previous depressive episode, correlation between zinc concentration obtained in MDD remission and mean number of depressive episodes in the last year.

The copper concentration analysis showed no statistically significant differences between different phases of MDD (depression and remission) and group of healthy volunteers, nor among majority of the checked correlations. The only positive correlation was found between concentration of copper in patients in remission (MDD) and average number of depressive episodes in the last year and length of remission.

It is worth to notice that all obtained zinc and copper concentrations fitted in the serum norms for those ions (copper: 0,7–1,4 µg/ml; zinc: 0,5–1,5 mg/l).

**Conclusions:** The presented case–control study is the first study that was conducted on such a large group of BD, MDD patients and healthy controls. This study also included one of the most numerous amount of variables, that characterized in a detailed way the clinical picture of affective disorders and their course.

The obtained results in the group of MDD patients allow to indicate that serum zinc concentration show some features of state biomarker. However this data is not sufficient to consider zinc levels as trait marker of MDD. In the case of copper concentration the obtained results do not confirm any of the features of trait or state markers of MDD. Moreover, lack of differences in concentrations of zinc and copper between MDD and BD might be an indication of the common genesis.

Limitations of this study include: lack of prospective model examining the dynamics of changes in the concentration of the microelements in the same patients in the population of BD and MDD patients, significant variation of pharmacological treatment and the inability to estimate its impact on the obtained results.

Despite of the limitations of the presented study and many results that did not have the statistically significant importance, the obtained data might be an essential source of knowledge about the role of copper and zinc in pathophysiology of affective disorders. Due to small amount of published data and its ambiguity there is a need for further research in this field on bigger clinical populations.

# Study of the Serum Copper Levels in Patients with Major Depressive Disorder

Krzysztof Styczeń<sup>1</sup> · Magdalena Sowa-Kućma<sup>2</sup> · Marcin Siwek<sup>1</sup> · Dominika Dudek<sup>1</sup> · Witold Reczyński<sup>3</sup> · Paulina Misztak<sup>2,4</sup> · Bernadeta Szewczyk<sup>2</sup> · Roman Topór-Mądry<sup>5</sup> · Włodzimierz Opoka<sup>6</sup> · Gabriel Nowak<sup>2,4</sup>

Received: 20 March 2016 / Accepted: 20 April 2016 / Published online: 5 May 2016  
© The Author(s) 2016. This article is published with open access at Springerlink.com

**Abstract** Copper may be involved in the pathophysiology of depression. Clinical data on this issue are very limited and not conclusive. The purpose of the study was to determine the copper concentration in the serum of patients with major depressive disorder and to discuss its potential clinical usefulness as a biomarker of the disease. A case–control clinical study included 69 patients with current depressive episode, 45 patients in remission and 50 healthy volunteers. Cu concentration was measured by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). The mean serum copper level in depressed patients was slightly lower (by 11 %; not statistically significant) than in the control group. Furthermore, there was no significant difference in Cu<sup>2+</sup> concentration between depressive episode and remission, nor between remission and control group. In the remission group were observed significant correlations

between copper levels and the average number of relapses over the past years or time of remission. There was no correlation between serum copper and severity of depression, as measured by HDRS and MADRS. The obtained results showed no significant differences between the copper concentration in the blood serum of patients (both with current depressive episode and in remission) and healthy volunteers, as well as the lack of correlations between the copper level in the active stage of the disease and clinical features of the population. Our study is the first conducted on such a large population of patients, so the results may be particularly important and reliable source of knowledge about the potential role of copper in depression.

**Keywords** Copper · Depression · Biomarkers · Affective disorders · Unipolar depression · MDD

Krzysztof Styczeń and Magdalena Sowa-Kućma contributed equally to this work.

✉ Magdalena Sowa-Kućma  
sowa@if-pan.krakow.pl

- <sup>1</sup> Department of Affective Disorders, Chair of Psychiatry, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland
- <sup>2</sup> Department of Neurobiology, Laboratory of Trace Elements Neurobiology, Institute of Pharmacology PAS, Kraków, Poland
- <sup>3</sup> Department of Analytical Chemistry, University of Science and Technology, Kraków, Poland
- <sup>4</sup> Department of Pharmacobiology, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland
- <sup>5</sup> Department of Epidemiology and Population Studies, Institute of Public Health, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland
- <sup>6</sup> Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland

## Introduction

Copper (Cu) is the third most abundant trace metal (behind iron and zinc) present in every tissue and is required for essential body functions. As a cofactor for numerous enzymes, it plays an important role in the biochemical processes, including erythropoiesis, cellular respiration, peptide amidation, iron, cholesterol and glucose metabolism, pigment formation, and hormones biosynthesis (see [1] for review). These metal ions are also necessary for the proper development and functioning of the central nervous system; low copper level may result in incomplete development, while excess concentration maybe injurious [2]. Among the body organs, the brain is the one of the most copper-rich (next to the heart and liver) [3].

The total human body contains only 75–100 mg, and the recommended daily dosage for adult men and women is 0.9 mg/day (1–1.3 mg/day for pregnant or lactating women). Copper is relatively a stable component of the blood, and its

concentration usually remains between 100 and 130 mg/100 ml of the serum [4, 5]. Approximately 90 % of the copper in the blood is incorporated into ceruloplasmin, which is responsible for carrying copper to tissues that need the mineral [6, 7]. Proper absorption and metabolism of copper requires an appropriate balance with the minerals zinc and manganese. Because zinc can compete with copper in the small intestine and interfere with its absorption, persons who supplement with inappropriately high levels of zinc and lower levels of copper may increase their risk of copper deficiency [8]. That is why the plasma/serum ratio of copper to zinc (optimal 0.70–1.00) is clinically more important than the blood concentration of either of these trace metals. A crucial role in maintaining proper cellular zinc and copper concentration play metallothioneins, which have the capacity to bind both these ions through the thiol group of its cysteine residues. In the human body, large quantities are synthesized primarily in the liver and kidneys and their production is dependent on availability of the dietary minerals [8].

Copper homeostasis is of great importance to human health. Its imbalance is implicated directly or indirectly in the pathogenesis of numerous disorders. Deficit of Cu (rather rare and often co-exist with other nutritional deficiencies) may affect **connective tissue** leading to vascular and skeletal problems, causes **neuronal degeneration**, anemia, and cardiac and immune dysfunctions. Copper deficiency is associated with the following diseases: aceruloplasminemia (very low or absence of ceruloplasmin), Huppke–Brendl syndrome, familial amyotrophic lateral sclerosis, Huntington’s disease, Menkes disease, and occipital horn syndrome [9, 10]. In turn, excess amounts of copper may result in cellular instability and damage due to the oxidative potential of the free metal [5]. Copper toxicity symptoms include nausea, vomiting, abdominal pain and cramps, headache, dizziness, weakness, and diarrhea. High Cu concentration is observed in Alzheimer’s, Parkinson’s, and Wilson’s diseases and may also lead to decline in intelligence in young adolescents [8, 9]. Limited data also suggests the potential importance of copper in the development of neuropsychiatric disorders, including depression [6, 11–16], and several compelling arguments can confirm this fact.

Firstly, copper is an essential component of some enzymes (monoamine oxidase—MAO, dopamine  $\beta$ -hydroxylase—DBH, and tyrosine hydroxylase) involved in the proper turnover of catecholamines, which disturbances can lead to the development of depression [17, 18]. Secondly, copper concentration and even more balance between its reduced ( $\text{Cu}^+$ ) and oxidized form ( $\text{Cu}^{2+}$ ) plays a fundamental role in the oxidative and nitrosative stress (O&NS) processes, which may be one of the main cause of mood disorders (e.g., major depressive disorder—MDD) [4, 8, 19, 20]. Furthermore, Cu is required for structural and catalytic properties of some antioxidant enzymes (e.g., lysyl oxidase and superoxidase dismutase), which are important free radical scavengers and prevent oxidative damages of cells [5]. Many studies also suggest that induction of O&NS

pathways in depression is accompanied by activation of the inflammatory response and acute phase (AP) proteins [21]. Thus, elevated serum concentration of ceruloplasmin (a key protein involved in the storage of copper), a widely recognized AP protein, in depressed patients may be a further evidence of the potential role of Cu ions in the course of depression [22–24].

Copper concentration in the extracellular space is generally low (0.2–1.7  $\mu\text{M}$ ), but during the neurotransmission in some parts of the brain, it can raise even dozens of times. However, the elevated levels of these ions may have important biological significance. In particular, released of copper ions may inhibit *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA) and  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor function and thereby protect neurons from glutamatergic excitotoxicity [25–28]. The disturbances in glutamatergic transmission are the basis of glutamate hypothesis of depression [29].

All the above data confirm the involvement of copper in the regulation of important biological processes, which may be critical in the development of mood disorders. So far, very little is known about alterations in Cu concentration in depression. There are only few studies on this topic. Thus, we decided to measure the copper level in the blood serum of a relatively large population of patients with MDD (depending on the current stage of the disease) and to discuss its potential clinical usefulness as a biomarker of the disease.

## Methods

This study was a part of a large research project entitled “De-Me-Ter” (depression–mechanisms–therapy), the aim of which was to examine the relationship between the symptomatology of affective disorders and the serum concentrations of some biometals, inflammatory, and oxidative stress markers, potentially involved in the pathophysiology of these diseases [30].

## Recruitment of the Study Participants

The study participants were recruited among the in- and out-patients of the Department of Psychiatry, University Hospital (Jagiellonian University Medical College, Cracow, Poland) in the period from 21 September 2006 to 30 July 2013.

The people meeting the DSM-IV-TR criteria for major depressive disorder (MDD) (both in active phase and in remission) and healthy volunteers were included in the study. All participants signed the informed consent forms and were provided with detailed information (both verbally and in writing) about the aims and characteristics of the study. Each potential study participant had the opportunity to ask questions about the study before signing the consent and all those questions were answered by the doctor responsible for the recruitment. The Jagiellonian University Bioethics Committee have approved this study (decision number KBET/77/B/2009; 25.06.2009).

The exclusion criteria (selected on the basis of precise history taking) were described in detail in our previous report [30], but the main were as follows: lack of signed consent; diagnosis of a severe psychiatric disorder other than MDD (for example: schizophrenia, schizoaffective disorder, bipolar disorder); addictive diseases (excluding addiction to nicotine and caffeine); diagnosis of a severe personality disorder; presence of severe somatic disorders (acute or chronic); breastfeeding; or pregnancy. During the study, all the patients were receiving pharmacotherapy with proven efficacy (mono- or polytherapy; for more details, see [30]).

The control group was recruited through advertisements on hospital notice boards, by referral from hospital staff, or their relatives and friends. This group consisted of individuals with no present and past history of severe and chronic somatic or psychiatric diseases, without history of substance use disorders (except for caffeine and nicotine abuse), and with no psychiatric disorders in the first-degree relatives.

### The Diagnostic Tools

The severity of depressive symptoms was measured with the Montgomery–Asberg Depression Rating Scale—MADRS [31] and the Hamilton Rating Scale for Depression – HDRS [32].

### Collection and Processing of Blood Samples and Quantitative Analysis of Copper in Blood Serum Samples

According to the study protocol, from each patient and healthy volunteer no more than 9.8 ml of blood was obtained from a brachial vein using the Monovette system. After the cloth formation the blood samples were centrifuged for 30 min at 1800 RPM. The obtained serum samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

After thawing, the serum copper levels were measured by an electrothermal atomic absorption spectrometry—ET AAS. The authors used Perkin Elmer spectrometer Model 3110 (USA) equipped with a Perkin Elmer HGA-600 graphite furnace. The following measurements' conditions were used: pretreatment temperature was set to  $950^{\circ}\text{C}$  and atomization to  $2300^{\circ}\text{C}$ ; the wavelength was set at 324.8 nm and slit to 0.7 nm. The samples were diluted appropriately to fit into the linear range (10–50 ng/ml) of calibration curves. Standards (Copper standard solution; Merck Millipore Corp., Darmstadt, Germany) and samples were prepared as water solutions. Diluted samples were homogenized by means of sonification. Despite dilution, no sample pretreatment procedures were applied prior to quantitative elements determination. All the measurements were performed in triplicate. The accuracy was tested by means of recovery analysis, which for Cu was in the range of 96–103 %.

### Statistical Methods

The  $\chi^2$  test was used in order to analyze the differences between the qualitative variables. The Shapiro–Wilk test was performed in order to evaluate the normal distribution of quantitative data. Because of the absence of the normal distribution of data, we used the Kruskal–Wallis ANOVA or the Mann–Whitney  $U$  test. Correlations between quantitative variables—due to lack of normal distribution—were analyzed with the Spearman's rank correlation.

### Results

One hundred and fourteen patients (86 women and 28 men) who met the DSM-IV-TR criteria for MDD (69 patients with depressive episodes and 45 in remission) and 50 healthy people (36 women and 14 men) were recruited for the case–control study. All of the patients were treated according to current guidelines using the following drugs: selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI), serotonin–norepinephrine selective inhibitors (SNRI), tricyclic antidepressants (TCA), or mirtazapine, except that some patients were additionally treated with atypical antipsychotic drugs (olanzapine or quetiapine), lithium or lamotrigine to potentiate antidepressant therapy. The detailed characteristics of the study participant were presented in our previous report [30].

The mean age in the group of patients ( $49.36 \pm 10.67$ ) did not show significant differences from the control group ( $45.82 \pm 12.43$ ), ( $p = 0.064$ ; Mann–Whitney  $U$  test). Nor there were any significant differences in terms of the gender distribution ( $p = 0.64$ ;  $\chi^2$  test). The percentage of women in the group of patients was 75.4 %, and in the control group 72 %. There were no significant differences between the average serum concentration of copper in women and in men ( $p = 0.21$ ; Mann–Whitney  $U$  test).

The mean scores in MADRS and HDRS among all the MDD patients (in depressive episode and remission together) were as follows:  $17.64 \pm 13.4$  in MADRS and  $13.02 \pm 8.94$  in HDRS. The mean MADRS and HDRS scores of patients in depressive group were  $26.17 \pm 9.74$  and  $18.83 \pm 6.3$ , respectively. Among patients in remission mean MADRS scores were  $4.25 \pm 4.2$ , while HDRS  $4.11 \pm 3.14$ .

The analysis of variance indicated that there was no significant influence of the disease nor affiliation to healthy volunteer group on the obtained serum copper concentrations ( $p > 0.05$ ; Kruskal–Wallis test). The mean copper levels in depression ( $0.81 \pm 0.27 \mu\text{g/ml}$ ) were lower than in the control group ( $0.91 \pm 0.39 \mu\text{g/ml}$ ). However, this difference was not statistically significant ( $p > 0.05$ ). Similar lack of significance ( $p > 0.05$ ) in copper concentration was observed between depressive patients and those in remission ( $1.01 \pm 1.51 \mu\text{g/ml}$ ) (Table 1).

**Table 1** Serum copper concentration [ $\mu\text{g/ml}$ ] in MDD patients, depending on the current phase of the disease (depression or remission), and healthy controls. Data are expressed as mean  $\pm$  SD or Median [Upper/Lower quartile]

	Depression	Remission	Control
Cu concentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Mean $\pm$ SD		
	0.81 $\pm$ 0.27	1.01 $\pm$ 1.51	0.91 $\pm$ 0.39
	Median [upper/lower quartile]		
	0.83 [0.58/1.00]	0.85 [0.69/0.96]	0.82 [0.68/1.04]

Detailed analysis of the data obtained from patients with a various clinical picture of depressive episodes revealed that there were no statistically significant difference ( $p > 0.05$ ; Mann–Whitney  $U$  test) in copper levels between patients with or without the following clinical features: atypical symptoms of depression, psychotic symptoms, melancholic syndrome, or drug resistance (Table 2).

Another analysis also showed the lack of correlation between copper concentration in the depression or remission phase and age of the patients and several clinical features: duration of the disease; age at the onset of the disorder; duration of the current depressive episode or remission; average number of depressive episodes in last year; and number of total hospitalization in over the past year and in the lifetime. Only in the remission group significant correlation was observed between the serum copper concentration and the mean number of depressive episodes over the past year and duration of the remission ( $r = 0.30$  and  $r = -0.41$ , respectively;  $p < 0.05$ ).

The analysis of correlation between the copper levels and the severity of depression (as measured with the HDRS/MADRS total scores) showed no significance regardless of the subsample (Table 3).

## Discussion

In this case–control study we found that the mean serum copper levels in patients with the depressive episode did not significantly differ from those obtained in healthy volunteers samples. Likewise, there were no significant differences between copper concentration in depressed patients with or

without such clinical features as: atypical features of depression, drug resistance, presence of psychotic symptoms or melancholic syndrome. The obtained copper concentrations showed no correlation with many of the clinical features of the disease. However, in the remission group we found significant correlation between serum copper levels and number of episodes in last year or duration of the remission.

Until now, an analysis of copper concentration in the blood of the patients diagnosed with MDD was the subject of only a few case–control studies and all of them were conducted on a smaller groups of patients [6, 12–16]. Manser et al. [12] in a study of Karachi population observed elevated (by 22 %) plasma copper level in 31 (15 males, 16 females) depressed patients as compared to the 62 normal healthy individuals. Similar observations were also made later by Narang et al. [13]. In the study including 35 (21 males, 14 females) patients there were noted significantly higher (by 14 %) Cu levels in depressed people than in the healthy volunteers ( $n = 35$ ). In turn, after recovery, plasma copper concentration were significantly decreased (by 15 %) [13]. Both of these studies seem to be in opposition to our results, which present no alterations in the level of copper in the course of depression. On the other hand, another study performed on a group of 31 depressed patients and 15 healthy volunteers by Maes et al. [6] indicating no change in copper concentration between the study groups. Additionally, Maes et al. reported no difference in patients meeting (or not) the criteria of melancholic syndrome or drug resistance and no significant correlation between copper levels and severity of depression, duration of depressive episode, age at the onset or total duration of the disorder [6]. Those results remain in line with our study. However, in the

**Table 2** Comparison of copper serum concentrations [ $\mu\text{g/ml}$ ; mean concentration, and median (upper/lower quartile)] in MDD patients with a various clinical picture of depressive episodes

Depression	Mean $\pm$ SD	Median [upper/lower quartile]	Mann–Whitney $U$ test; $p$
With atypical features	0.70 $\pm$ 0.34	0.80 [0.46/0.93]	0.92
Without atypical features	0.93 $\pm$ 1.07	0.83 [0.68/0.99]	
With melancholic features	0.82 $\pm$ 0.28	0.81 [0.58/1.03]	0.63
Without melancholic features	0.93 $\pm$ 1.19	0.84 [0.58/0.98]	
With psychotic syndromes	0.73 $\pm$ 0.21	0.69 [0.56/0.90]	0.59
Without psychotic syndromes	0.89 $\pm$ 1.0	0.83 [0.64/1.0]	
Drug-resistant	0.71 $\pm$ 0.28	0.66 [0.46/0.84]	0.21



**Table 3** Correlations between serum copper concentration [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] and selected quantitative clinical features in depression and remission (Spearman correlation,  $*p < 0.05$ )

	Cu [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]		
	MDD (Total)	Depression	Remission
Age	-0.1	-0.08	-0.16
Age of disease onset	-0.021	-0.06	0.009
Number of episodes in the life	-0.012	0.1	0.18
The average annual number relapses in the last year	0.096	0.07	<b>0.30</b>
The disease duration	-0.057	0.0001	-0.16
Duration of the episode /remission	-0.177	-0.05	<b>-0.41</b>
Total MADRS score	0.001	0.013	0.03
Total HDRS score	-0.001	0.04	0.012

Maes et al.'s trial, there was a decline of copper levels in depressive patients following the antidepressant treatment, while we did not perform any corresponding analyses. Partly consistent with our findings are also the results obtained by Schlegel-Zawadzka et al. [15, 16]. Although, in the study, which enrolled 19 MDD patients and 16 healthy, was shown elevated levels of copper in depressed people. However, just like in our study, there was not any correlation between copper levels and severity of depression measured by HDRS, and moreover, effective antidepressant was without effect on this measure [15, 16]. Interesting observations, which in part are consistent with our results, have also been made in the cross-sectional analysis by Crayton and Walsh [11], the study to which 813 (485 women and 328 men) depressed patients and 54 (28 women and 26 men) control subjects between 30 and 60 years were selected; significant increase in the serum copper concentration in depressed women compared to the matched control was demonstrated. Additionally, it has been shown that women with a history of postpartum depression (PPD) exhibited significantly higher Cu level than those without PPD history. Simultaneously, no difference between the nondepressed and depressed men, and moreover, lower copper levels in normal men than in healthy women were observed. Unfortunately, although this transversal study was conducted on a large population, had a lot of limitations (e.g., absence of current formal diagnostic evaluations or small size of the control groups), which may undermine the potential usefulness of these results [11].

In line with our observations seem to be also the results of some animal models of depression (chronic severe stress, chronic mild stress and olfactory bulbectomy), that revealed no alterations in serum copper in relation to the control group [15].

Concluding, observed (not only) in our study, no significant differences in the serum copper concentration between the patients with the current episode of depression and healthy volunteers, between remission and healthy control group, nor the lack of correlation between the Cu level and severity of depression (or clinical features of population) may suggest

that the role of this trace element in the pathophysiology of major depressive disorder and thereby its potential usefulness as a clinical marker of the disease seems to be relatively low.

On the other hand, the interpretation of our findings, apart from the strengths of the study (many possible intervening variables: age, sex, nicotine dependence, socio-demographic data and the drug state of the patients) should also take into account its restrictions: the lack of a prospective model to test the dynamics of the copper concentrations in the same patients, depending on the stage of the disease; substantial heterogeneity (with regard to the applied therapy) of the study groups and the relatively small number of subgroups presenting specified clinical features. It is also important to mention about significance of zinc/copper ratio, which is crucial for proper functioning of human organism [8]. Some researcher suggest that zinc-copper imbalance can lead to the development of many diseases, especially psychiatric disorders (e.g., depression, postpartum depression, schizophrenia, autism spectrum disorders) and that monitoring of Zn/Cu ratio may be clinically a more sensitive and reliable marker than measuring of each element separately [see 8 for review].

Regardless of this fact, no doubt, this study represents a significant source of knowledge on this issue; however, in view of many limitations and an extremely small number of published reports (and ambiguity of results), our observations should be confirmed by subsequent studies conducted on an even larger (and also other) human population and allowing for analysis of the impact of applied pharmacotherapy and other clinical factors on the copper concentration.

## Limitations

The main limitations of the presented study are the following: lack of a prospective model to test the dynamics of changes in copper levels in individual patients; considerable heterogeneity of the study groups in terms of treatment; and the small number of subgroups presenting specified clinical features.



**Acknowledgments** The study was partially supported by a grant no. POIG.01.01.02-12-004/09-00 and Funds for the Statutory Activity of the Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Krakow, Poland.

**Compliance with Ethical Standards** All participants signed the informed consent forms and were provided with detailed information (both verbally and in writing) about the aims and characteristics of the study. Each potential study participant had the opportunity to ask questions about the study before signing the consent and all those questions were answered by the doctor responsible for the recruitment. The Jagiellonian University Bioethics Committee have approved this study (decision number KBET/77/B/2009; 25.06.2009).

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

## References

- Grubman A, White AR (2014) Copper as a key regulator of cell signalling pathways. *Expert Rev Mol Med* 22:e11. doi:10.1017/erm.2014.11
- Scheiber IF, Mercer JF, Dringen R (2014) Metabolism and functions of copper in brain. *Prog Neurobiol* 116:33–57. doi:10.1016/j.pneurobio.2014.01.002
- Desai V, Kaler SG (2008) Role of copper in human neurological disorders. *Am J Clin Nutr* 88:855S–858S
- Collins JF, Prohaska JR (2010) Knutson MD. Metabolic crossroads of iron and copper *Nutr Rev* 68:133–147. doi:10.1111/j.1753-4887.2010.00271.x
- Młyniec K, Gaweł M, Doboszewska U, Starowicz G, Pytka K, Davies CL, Budziszewska B (2015 Apr) Essential elements in depression and anxiety. Part II *Pharmacol Rep* 67(2):187–194. doi:10.1016/j.pharep.2014.09.009
- Maes M, Vandoolaeghe E, Neels H, Demedts P, Wauters A, Meltzer HY, et al. (1997) Lower serum zinc in major depression is a sensitive marker of treatment resistance and of the immune/inflammatory response in that illness. *Biol Psychiatry* 42:349–358
- Schlegel-Zawadzka M, Nowak G (2000) Alterations in serum and brain trace element levels after antidepressant treatment. Part II: copper. *Biol Trace Elem Res* 73:37–45
- Osredkar J, Sustar N (2011) Copper and zinc, biological role and significance of copper/zinc imbalance. *J Clin Toxicol* S3:001. doi:10.4172/2161-0495.S3-001
- Bandmann O, Weiss KH, Kaler SG (2015) Wilson's disease and other neurological copper disorders. *Lancet Neurol* 14:103–113. doi:10.1016/S1474-4422(14)70190-5
- Stys PK, You H, Zamponi GW (2012) Copper dependent regulation of NMDA receptors by cellular prion protein: implications for neurodegenerative disorders. *J Physiol* 590:1357–1368. doi:10.1113/jphysiol.2011.225276
- Crayton JW, Walsh WJ (2007) Elevated serum Cu levels in women with a history of post-partum depression. *J Trace Elem Med Biol* 21:17–21
- Manser WW, Khan MA, Hasan KZ (1989) Trace element studies on Karachi population. Part IV: blood copper, zinc, magnesium and lead levels in psychiatric patients with depression, mental retardation and seizure disorders. *J Pak Med Assoc* 39:269–274
- Narang RL, Gupta KR, Narang AP, Singh R (1991) Levels of copper and zinc in depression. *Indian J Physiol Pharmacol* 35:272–274
- Russo AJ (2011) Analysis of plasma zinc and copper concentration, and perceived symptoms, in individuals with depression, postzinc and anti-oxidant therapy. *Nutr Metab Insights* 17:19–27. doi:10.4137/NMI.S6760
- Schlegel-Zawadzka M, Zięba A, Dudek D, Krośniak M, Szymaczek M, Nowak G (1999) Serum trace elements in animal models and human depression. Part II. Copper. *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 14:447–451
- Schlegel-Zawadzka M, Zieba A, Dudek D, Zak-Knapik J, Nowak G (1999) Is serum copper a "trait marker" of unipolar depression? A preliminary clinical study. *Pol J Pharmacol* 51:535–538
- Etebary S, Nikseresht S, Sadeghipour HR, Zarrindast MR (2010) Postpartum depression and role of serum trace elements. *Iran J Psychiatry* 5:40–46
- Pytka K, Dziubina A, Młyniec K, Dziedziczak A, Żmudzka E, Furgała A, Olczyk A, Sapa J, Filipek B (2016) The role of glutamatergic, GABA-ergic, and cholinergic receptors in depression and antidepressant-like effect. *Pharmacol Rep* 68:443–450. doi:10.1016/j.pharep.2015.10.006
- Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M (2011) A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 35:676–692. doi:10.1016/j.pnpbp.2010.05.004
- Siwek M, Sowa-Kućma M, Dudek D, Styczeń K, Szweczyk B, Kotarska K, Misztakk P, Pilc A, Wolak M, Nowak G (2013) Oxidative stress markers in affective disorders. *Pharmacol Rep* 65:1558–1571
- Maes M (2011) Depression is an inflammatory disease, but cell-mediated immune activation is the key component of depression. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 35:664–675. doi:10.1016/j.pnpbp.2010.06.014
- Kaya MC, Bez Y, Selek S, Fatih Karababa I, Bulut M, Savaş HA, Celik H, Herken H (2012) No effect of antidepressant treatment on elevated serum ceruloplasmin level in patients with first-episode depression: a longitudinal study. *Arch Med Res* 43:294–297. doi:10.1016/j.arcmed.2012.05.006
- Lee J, Joo EJ, Lim HJ, Park JM, Lee KY, Park A, Seok A, Lee H, Kang HG (2015) Proteomic analysis of serum from patients with major depressive disorder to compare their depressive and remission statuses. *Psychiatry Investig* 12:249–259. doi:10.4306/pi.2015.12.2.249
- Maes M, Scharpé S, Van Grootel L, Uyttenbroeck W, Cooreman W, Cosyns P, Suy E (1992) Higher alpha 1-antitrypsin, haptoglobin, ceruloplasmin and lower retinol binding protein plasma levels during depression: further evidence for the existence of an inflammatory response during that illness. *J Affect Disord* 24:183–192
- Doreulee N, Yanovsky Y, Haas HL (1997) Suppression of long-term potentiation in hippocampal slices by copper. *Hippocampus* 7:666–669
- Peters C, Munoz B, Sepulveda FJ, Urrutia J, Quiroz M, Luza S, De Ferrari GV, Aguayo LG, Opazo C (2011) Biphasic effects of copper on neurotransmission in rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 119:78–88. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07417.x
- Salazar-Weber NL, Smith JP (2011) Copper inhibits NMDA receptor-independent LTP and modulates the paired-pulse ratio after LTP in mouse hippocampal slices. *Int J Alzheimers Dis* 2011:864753. doi:10.4061/2011/864753
- Weiser T, Wienrich M (1996) The effects of copper ions on glutamate receptors in cultured rat cortical neurons. *Brain Res* 742:211–218
- Gerhard DM, Wohleb ES, Duman RS (2016) Emerging treatment mechanisms for depression: focus on glutamate and synaptic plasticity. *Drug Discov Today pii* S1359-6446(16):30024–30021. doi:10.1016/j.drudis.2016.01.016

30. Styczeń K, Siwek M, Sowa-Kućma M, Dudek D, Reczyński W, Szewczyk B, Misztak P, Topór-Mądry R, Opoka W, Nowak G (2015) The serum magnesium concentration as a potential state marker in patients with unipolar affective disorder. *Psychiatr Pol* 49:1265–1276. doi: 10.12740/PP/OnlineFirst/44137
31. Montgomery SA, Asberg M (1979) A new depression scale designed to be sensitive to change. *Br J Psychiatry* 134:382–389
32. Hamilton M (1960) A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 23:56–62

*The serum zinc concentration as a potential biological marker in patients with major depressive disorder*

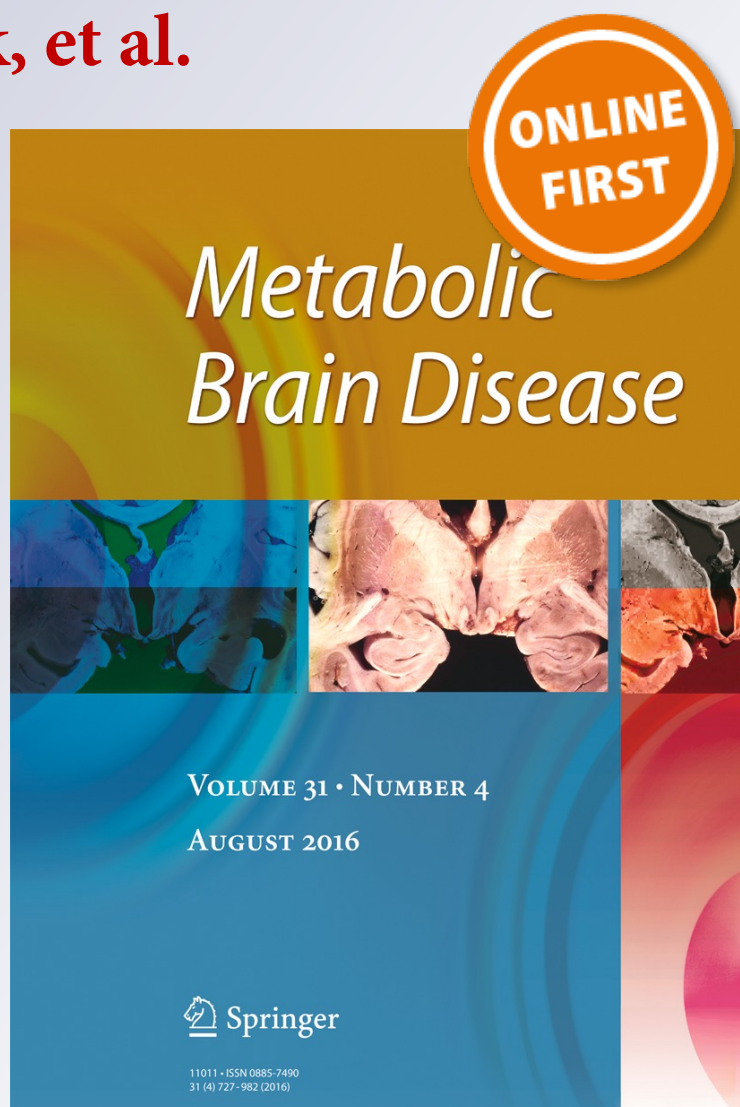
**Krzysztof Styczeń, Magdalena Sowa-Kućma, Marcin Siwek, Dominika Dudek, Witold Reczyński, Bernadeta Szewczyk, Paulina Misztak, et al.**

**Metabolic Brain Disease**

ISSN 0885-7490


Metab Brain Dis

DOI 10.1007/s11011-016-9888-9



**Your article is published under the Creative Commons Attribution license which allows users to read, copy, distribute and make derivative works, as long as the author of the original work is cited. You may self-archive this article on your own website, an institutional repository or funder's repository and make it publicly available immediately.**

# The serum zinc concentration as a potential biological marker in patients with major depressive disorder

Krzysztof Styczeń<sup>1</sup> · Magdalena Sowa-Kućma<sup>2</sup>  · Marcin Siwek<sup>1</sup> · Dominika Dudek<sup>1</sup> · Witold Reczyński<sup>3</sup> · Bernadeta Szewczyk<sup>2</sup> · Paulina Misztak<sup>2,4</sup> · Roman Topór-Mądry<sup>6</sup> · Włodzimierz Opoka<sup>5</sup> · Gabriel Nowak<sup>2,4</sup>

Received: 19 June 2016 / Accepted: 28 July 2016

© The Author(s) 2016. This article is published with open access at Springerlink.com

**Abstract** Despite many clinical trials assessing the role of zinc in major depressive disorder (MDD), the conclusions still remain ambiguous. The aim of the present clinical study was to determine and compare the zinc concentration in the blood of MDD patients (active stage or remission) and healthy volunteers (controls), as well as to discuss its potential clinical usefulness as a biomarker of the disease. In this study 69 patients with current depressive episode, 45 patients in remission and 50 controls were enrolled. The zinc concentration was measured by electrothermal atomic absorption spectrometry (ET AAS). The obtained results revealed, that the zinc concentration in depressed phase were statistically lower than in the healthy volunteers [0.89 vs. 1.06 mg/L, respectively], while the zinc level in patients achieve remission was not significantly different from the controls [1.07 vs. 1.06 mg/L, respectively]. Additionally, among the patients achieve

remission a significant differences in zinc concentration between group with and without presence of drug-resistance in the previous episode of depression were observed. Also, patients in remission demonstrated correlation between zinc level and the average number of depressive episodes in the last year. Serum zinc concentration was not dependent on atypical features of depression, presence of psychotic symptoms or melancholic syndrome, age, age of onset or duration of disease, number of episodes in the life time, duration of the episode/remission and severity of depression measured by the Hamilton Rating Scale for Depression (HDRS), and the Montgomery-Asberg Depression Rating Scale (MADRS). Concluding, our findings confirm the correlation between zinc deficit present in the depressive episode, and are consistent with the majority of previous studies. These results may also indicate that serum zinc concentration might be considered as a potential biological marker of MDD.

**Keywords** Zinc · Depression · Biomarkers · Affective disorders · MDD

✉ Magdalena Sowa-Kućma  
sowa@if-pan.krakow.pl

<sup>1</sup> Department of Affective Disorders, Chair of Psychiatry, Jagiellonian University Medical College, Kopernika 21a, 31-501 Krakow, Poland

<sup>2</sup> Laboratory of Trace Elements Neurobiology, Institute of Pharmacology PAS, Smetna 12, 31-343 Krakow, Poland

<sup>3</sup> Department of Analytical Chemistry, University of Science and Technology, Mickiewicza 30, 30-059 Krakow, Poland

<sup>4</sup> Department of Pharmacobiology, Jagiellonian University Medical College, Medyczna 9, 30-688 Krakow, Poland

<sup>5</sup> Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Jagiellonian University Medical College, Medyczna 9, 30-688 Krakow, Poland

<sup>6</sup> Department of Epidemiology and Population Studies, Institute of Public Health, Jagiellonian University Medical College, Grzegórzecka 20, 31-531 Krakow, Poland

## Introduction

Zinc is a crucial element of living organisms, which is involved in many basic physiological processes (mainly as a cofactor of over 300 enzymes). This cation is recognized as being important for: transcription, translation, DNA repair, proliferation and maturation of cells, apoptosis, neurogenesis, synaptogenesis, neuron growth, or keeping the balance of oxidative and nitrosative redox potential [see (Jurowski et al. 2014 and Szewczyk et al. 2011) for review]. Zinc ions also play a role in the regulation of immune system and inflammation processes, influencing the level of some inflammatory cytokines (e.g. interleukin 6, IL-6; tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ ; or



interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) (Szewczyk et al. 2011; Gapys et al. 2014; Maes et al. 1994, 1997, 1999; Maret and Sandstead 2006; Maserejian et al. 2012; Ranjbar et al. 2013; Russo 2011). It has also been shown that Zn concentration declines during the inflammatory state (Bonaventura et al. 2015).

When compared with other organs, the brain presumably contains the highest levels of zinc in the body. Within brain, Zn<sup>2+</sup> is nonuniformly distributed and its most abundant in the hippocampus, amygdala, cerebral cortex, and olfactory bulbs (Frederickson 1989, Frederickson et al. 2000; Paoletti et al. 2009). There is evidence that zinc deficiency leads to changes in the central nervous system (CNS) functioning, especially in the glutamatergic transmission in the limbic system and cerebral cortex, which playing an important role in the etiopathogenesis of depression [see (Mlyniec 2015) for review]. Zinc ions can modulate a number of ligand- and voltage-gated ion channels, such as gamma-aminobutyric acid (GABA<sub>A</sub>) (Frederickson 1989; Marchetti 2014), N-methyl-D-aspartate (NMDA) (Chen et al. 1997; Szewczyk et al. 2012),  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) and kainate (KA) receptors, and may also affect the serotonin receptors (Kalappa et al. 2015; Veran et al. 2012; Satała et al. 2015). By influencing those receptors in the specific brain areas Zn<sup>2+</sup> indirectly modulates synaptic plasticity, regulate neuronal signal transduction, and other processes, like memory and learning (Paoletti et al. 2009; Yu et al. 2013; Grabrucker 2014). Furthermore, zinc affects emotional lability, psychomotor functions, attention (Szewczyk et al. 2011; Swardfager et al. 2013a), irritability (Russo 2011) and other emotional, executive and cognitive functions (Szewczyk et al. 2011; Maes et al. 1994, 1997; Swardfager et al. 2013a; McLoughlin and Hodge 1990; Narang et al. 1991; Salari et al. 2015).

Numerous clinical studies confirm the role of zinc deficiency in the development of depressive symptoms in a course of major depressive disorder (MDD) (Szewczyk et al. 2011; Gapys et al. 2014; Maes et al. 1994, 1997; Russo 2011; Swardfager et al. 2013a, b; McLoughlin and Hodge 1990; Narang et al. 1991; Gronli et al. 2013; Siwek et al. 2010; Nguyen et al. 2009; Schlegel-Zawadzka et al. 2000; Siwek et al. 2013). Some of these show correlation between zinc deficiency and drug-resistance in patients (Ranjbar et al. 2013; Russo 2011; Swardfager et al. 2013a). It is also proven, that some antidepressants can influence both the blood and brain zinc level (Siwek et al. 2010; Nowak et al. 2005). On the other hand, several case-control trails confirmed antidepressant activity of zinc supplementation in the depressed patients (Szewczyk et al. 2011; Maserejian et al. 2012; Ranjbar et al. 2013; Lehto et al. 2013; Siwek et al. 2009; Nowak et al. 2003; Salari et al. 2015; LAi et al. 2012).

The aim of this study was to determine the correlation between symptomatology of MDD, and the serum changes of zinc concentration. The presented results are a part

of the large clinical study named De-Me-Ter (“Depression – Mechanisms – Therapy”, task 3.2 - Identification of endogenous marker of depression and therapy effectiveness) (Siwek et al. 2016a, b; Siwek et al. 2015; Styczeń et al. 2015).

## Materials and methods

### Recruitment of the study participants

The study participants (Caucasian men and women) were recruited among the in- and outpatients of the Department of Psychiatry, University Hospital, Cracow, Poland, in the period September 21 of 2009 until August 30 of 2013.

Patients fulfilling the DSM-IV-TR criteria for Major Depressive Disorder (MDD) (both in the active phase of depression, and achieve remission) were recruited to the case-control study. All the study participants signed an informed consent and were provided with detailed information (verbally and in writing) about the aims and rules of this clinical study. Each potential study participant had the opportunity to ask questions about the study before signing the consent and all those questions were answered by the doctor responsible for recruitment. The Jagiellonian University Bioethical Committee has approved this study (decision number KBET /77/B/2009; dated June 25, 2009).

The most important exclusion criteria were: diagnosis of a severe psychiatric disorder other than MDD (for example: schizophrenia, schizoaffective disorder, bipolar disorder), substance use disorders (excluding addiction to nicotine and caffeine), comorbidity of serious physical illness (both acute or chronic), diagnosis of a severe personality disorders, breastfeeding, pregnancy or medication which could significantly interfere with blood zinc concentration. As severe somatic diseases excluding from the study (due to the possibility of statistically significant change in the concentrations of biomarkers examined in the De-Me-Ter study) the authors considered the following: chronic autoimmune and inflammatory diseases, acute inflammatory or infections present within a month prior to the recruitment in the study, primary adrenocortical insufficiency, renal failure, chronic pancreatitis, hypoparathyroidism, hyperthyroidism, primary hypoadosteronism, cancer, megaloblastic anemia due to iron deficiency, thalassemia, hemochromatosis, liver cirrhosis, Wilson’s disease, nephritic syndrome and burns. The additional excluding criteria was the fact of using by the participants the following drugs: hydralazine, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (acetylsalicylic acid, ibuprofen, indometacin), tetracyclines, florochinolones, calcium, iron, chelating agents or glucocorticosteroids. All the patients were receiving pharmacotherapy with proven efficacy (mono- or polytherapy), in accordance with the up-to-date treatment guidelines for MDD.

The group of healthy volunteers consisted of people with no present and past history of severe and chronic somatic or psychiatric diseases, without history of substance use disorders (except for caffeine and nicotine abuse), and with no psychiatric disorders in the first-degree relatives. This group was recruited through advertisements on hospital notice boards, by referral from hospital staff, or their relatives and friends.

The detailed socio-demographic and clinical characteristics of the examined population are presented previously (Styczeń et al. 2015).

### The diagnostic tools

For the measurement of the severity of depressive symptoms the Montgomery-Asberg Depression Rating Scale – MADRS (Montgomery and Asberg 1979) and the Hamilton Rating Scale for Depression – HDRS (Hamilton 1960) were used.

### Collection and processing of blood samples. Quantitative analysis of zinc in the blood serum samples

According to the study protocol max. 9.8 ml of blood was obtained from each study participant, at the same time of the day (between 8 and 9 a.m.). Blood was collected from a brachial vein using the Monovette system (Sarstedt, Germany). After the clot formation, the blood was centrifuged at 1800  $\times g$  for 30 min, and the serum (only non-hemolysed) was kept frozen at 80 °C until it could be analyzed. The samples were stored in zinc-free tubes for a maximum period of 4 months. The assessment of zinc was performed in specialized laboratory of trace element analysis, Department of Analytical Chemistry, University of Science and Technology, Cracow. Serum zinc levels were measured by a electrothermal atomic absorption spectrometry (ET AAS) using a PerkinElmer spectrometer model 3110 (USA). The following measurements' conditions were used: air – acetylene flame, 285.2 nm wavelength, 0.7 nm slit and single-element HCL lamps. Gas flow and burner position were optimized before measurements to achieve high sensitivity. The samples were diluted appropriately to fit into the linear range (1–50 ng/ml) of calibration curves. Standards (Zinc standard solution; Merck Millipore Corp., Darmstadt, Germany) and samples were prepared as water solutions. Diluted samples were homogenized by means of sonification. In the case of samples of extremely low volume (a few microliters) the additive method of sample micro-dilution was used. The lowest concentration traceability for zinc was 0.5  $\mu\text{g/L}$ . Despite dilution, no sample pre-treatment procedures were applied prior to quantitative elements determination. Depending on the total sample volume, triplicate determinations were performed. The accuracy of ET AAS technique was tested by means of recovery analysis, which for Zn was in the range of 94–99 %. All reagents used were

of analytical grade. The test tubes for Zn were thoroughly acid washed (0.1 % Nitric acid) and rinsed with double distilled deionized water.

### Statistical methods

The test  $\chi^2$  was used to analyze the differences between the quality variables. The Shapiro-Wilk test was performed in order to evaluate the normal distribution of quantitative data. Because of absence of the normal distribution of data we used the Kruskal-Wallis ANOVA or Mann-Whitney U-test. Correlations between quantitative variables - due to lack of normal distribution - were analysed with the Spearman's Rank correlation.

### Results

One-hundred-and-fourteen patients (including 28 men and 86 women) who met the DSM-IV-TR criteria for MDD (69 patients were in a depressive episode and 45 were in a remission) were enrolled into the De-Me-Ter case-control study. Among the recruited group of participants there were patients using Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRI; 63 patients), Serotonin-Norepinephrine Reuptake Inhibitors (SNRI; 34 patients), tricyclic antidepressants (TCA; 15 patients), mirtazapine (5 patients) and also taking atypical antipsychotic drugs (olanzapine or quetiapine; 15 patients), lithium and lamotrygine (a total of 5 patients) due to enhance the antidepressant therapy (Styczeń et al. 2015). The control group consisted of 50 healthy volunteers (including 14 men and 36 women).

The mean age in the group of patients ( $49.4 \pm 10.7$  years) did not show significant differences from the control group ( $45.8 \pm 12.4$  years), ( $p = 0.064$ ; Mann-Whitney U-test). There were also no statistically significant differences between the sexes in two groups (test  $\chi^2$ ;  $p = 0.64$ ). The percentage of women in the examined population of patients was 75 %, and in the control group it was 72 %. In the patient group there were no differences in the mean zinc concentrations between women and men subgroups ( $p = 0.91$ , Mann Whitney U-test) (Styczeń et al. 2015).

The zinc concentration in the serum samples of patients in depressive episode were significantly lower from those obtained in the healthy volunteers group ( $p = 0.003$ , Mann Whitney U-test). However, there were no statistically significant differences in zinc levels between patients achieve remission and control group ( $p = 0.348$ , Mann Whitney U-test) or between depressed stage and remission ( $p = 0.096$ , Mann Whitney U-test) (Table 1).

Among the group of depressed patients there was no statistically significant difference in zinc levels between patients with and without the following clinical features: atypical or psychotic symptoms of depression, melancholic syndrome, or

**Table 1** Serum zinc concentration [mg/L] in MDD patients, depending on the current phase of the disease (depression or remission), and healthy controls. Data are expressed as mean  $\pm$  SD or Median [Upper/Lower quartile] (Mann Whitney U-test, \* $p < 0.01$  vs. Control)

	Depression	Remission	Control
Zn concentration [mg/L]	Mean $\pm$ SD		
	<b>0.89 <math>\pm</math> 0.18*</b>	1.07 $\pm$ 0.48	1.06 $\pm$ 0.34
	Median [Upper/Lower quartile]		
	<b>0.88 [1.01/0.78]*</b>	0.97 [1.09/0.77]	0.98 [1.22/0.82]

drug-resistance (Table 2). However, among the group of patients in the remission a significant differences in zinc concentration between patients with and without presence of drug-resistance in the previous episode of depression ( $p = 0.035$ , Mann Whitney U-test) were observed.

Furthermore, our results showed no significant correlations between zinc levels and age of the patients and some clinical features (for all: patients in depressive phase, remission and total group population): duration of the disorder, average number of hospitalizations in the last year, average number of depressive episodes in the last year, number of total hospitalization throughout life, severity of depression measured by HDRS (a total score), or MADRS (a total score or age of onset) or duration of current episode severe depression, or remission. The only significant correlation was obtained between zinc concentration in patients achieve remission and average number of depressive episodes in the last year (Table 3).

## Discussion

The presented case-control study demonstrated that the serum zinc levels in patients with depressive episode were significantly lower than those obtained in healthy volunteers' samples. Moreover, there was no statistically significant differences in  $Zn^{2+}$  concentration between patients in remission and healthy volunteers group. The average zinc concentration

in patients achieve remission almost reach the control level, albeit statistically zinc levels between acute stage of the disease and remission are not different. Additionally, no significant differences between zinc concentration in patients with or without such clinical features as: atypical features of depression, drug resistance, presence of psychotic symptoms or melancholic syndrome were noticed.

Our findings are in a good agreement with most reports, which demonstrated reduced zinc concentration in the blood (serum, plasma) of depressed patients (Maes et al. 1994, 1997, 1999; Russo 2011; McLoughlin and Hodge 1990; Siwek et al. 2010; Schlegel-Zawadzka et al. 2000; Siwek et al. 2013; Roozbeh et al. 2011; Irmisch et al. 2010; Amani et al. 2010; Salimi et al. 2008; Wójcik et al. 2006; Little et al. 1989). However, in some studies blood zinc concentrations did not differ between depressed patients and control healthy volunteers group (Ranjbar et al. 2013; Narang et al. 1991; Gronli et al. 2013; Nguyen et al. 2009; Manser et al. 1989; Salustri et al. 2010).

Probably the first article which indicated a link between zinc and depression in the clinical studies was published in 1983 and demonstrated the case of major depressive disorder with a low serum zinc level (Hansen et al. 1983). Next article appeared in 1989. Little et al. examined the zinc concentration in serum and urine of depressed patients and demonstrated hypozincemia in 9 out of 30 patients with mood disorders, however, this study did not include the control (healthy) group (Little et al. 1989). In the study on 31 Karachi depressed patients, a significantly lower serum zinc level was shown, but only in depressed women (not in men) compared to healthy controls (Manser et al. 1989). In the following year (1990) McLoughlin and Hodge clearly demonstrated hypozincemia in 14 untreated depressed patients, compared with 14 healthy controls (McLoughlin and Hodge 1990).

Our results are similar to this demonstrated by Maes and colleagues (Maes et al. 1994). In the first study on 48 MDD patients they showed that not only the zinc level was significantly lower in patients group (when compared to healthy volunteers), but also that it was negatively correlated with the

**Table 2** Comparison of zinc serum concentrations [mg/L; mean ( $\pm$  SD) concentration and median (upper/ lower quartile)] in MDD patients with a various clinical picture of depressive episodes

Depression		Mean $\pm$ SD	Median [Upper/Lower quartile]	Mann-Whitney U-test $p$
Atypical features	With	0.87 $\pm$ 0.16	0.83 [0.88/0.75]	0.17
	Without	0.99 $\pm$ 0.37	0.90 [1.02/0.79]	
Melancholic features	With	0.92 $\pm$ 0.18	0.88 [1.0/0.8]	0.68
	Without	1.00 $\pm$ 0.40	0.88 [1.02/0.72]	
Psychotic syndromes	With	0.77 $\pm$ 0.13	0.78 [0.88/0.65]	0.09
	Without	0.98 $\pm$ 0.35	0.88 [1.02/0.79]	
Drug-resistant	With	0.90 $\pm$ 0.20	0.88 [1.07/0.72]	0.94
	Without	0.89 $\pm$ 0.17	0.87 [1.0/0.79]	



**Table 3** Correlations between serum zinc concentration [mg/L] and selected quantitative clinical features in depression and remission (Spearman's Rank correlation, \* $p < 0.05$ )

Clinical features	Zn [mg/L]		
	MDD (Total)	Depression	Remission
Age	-0.03	-0.026	-0.101
Age of disease onset	-0.03	-0.026	-0.101
Number of episodes in the life	-0.094	-0.081	0.136
The average annual number relapses in the last year	0.161	-0.012	<b>0.355*</b>
The disease duration	0.092	0.236	-0.107
Duration of the episode /remission	-0.209	0.006	-0.231
Total MADRS score	-0.15	0.033	-0.087
Total HDRS score	-0.13	0.022	-0.023

severity of depressive symptoms (Maes et al. 1994). In two further studies on 31 and 48 patients (respectively) diagnosed with MDD Maes et al. also confirmed previous observations Maes et al. 1997, 1999). Additionally, they observed that zinc level was much lowered in drug-resistant patients (Maes et al. 1997). The our results are also supported by those obtained by Siwek et al. (2010); Salimi et al. (2008) and Amani et al. (2010).

The data concerning pre- and postpartum depression demonstrated relationship between zinc and depression status (Wójcik et al. 2006; Roomuangwong et al. 2016), as well as bipolar depression in which lower zinc level was characteristic for depressive episode (Siwek et al. 2016b; Stanley and Wakwe 2002).

Moreover, growing evidence for the valuable augmentation effects of zinc adjunctive therapy coming from clinical studies. The studies demonstrated by Ranjbar et al. (2013); Russo (2011); Siwek et al. (2009) and Nowak et al. (2003) showed that zinc supplementation significantly reduced depression severity (depression rating scores) and facilitated the outcome in antidepressant therapy especially in the treatment-resistant patients. Also, zinc monotherapy reduced symptoms of depression in patients with coexisting obesity (Solati et al. 2015).

On the other hand, there are several clinical studies that did not confirmed the presented results. The result obtained by Gronli et al. on 100 patients aged over 64 years (62 women, 38 men) with different psychiatric diagnoses showed that the patients without depression were characterized by a higher deficit of zinc (2013). Similarly, Nguyen et al. noticed in their observational study on 369 women that there is no correlation between presence of depressive symptoms and zinc levels (2009). Also some other groups did not demonstrate alterations in the blood serum of depressed patients (Narang et al. 1991; Irmisch et al. 2010; Salustri et al. 2010).

The dissimilarity between the data presented in those reports may origin from the differences in the time of zinc measurement e.g. depression/remission phase, depression diagnosis – treatment resistant/non-resistant,

previous/current pharmacotherapy, duration of illness, gender and dietary variability (Swardfager et al. 2013a, b; Siwek et al. 2013; Nowak 2015).

The mechanisms of the antidepressant activity of zinc may be connected with its influence (modulation) of the neuro, immuno and/or oxidative systems [see (Szewczyk et al. 2011; Siwek et al. 2013; Nowak 2015; Maurya et al. 2016; Tyszką-Czochara et al. 2014) for review].

The obtained results from the presented study confirm the correlation between zinc deficit present in the depressive episode, and are consistent with majority of previous studies. The presented results indicate that zinc blood concentration might be a biological marker of MDD. Nevertheless the zinc level in the course of MDD data still remain ambiguous and should be examined on a bigger populations of depressed patients to widen the knowledge on the role of zinc in the pathophysiology of MDD.

**Acknowledgments** This study was partially supported by a grant no. POIG.01.01.02-12-004/09-00 (Task 3.2) financed by the European Regional Development Fund and Funds for the Statutory Activity of the Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Krakow, Poland.

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

## References

- Amani R, Saeidi S, Nazari Z, Nematpour S (2010) Correlation between dietary zinc intakes and its serum levels with depression scales in young, female students. *Biol Trace Elem Res* 137:150–158
- Bonaventura P, Benedetti G, Albarède F, Miossec P (2015) Zinc and its role in immunity and inflammation. *Autoimmun Rev* 14:277–285
- Chen N, Moshaver A, Raymond LA (1997) Differential sensitivity of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor subtypes to zinc inhibition. *Mol Pharmacol* 51:1015–1023

- Frederickson CJ (1989) Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *Int Rev Neurobiol* 31:145–238
- Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, Frederickson CJ, Thompson RB (2000) Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *J Nutr* 130:1471S–1483S
- Gapys B, Raszeja-Specht A, Bielarczyk H (2014) Role of zinc in physiological and pathological processes of the body. *Diagn Lab* 50:45–52
- Grabrucker AM (2014) A role for synaptic zinc in ProSAP/shank PSD scaffold malformation in autism spectrum disorders. *Dev Neurobiol* 74:136–146
- Gronli O, Kvamme JM, Friberg O, Wynn R (2013) Zinc deficiency is common in several psychiatric disorders. *PLoS One* 8:e82793
- Hamilton M (1960) A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 23:56–62
- Hansen CR, Malecha M, Mackenzie TB, Kroll J (1983) Copper and zinc deficiencies in association with depression and neurological findings. *Biol Psychiatry* 18:395–401
- Irmisch G, Schlaefke D, Richter J (2010) Zinc and fatty acids in depression. *Neurochem Res* 35:1376–1383
- Jurowski K, Szewczyk B, Nowak G, Piekoszewski W (2014) Biological consequences of zinc deficiency in the pathomechanisms of selected diseases. *J Biol Inorg Chem* 19:1069–1079
- Kalappa BL, Anderson CT, Goldberg JM, Lippard SJ, Tzounopoulos T (2015) AMPA receptor inhibition by synaptically released zinc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:15749–15754
- Lai J, Moxey A, Nowak K, Vashum K, Bailey K, McEvoy M (2012) The efficacy of zinc supplementation in depression: systematic review of randomised controlled trials. *J Affect Disord* 136:e31–e39
- Lehto SM, Rusanen A, Tolmunen T, Voutilainen S, Tuomainen TP, Kauhanen J (2013) Dietary zinc intake and the risk of depression in middle-aged men, a 20-year prospective follow-up study. *J Affect Disord* 150:682–685
- Little KY, Castellanos X, Humphries LL, Austin J (1989) Altered Zn metabolism in mood disorder patients. *Biol Psychiatry* 26:646–648
- Maes M, D'Haese PC, Scharpe S, D'Hondt P, Cosyns P, De Broe E (1994) Hypozincemia in depression. *J Affect Disord* 31:135–140
- Maes M, Vandoolaeghe E, Neels H, Demedts P, Wauters A, Meltzer HY, Altamura C, Desnyder R (1997) Lower serum zinc in major depression is a sensitive marker of treatment resistance and of the immune, inflammatory response in that illness. *Biol Psychiatry* 42:349–358
- Maes M, De Vos N, Demedts P, Wauters A, Neels H (1999) Lower serum zinc in major depression in relation to changes in serum acute phase proteins. *J Affect Disord* 56:189–194
- Manser WW, Khan MA, Hasan KZ (1989) Trace elements studies on Karachi population, part IV, blood Cu, Zn, Mg and Pb levels in psychiatric patients with depression, mental retardation and seizure disorders. *J Pak Med Assoc* 39:269–274
- Marchetti C (2014) Interaction of metal ions with neurotransmitter receptors and potential role in neurodegenerative diseases. *Biometals* 27:1097–1113
- Maret W, Sandstead HH (2006) Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *J Trace Elem Med Biol* 20:3–18
- Maserejian NN, Hall SA, McKinlay JB (2012) Low dietary or supplemental zinc is associated with depression symptoms among women, but not men, a population-based epidemiological survey. *J Affect Disord* 136:781–788
- Maurya PK, Noto C, Rizzo LB, Rios AC, Nunes SO, Darbosa DS, Sethi S, Zeni M, Mansur RB, Maes M, Brietzke E (2016) The role of oxidative and nitrosative stress in accelerated aging and major depressive disorder. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 65:134–144
- McLoughlin IJ, Hodge SJ (1990) Zinc in depressive disorder. *Acta Psychiatr Scand* 82:451–453
- Mlyniec K (2015) Zinc in the glutamatergic theory of depression. *Curr Neuropharmacol* 13:505–513
- Montgomery SA, Asberg M (1979) A new depression scale designed to be sensitive to change. *Br J Psychiatry* 134:382–389
- Narang RL, Gupta KR, Narang AP, Singh R (1991) Levels of copper and zinc in depression. *Indian J Physiol Pharmacol* 35:272–274
- Nguyen P, Grajeda R, Melgar P, Marcinkevage J, DiGirolamo AM, Flores R, Martorell R (2009) Micronutrient supplementation may reduce symptoms of depression in Guatemalan women. *Arch Latinoam Nutr* 59:278–286
- Nowak G (2015) Zinc, future mono/adjunctive therapy for depression: mechanisms of antidepressant action. *Pharmacol Rep* 67:659–662
- Nowak G, Siwek M, Dudek D, Zieba A, Pilc A (2003) Effect of zinc supplementation on antidepressant therapy in unipolar depression: a preliminary placebo-controlled study. *Pol J Pharmacol* 55:1143–1147
- Nowak G, Szewczyk B, Pilc A (2005) Zinc and depression. An update. *Pharmacol Rep* 57:713–718
- Paoletti P, Vergnano M, Barbour B, Casado M (2009) Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience* 158:126–136
- Ranjbar E, Kaseaei MS, Mohammad-Shirazi M, Nasrollahzadeh J, Rashidkhani B, Shams J, Mostafavi SS, Mohammadi MR (2013) Effects of zinc supplementation in patients with major depression, a randomized clinical trial. *Iran J Psychiatry* 8:73–79
- Roomruangwong C, Kanchanatawan B, Sirivichayakul S, Mahieu B, Nowak G, Maes M (2016) Lower serum zinc and higher CRP strongly predict prenatal depression and physio-somatic symptoms, which all together predict prenatal depressive symptoms. *Mol Neurobiol*. doi:10.1007/s12035-016-9741-5
- Roosbeh J, Sharifian M, Ghanizadeh A (2011) Association of Zn deficiency and depression in the patients with end-stage renal disease in hemodialysis. *J Ren Nutr* 21:184–187
- Russo AJ (2011) Analysis of plasma zinc and copper concentration, and perceived symptoms, in individuals with depression, post zinc and antioxidant therapy. *Nutr Metab Insights* 17:19–27
- Salari S, Khomand P, Arasteh M, Yousefzamani B, Hassanzadeh K (2015) Zinc sulphate: a reasonable choice for depression management in patients with multiple sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Pharmacol Rep* 67:606–609
- Salimi S, Kianpoor M, Abassi MR, Abdani M, Moghaddam ES (2008) Lower total serum protein, albumin and zinc in depression in an Iranian population. *J Med Sci* 8:587–590
- Salustri C, Squitti R, Zappasodi F, Ventriglia M, Bevacqua MG, Fontana M, Tecchio F (2010) Oxidative stress and brain glutamate-mediated excitability in depressed patients. *J Affect Disord* 127:321–325.
- Satała G, Duszyńska B, Stachowicz K, Rafał A, Pochwat B, Luckhart C, Albert PR, Daigle M, Tanaka KF, Hen R, Lenda T, Nowak G, Bojarski AJ, Szewczyk B (2015) Concentration-Dependent Dual Mode of Zn Action at Serotonin 5-HT<sub>1A</sub> Receptors: In Vitro and In Vivo Studies. *Mol Neurobiol*. doi:10.1007/s12035-015-9586-3
- Schlegel-Zawadzka M, Zieba A, Dudek D, Krosniak M, Szymaczek M, Nowak G (2000) Effect of depression and of antidepressant therapy on serum zinc levels—a preliminary clinical study. In: Roussel AM, Anderson RA, Favrier AE (eds) *Trace elements in man and animals* 10. Kluwer Academic Plenum Press, New York, pp. 607–610
- Siwek M, Dudek D, Paul IA, Sowa-Kućma M, Zieba A, Popik P, Pilc A, Nowa KG (2009) Zinc supplementation augments efficacy of imipramine in treatment resistant patients: a double blind, placebo-controlled study. *J Affect Disord* 118:187–195
- Siwek M, Dudek D, Schlegel-Zawadzka M, Morawska A, Piekoszewski W, Opoka W, Zieba A, Pilc A, Popik P, Nowak G (2010) Serum zinc levels in depressed patients during zinc supplementation of imipramine treatment. *J Affect Disord* 126:447–452
- Siwek M, Szewczyk B, Dudek D, Styczeń K, Sowa-Kućma M, Młyniec K, Siwek A, Witkowski L, Pochwat B, Nowak G (2013) Zinc as a marker of affective disorders. *Pharmacol Rep* 65:1512–1518.
- Siwek M, Styczeń K, Sowa-Kućma M, et al. (2015) The serum concentration of magnesium as a potential state marker in patients with diagnosis of bipolar disorder. *Psychiatr Pol* 49:1277–1287

- Siwek M, Sowa-Kucma M, Styczen K, Misztak P, Szewczyk B, Topór-Madry R, Nowak G, Dudek D, Rybakowski JK (2016a) Thiobarbituric acid-reactive substances: markers of an acute episode and a late stage of bipolar disorder. *Neuropsychobiology* 73:116–122
- Siwek M, Sowa-Kućma M, Styczeń K, Szewczyk B, Reczyński W, Misztak P, Topór-Mądry R, Nowak G, Dudek D, Rybakowski JK (2016b) Decreased serum zinc concentration during depressive episode in patients with bipolar disorder. *J Affect Disord* 190:272–277
- Solati Z, Jazayeri S, Tehrani-Doost M, Mahmoodianfard S, Gohari MR (2015) Zinc monotherapy increases serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels and decreases depressive symptoms in overweight or obese subjects: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Nutr Neurosci* 18:162–168.
- Stanley PC, Wakwe VC (2002) Toxic trace metals in the mentally ill patients. *Niger Postgrad Med J* 9:199–204
- Styczeń K, Siwek M, Sowa-Kućma M, et al. (2015) The serum magnesium concentration as a potential state marker in patients with unipolar affective disorder. *Psychiatr Pol* 49:1265–1276
- Swardfäger W, Herrman N, Mazereeuw G, Goldberger K, Harimoto T, Lanctôt KL (2013a) Zinc in depression: a meta-analysis. *Biol Psychiatry* 74:872–878
- Swardfäger W, Herrmann N, McIntyre RS, Mazereeuw G, Goldberger K, Cha DS, Schwartz Y, Lanctôt KL (2013b) Potential roles of zinc in the pathophysiology and treatment of major depressive disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 37:911–929
- Szewczyk B, Kubera M, Nowak G (2011) The role of zinc in neurodegenerative inflammatory pathways in depression. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 35:693–701
- Szewczyk B, Pałucha-Poniewiera A, Poleszak E, Pilc A, Nowak G (2012) Investigational NMDA receptor modulators for depression. *Expert Opin Investig Drug* 21:91–102
- Tyszka-Czochara M, Grzywacz A, Gdula-Argasińska J, Librowski T, Wiliński B, Opoka W (2014) The role of zinc in the pathogenesis and treatment of central nervous system (CNS) diseases. Implications of zinc homeostasis for proper CNS function. *Acta Pol Pharm* 71:369–377
- Veran J, Kumar J, Pinheiro PS, Athané A, Mayer ML, Perrais D, Mülle C (2012) Zinc potentiates GluK3 glutamate receptor function by stabilizing the ligand binding domain dimer interface. *Neuron* 76:565–578
- Wójcik J, Dudek D, Schlegel-Zawadzka M (2006) Antepartum, postpartum depressive symptoms and serum Zn and Mg levels. *Pharmacol Rep* 58:571–576
- Yu X, Ren T, Yu X (2013) Disruption of calmodulin-dependent protein kinase II  $\alpha$ /brain-derived neurotrophic factor ( $\alpha$ -CaMKII/BDNF) signalling is associated with zinc deficiency-induced impairments in cognitive and synaptic plasticity. *Br J Nutr* 110:2194–2200

## Stężenie cynku i miedzi nie różnicuje choroby afektywnej dwubiegunowej i jednobiegunowej

### Zinc and copper concentration do not differentiate bipolar disorder from major depressive disorder

Krzysztof Styczeń<sup>1</sup>, Magdalena Sowa-Kućma<sup>2</sup>, Dominika Dudek<sup>1</sup>,  
Marcin Siwek<sup>1</sup>, Witold Reczyński<sup>3</sup>, Bernadeta Szewczyk<sup>2</sup>,  
Paulina Misztak<sup>2,6</sup>, Roman Topór-Mądry<sup>5</sup>, Włodzimierz Opoka<sup>4</sup>,  
Gabriel Nowak<sup>2,6</sup>

<sup>1</sup>Zakład Zaburzeń Afektywnych, Katedra Psychiatrii UJ CM

<sup>2</sup>Pracownia Neurobiologii Pierwiastków Śladowych, Instytut Farmakologii PAN

<sup>3</sup>Katedra Chemii Analitycznej, Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie

<sup>4</sup>Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, UJ CM

<sup>5</sup>Zakład Epidemiologii i Badań Populacyjnych Instytutu Zdrowia Publicznego, UJ CM

<sup>6</sup>Katedra Farmakobiologii, UJ CM

#### Summary

**Aim.** The aim of this study was to compare the zinc and copper concentration in the group of patients with bipolar disorder (BD) and major depressive disorder (MDD).

**Method.** 110 patients with the diagnosis of BD and 114 with MDD were qualified to the study. To assess the levels of microelements, the flame atomic absorption spectrometry (FAAS) was used in the case of zinc and the electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) was used in the case of copper.

**Results.** There were no differences between concentration of zinc and copper in remission and depressive phase between patients with BD and MDD. Additionally, there were also no statistically significant differences in comparisons including type I and II, early or late phase of BD and MDD.

**Conclusions.** The lack of differences in zinc and copper concentrations between patients with bipolar disorder and major depressive disorder might indicate that those disorders have similar etiology.

**Słowa kluczowe:** cynk, miedź, choroby afektywne, biomarkery

**Key words:** zinc, copper, affective disorders, biomarkers

## Wstęp

Pierwiastki śladowe, w tym cynk i miedź, i ich rola w organizmie ludzkim od wielu dekad są obiektem badań klinicznych [1, 2]. W organizmie odgrywają one kluczowe role w wielu procesach fizjologicznych niezbędnych dla życia i prawidłowego rozwoju, a zaburzenia ich stężenia lub metabolizmu mogą prowadzić do powstania poważnych zaburzeń metabolicznych czy chorób, w tym psychiatrycznych [3–7]. Wiele z procesów fizjologicznych, w których uczestniczą cynk i miedź, uważa się za kluczowe w etiologii zaburzeń psychicznych. Wśród tych procesów wymienia się m.in.: neurogenezę, synaptogenezę, wzrost neuronów, neurotransmisję sygnału, procesy poznawcze, uczenia się i pamięci [8,9], działanie receptorów NMDA, AMPA, GABA, kainowych czy receptorów glicynowych [10], modulację metabolizmu katecholamin [11, 12], procesy antyoksydacyjne [11, 13–15], a także uczestnictwo w regulacji funkcji układu odpornościowego [2, 11, 12, 16]. Dodatkowo oba te mikroelementy wchodzą w skład licznych enzymów, które uczestniczą bezpośrednio lub pośrednio w procesach fizjologicznych łączonych z etiologią zaburzeń afektywnych, a przede wszystkim – enzymów zaangażowanych w procesy antyoksydacyjne (oksydazę lizylową oraz dysmutazę nadtlenkową) [2, 3, 17]. Szczegółowy opis roli tych dwóch pierwiastków znacznie wybiega poza zakres tego artykułu i został umieszczony w innych pracach autorów [18–22].

Diagnostyka różnicowa pomiędzy chorobą afektywną dwubiegunową (*Bipolar Disorder* – BD) a jednobiegunową (*Major Depressive Disorder* – MDD) jest sporym wyzwaniem dla klinicystów ze względu na możliwość wystąpienia bardzo podobnego obrazu klinicznego epizodów depresyjnych w obu chorobach [23, 24]. Spośród wszystkich zaburzeń psychicznych BD najczęściej mylona jest z MDD [25, 26] i zgodnie z wynikami jednego z badań współczynnik konwersji diagnozy z MDD do BD u badanych pacjentów wynosił aż 32,8%. Zmiana diagnozy u tych pacjentów następowała nawet po wielu latach od pojawienia się pierwszych objawów depresyjnych [25]. Dane te wskazują, że grupa pacjentów z nierozpoznaną BD przez wiele lat może otrzymywać nieprawidłowe leczenie i może być błędnie klasyfikowana jako grupa lekooporna [25]. Jest to jeden z najistotniejszych problemów klinicznych w leczeniu zaburzeń afektywnych. Zidentyfikowanie markerów biologicznych różnicujących BD i MDD w znaczący sposób ułatwiłoby diagnostykę chorób afektywnych oraz umożliwiłoby wczesne zastosowanie odpowiedniego leczenia [27, 28].

## Cel

Celem niniejszej pracy było porównanie stężeń cynku i miedzi pomiędzy grupą pacjentów z rozpoznaniem BD i MDD oraz ocena ich związku z charakterystyką zaburzeń afektywnych.

## Metodyka

### Miejsce prowadzenia badania

Do grupy badanej rekrutowani byli pacjenci spośród osób hospitalizowanych na oddziale stacjonarnym Kliniki Psychiatrii Dorosłych Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie oraz spośród osób leczonych w przyklinicznym ambulatorium. Kwalifikację pacjentów prowadzono w okresie od 21.09.2009 do 30.07.2013 roku.

### Rekrutacja uczestników badania

Rekrutację uczestników prowadzili doświadczeni lekarze psychiatry. Pacjenci włączeni do badania spełniali kryteria diagnostyczne MDD oraz BD według DSM-IV-TR (bez względu na fazę chorób). Wszyscy uczestnicy wyrazili świadomą zgodę na udział w badaniu. Ponadto przed włączeniem do badania każda z osób uzyskała od lekarza psychiatry szczegółową informację (w formie ustnej oraz pisemnej) o celach i zasadach przeprowadzanego badania, z możliwością zadawania pytań. Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej UJ.

Podstawowymi kryteriami wykluczenia z badania były m.in.: brak zgody na przeprowadzenie badania; rozpoznanie poważnego zaburzenia psychicznego innego niż MDD lub BD (np. schizofrenia, psychoza schizoafektywna) lub zaburzeń związanych z nadużywaniem substancji psychoaktywnych (z wyjątkiem uzależnienia od nikotyny lub kofeiny); współwystępowanie poważnych chorób somatycznych (ostrych lub przewlekłych); występowanie głębokich zaburzeń osobowości; karmienie piersią lub ciąża. Uczestnicy zakwalifikowani do badania przyjmowali leki o udowodnionej skuteczności w terapii MDD oraz BD, które były stosowane adekwatnie do obrazu klinicznego choroby oraz zgodnie z obecnymi standardami (w monoterapii lub w celu potencjalizacji leczenia – w terapii łączonej).

Charakterystykę socjodemograficzną i kliniczną, a także szczegółowe kryteria rekrutacji badanej populacji (z uwzględnieniem stosowanej farmakoterapii) przedstawiono w innych pracach autorów [29, 30].

### Narzędzia diagnostyczne

U pacjentów oceniano nasilenie objawów depresyjnych za pomocą skali depresji Montgomery'ego-Åsberg (*Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale – MADRS*) [31] oraz skali depresji Hamiltona (*Hamilton Depression Rating Scale – HDRS*) [32]. Natomiast nasilenie objawów maniakałnych badano z zastosowaniem skali manii Younga (*The Young Mania Rating Scale – YMRS*) [33].

Pobieranie i przygotowywanie materiału do badań. Pomiar poszczególnych stężeń mikroelementów w surowicy krwi

Zgodnie z protokołem badania u każdej z zakwalifikowanych do badania osób pobrano maksymalnie 9,8 ml krwi żyłnej z użyciem zamkniętego systemu Monovette.



Po powstaniu skrzepu próbki odwirowywano przez 30 minut z prędkością 1800 RPM. Uzyskaną surowicę przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do momentu rozpoczęcia zaplanowanych analiz.

Po rozmrożeniu i dokładnym wymieszaniu próbek przeprowadzono analizę ilościową z wykorzystaniem metody płomieniowej atomowej spektrometrii absorpcyjnej (*Flame Atomic Absorption Spectrometry* – FAAS) do analizy  $\text{Zn}^{2+}$  lub metody elektrotermicznej atomowej spektrometrii absorpcyjnej (*Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry* – ET AAS) do analizy  $\text{Cu}^{2+}$ . W oznaczeniach stosowano spektrometr firmy Perkin Elmer Model 3110 (USA), płomień acetylen-powietrze, lampę HCL oraz spektrometr firmy Perkin Elmer AA Model 3110 (USA) wyposażony w piec grafitowy Perkin Elmer HGA-600. Temperatura obróbki wstępnej wynosiła  $950^{\circ}\text{C}$ , a procesu atomizacji  $2300^{\circ}\text{C}$ . Długość fali przy oznaczaniu stężeń wynosiła: dla cynku 213,9 nm oraz dla miedzi 324,8 nm. Szerokość szczeliny dla obu mikroelementów wynosiła 0,7 nm. Oznaczenie każdej próbki wykonano w trzech powtórzeniach. Dokładność pomiarów określano za pomocą analizy odzysku. Dla pomiarów stężeń cynku wynosiła ona 94–99%, dla miedzi – 96–103%.

#### Metody statystyczne

Do analizy rozkładu normalnego danych ilościowych zastosowano test Shapiro–Wilka. Ze względu na brak rozkładu normalnego danych ilościowych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Kruskala–Wallisa lub test *U* Manna–Whitneya.

### Wyniki

Do grupy badanej włączono 224 pacjentów. Grupa pacjentów z rozpoznaniem BD liczyła 110 osób, natomiast w grupie pacjentów z rozpoznaniem MDD znajdowało się 114 osób. Szczegółowe informacje na temat grupy badawczej umieszczone są w innych pracach autorów [29, 30].

Porównanie stężenia cynku w epizodzie depresyjnym pomiędzy grupą pacjentów z rozpoznaniem BD (BD typu I i II) oraz MDD nie wykazało istotnych statystycznych różnic ( $p = 0,50$ ; Test *U* Manna–Whitneya). Na potrzeby analizy statystycznej do grupy BD typu II włączono zarówno pacjentów z rozpoznaniem BD typu II, jak i pacjentów z rozpoznaniem BD nieokreślonych (*BD not otherwise specified* – BD NOS). Brak różnic istotnych pod względem statystycznym przyniosła również analiza stężenia miedzi w epizodzie depresyjnym pomiędzy pacjentami z BD (BD typu I i II) i MDD ( $p = 0,82$ ; Test *U* Manna–Whitneya). W przypadku analizy stężeń cynku w okresie remisji pomiędzy pacjentami z BD (BD typu I i II) i MDD ( $p = 0,32$ ; Test *U* Manna–Whitneya) oraz stężeń miedzi w tych samych grupach pacjentów ( $p = 0,86$ ; Test *U* Manna–Whitneya) nie wykazano istotnych statystycznie różnic. Szczegółowe wyniki przedstawiono w tabeli 4.

Przeprowadzona analiza ANOVA rang Kruskala–Wallisa nie wykazała istotnych statystycznie różnic w zakresie stężenia cynku w epizodzie depresji pomiędzy następującymi grupami: BD typu I, II i MDD ( $p = 0,17$ ); pacjentów we wczesnej i późnej fazie BD oraz MDD ( $H = 1,07$ ;  $p = 0,59$ ). Nie wykazano również różnic w stężeniu cynku w remisji,

porównując grupy pacjentów we wczesnej i późnej fazie BD oraz MDD ( $H = 5,24; p = 0,07$ ). W przypadku analizy ANOVA rang Kruskala–Wallisa stężeń miedzi w epizodzie depresyjnym również nie wykazano różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupami BD typu I, II i MDD ( $p = 0,76$ ) oraz pomiędzy grupami pacjentów we wczesnej i późnej fazie BD oraz MDD ( $H = 0,80; p = 0,67$ ). W analizie wariancji stężenia miedzi w remisji w grupach BD typu I, II i MDD ( $p = 0,52$ ) oraz grupach pacjentów we wczesnej i późnej fazie BD oraz MDD ( $H = 0,97; p = 0,61$ ) nie wykazano istotnych statystycznie różnic.

Szczegółowe zestawienie wyników analizy stężeń mikroelementów pomiędzy grupami BD typu I, II i MDD umieszczono w tabelach 2 i 3. Natomiast szczegółowe informacje na temat odnotowanych stężeń mikroelementów w poszczególnych podgrupach i epizodach choroby umieszczono w tabeli 1.

Tabela 1. Stężenia cynku i miedzi w epizodzie depresyjnym u pacjentów z BD i MDD

Pacjenci	Epizody	
	Depresja	Remisja
MDD		
Miedź – mediana (dolny/górny kwartył)	0,83 (0,58/1,00)	0,85 (0,70/0,96)
Cynk – mediana (dolny/górny kwartył)	0,88 (0,78/1,01)	0,97 (0,77/1,09)
BD (BD typu I oraz II)		
Miedź – mediana (dolny/górny kwartył)	0,79 (0,64/1,00)	0,83 (0,66/1,00)
Cynk – mediana (dolny/górny kwartył)	0,83 (0,69/1,03)	1,01 (0,82/1,18)
BD typu I		
Miedź – mediana (dolny/górny kwartył)	0,84 (0,65/1,07)	0,81 (0,61/0,95)
Cynk – mediana (dolny/górny kwartył)	0,79 (0,68/0,88)	0,91 (0,80/1,08)
BD typu II		
Miedź – mediana (dolny/górny kwartył)	0,77 (0,60/0,96)	0,85 (0,75/1,07)
Cynk – mediana (dolny/górny kwartył)	0,89 (0,74/1,04)	1,16 (0,91/1,94)

Tabela 2. Porównanie stężeń cynku w poszczególnych fazach pomiędzy BD typu I, typu II oraz MDD

Stężenie cynku w fazie remisji	Test Kruskala–Wallisa: $H = 6,44; p = 0,04$ Poniżej umieszczono wartości $p$ dla poszczególnych porównań.		
	BP typu I	BP typu II	MDD
BP typu I	x	0,78	1,00
BP typu II	0,78	X	1,00
MDD	1,00	1,00	x
Stężenie cynku w fazie depresji	Test Kruskala–Wallisa: $H = 3,52; p = 0,17$ Poniżej umieszczono wartości $p$ dla poszczególnych porównań.		
	BP typu I	BP typu II	MDD

dalszy ciąg tabeli na następnej stronie



BP typu I	x	0,24	0,27
BP typu II	0,24	X	1,00
MDD	0,27	1,00	x

Tabela 3. Porównanie stężeń miedzi w poszczególnych fazach pomiędzy BD typu I, typu II oraz MDD

Stężenie miedzi w fazie remisji	Test Kruskala–Wallisa: $H = 1,30$ ; $p = 0,52$ Poniżej umieszczono wartości $p$ dla poszczególnych porównań.		
	BP typu I	BP typu II	MDD
BP typu I	x	0,78	1,00
BP typu II	0,78	X	1,00
MDD	1,00	1,00	x
Stężenie miedzi w fazie depresji	Test Kruskala–Wallisa: $H = 0,55$ ; $p = 0,76$ Poniżej umieszczono wartości $p$ dla poszczególnych porównań.		
	BP typu I	BP typu II	MDD
BP typu I	x	1,00	1,00
BP typu II	1,00	X	1,00
MDD	1,00	1,00	x

Tabela 4. Porównanie stężeń miedzi i cynku pomiędzy grupą pacjentów z rozpoznaniem BD i MDD

	Faza remisji	Faza depresji
Zmienna:	Test $U$ Manna–Whitneya	Test $U$ Manna–Whitneya
Stężenie cynku	$p = 0,32$ ( $U = 970,5$ ; $Z = 0,99$ )	$p = 0,5$ ( $U = 1809,0$ ; $Z = -0,68$ )
Stężenie miedzi	$p = 0,86$ ( $U = 1033,0$ ; $Z = 0,18$ )	$p = 0,82$ ( $U = 1996,0$ ; $Z = -0,22$ )

## Dyskusja

Uzyskane przez autorów wyniki porównania BD i MDD odpowiednio w fazie depresji i remisji wykazały brak różnic w stężeniu zarówno miedzi, jak i cynku pomiędzy badanymi grupami pacjentów. Pomimo odmiennego obrazu klinicznego porównywanych chorób i ich przebiegu uważa się, że przyczyna tych zaburzeń afektywnych może mieć wspólne podłoże. Wielu badaczy wskazuje, że stan zapalny oraz stres oksydacyjny i nitrozacyjny mogą być – poza kwestiami genetycznymi – najistotniejszymi procesami odpowiedzialnymi za powstawanie chorób afektywnych [34–38]. Jony miedzi oraz jony cynku są niezbędnymi elementami w tych procesach [2, 3, 11, 13].

W poprzednich pracach autorów niniejszego artykułu porównanie stężenia miedzi pomiędzy grupami pacjentów z BD i zdrowych ochotników oraz pacjentów z MDD

i zdrowych ochotników nie wykazało różnic w stężeniu miedzi [20, 22], co pozostawało w zgodności z wynikami uzyskanymi przez inną grupę badaczy [16]. Jednak istnieją nieliczne badania kliniczne, w których zaobserwowano zwiększone stężenia miedzi w chorobach afektywnych [5, 39].

Odmierna sytuacja występuje w przypadku porównań stężeń cynku. Poprzednie prace autorów powyższego artykułu wykazały, że zarówno u pacjentów z BD typu I, jak i u pacjentów z MDD stężenia cynku były istotnie niższe niż w grupach zdrowych ochotników [19, 21]. Uzyskane wyniki pozostawały zgodne z dotychczasowymi doniesieniami klinicznymi innych badaczy [11, 40–42].

Podsumowując uzyskane wyniki, można stwierdzić, że zarówno stężenie cynku, jak i miedzi nie różnicuje BD i MDD. Jednak brak różnic w tym zakresie może wskazywać na wspólną genezę tych zaburzeń, co wymaga dalszych badań.

Do ograniczeń przedstawianego badania należy zaliczyć: brak prospektywnego modelu oceniającego dynamikę zmian stężeń badanych mikroelementów u tych samych pacjentów w obu populacjach klinicznych, stosowanie odmiennego leczenia farmakologicznego w porównywanych grupach badawczych oraz brak możliwości oszacowania wpływu powyższych czynników na uzyskane wyniki. Jednak należy zwrócić uwagę, że badanie zostało przeprowadzone na dużej grupie pacjentów z rozpoznaniem BD oraz MDD.

## Piśmiennictwo

1. Schlegel-Zawadzka M. *Cynk: źródła, biodostępność, metabolizm, preparaty cynku*. W: Nowak G. red. *Cynk w fizjologii oraz patofizjologii i terapii depresji*. Kraków; 2001. s. 7–26.
2. Młyniec K, Gaweł M, Doboszewska U, Starowicz G, Pytka K, Davies CL i wsp. *Essential elements in depression and anxiety. Part II*. *Pharmacol. Rep.* 2015; 67(2): 187–194. Doi:10.1016/j.pharep.2014.09.009.
3. Frederickson ChJ. *Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons*. *Int. Rev. Neurobiol.* 1989; 31: 145–238.
4. Sullivan JF, Blotcky AJ, Jetton MM, Hahn HK, Burch RE. *Serum levels of selenium, calcium, copper, magnesium, manganese and zinc in various human diseases*. *J. Nutr.* 1979; 109(8): 1432–1437.
5. Narang RL, Gupta KR, Narang AP, Singh R. *Levels of copper and zinc in depression*. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 1991; 35: 272–274.
6. Mustak MS, Rao TS, Shanmugavelu P, Sundar NM, Menon RB, Rao RV i wsp. *Assessment of serum macro and trace element homeostasis and the complexity of inter-element relations in bipolar mood disorders*. *Clin. Chim. Acta.* 2008; 394(1–2): 47–53. Doi: 10.1016/j.cca.2008.04.003.
7. Naylor GJ, Smith AH, Bryce-Smith D, Ward NI. *Trace elements in manic depressive psychosis*. *J. Affect. Disord.* 1985; 8(2): 131–136.
8. Maret W, Sandstead HH. *Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation*. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2006; 20(1): 3–18.
9. Nowak G. *Zinc, future mono/adjunctive therapy for depression: Mechanisms of antidepressant action*. *Pharmacol. Rep.* 2015; 67(3): 659–662. Doi: 10.1016/j.pharep.2015.01.015.

10. Szewczyk B. *Zinc homeostasis and neurogenerative disorders*. *Front. Aging Neurosci.* 2013; 5: 33. Doi: 10.3389/fnagi.2013.00033.
11. Maes M, Vandoolaeghe E, Neels H, Demedts P, Wauters A, Meltzer HY i wsp. *Lower serum zinc in major depression is a sensitive marker of treatment resistance and of the immune/inflammatory response in that illness*. *Biol. Psychiatry.* 1997; 42: 349–358.
12. Schlegel-Zawadzka M, Zięba A, Dudek D, Krośniak M, Szymaczek M, Nowak G. *Serum trace elements in animal models and human depression. Part II. Copper*. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* 1999; 14: 447–451.
13. Salgueiro MJ, Zubillaga M, Lysionek A, Sarabia MI, Caro R, De Paoli T i wsp. *Zinc as an essential micronutrient: A review*. *Nutr. Res.* 2000; 20(5): 737–755.
14. Maserejian NN, Hall SA, McKinlay JB. *Low dietary or supplemental zinc is associated with depression symptoms among women, but not men, a population-based epidemiological survey*. *J. Affect. Disord.* 2012; 136(3): 781–788. Doi: 10.1016/j.jad.2011.09.039.
15. Collins JF, Klevay LM. *Copper*. *Adv. Nutr.* 2011; 2(6): 520–522. Doi: 10.3945/an.111.001222.
16. Gonzalez-Estecha M, Trasobares EM, Tajima K, Cano S, Fernandez C, Lopez JL i wsp. *Trace elements in bipolar disorder*. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2011; 25(Suppl. 1): S78–83. Doi: 10.1016/j.jtemb.2010.10.015.
17. Gałecki P, Kędziora J, Florkowski A, Gałecka E. *Peroksydacja lipidów i aktywność cynkowo-miedzowej dysmutazy ponadtlenkowej u osób leczonych fluoksetyną z powodu pierwszego epizodu depresji*. *Psychiatr. Pol.* 2007; 41: 615–624.
18. Siwek M, Szewczyk B, Dudek D, Styczeń K, Sowa-Kućma M, Młyniec K i wsp. *Zinc as a marker of affective disorders*. *Pharmacol. Rep.* 2013; 65(6): 1512–1518.
19. Siwek M, Sowa-Kućma M, Styczeń K, Szewczyk B, Reczyński W, Misztak P i wsp. *Decreased serum zinc concentration during depressive episode in patients with bipolar disorder*. *J. Affect. Disord.* 2016; 190: 272–277. Doi: 10.1016/j.jad.2015.10.026.
20. Styczeń K, Sowa-Kućma M, Siwek M, Dudek D, Reczyński W, Misztak P i wsp. *Study of the serum copper levels in patients with major depressive disorder*. *Biol. Trace Elem. Res.* 2016; 174(2): 287–293.
21. Styczeń K, Sowa-Kućma M, Siwek M, Dudek D, Reczyński W, Szewczyk B i wsp. *The serum zinc concentration as a potential biological marker in patients with major depressive disorder*. *Metab. Brain Dis.* 2017; 32(1): 97–103. Doi: 10.1007/s11011-016-9888-9.
22. Siwek M, Styczeń K, Sowa-Kućma M, Dudek D, Reczyński W, Szewczyk B i wsp. *The serum concentration of copper in bipolar disorder*. *Psychiatr. Pol.* 2017; 51(3): 469–481. Doi: 10.12740/PP/OnlineFirst/65250.
23. Siwek M, Dudek D, Rybakowski JK, Łojko D, Pawłowski T, Kiejna A. *Mood disorder questionnaire – characteristic and indications*. *Psychiatr. Pol.* 2009; 43(3): 287–299.
24. Kiejna A, Rymaszewska J, Hadrys T, Suwalska A, Łojko D, Rybakowski JK. *Bipolar or unipolar? – the question for clinicians and researchers*. *J. Affect. Disord.* 2006; 93 (1–3): 177–183.
25. Dudek D, Siwek M, Zielińska D, Jaeschke R, Rybakowski J. *Diagnostic conversion from major depressive disorder into bipolar disorder in an outpatient setting: Results of a retrospective chart review*. *J. Affect. Disord.* 2013; 144(1–2): 112–115. Doi: 10.1016/j.jad.2012.06.014.
26. Rybakowski JK, Suwalska A, Łojko D, Rymaszewska J, Kiejna A. *Types of depression more frequent in bipolar than in unipolar affective illness: Results of the Polish DEP-BI study*. *Psychopathology.* 2007; 40(3): 153–158.
27. Kalia M, Costa E, Silva J. *Biomarkers of psychiatric disease: Current status and future prospects*. *Metabolism.* 2015; 64(3)(Suppl. 1): S11–115. Doi: 10.1016/j.metabol.2014.10.026.

28. Kraemer HC, Schultz SK, Arndt S. *Biomarkers in psychiatry: Methodological issues*. Am. J. Geriatr. Psychiatry. 2002; 10(6): 653–659.
29. Sowa-Kućma M, Styczeń K, Siwek M, Misztak P, Nowak RJ, Dudek D. i wsp. *Are there differences in lipid peroxidation and immune biomarkers between major depression and bipolar disorder: Effects of melancholia, atypical depression, severity of illness, episode number, suicidal ideation and prior suicide attempts*. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2017; pii: S0278-5846(17)30474-8. Doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.08.024. Epub ahead of print
30. Siwek M, Sowa-Kućma M, Styczeń K, Misztak P, Nowak RJ, Szewczyk B i wsp. *Associations of serum cytokine receptor levels with melancholia, staging of illness, depressive and manic phases, and severity of depression in bipolar disorder*. Mol. Neurobiol. 2017; 54(8): 5883–5893.
31. Montgomery SA, Asberg M. *A new depression scale designed to be sensitive to change*. Br. J. Psychiatry. 1979; 134: 382–389.
32. Hamilton M. *A rating scale for depression*. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 1960; 23: 56–62.
33. Young RC, Biggs JT, Ziegler VE, Meyer DA. *A rating scale for mania: Reliability, validity and sensitivity*. Br. J. Psychiatry. 1978; 133: 429–435.
34. Furtado M, Katzman MA. *Examining the role of neuroinflammation in major depression*. Psychiatry Res. 2015; 229(1–2): 27–36. Doi: 10.1016/j.psychres.2015.06.009.
35. Maes M. *Evidence for an immune response in major depression: A review and hypothesis*. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 1995; 19(1): 11–38.
36. Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M. *A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to (neuro)degenerative processes in that illness*. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2011; 35(3): 676–692. Doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.05.004.
37. Moylan S, Berk M, Dean OM, Samuni Y, Williams LJ, O’Neil A i wsp. *Oxidative & nitrosative stress in depression: Why so much stress?* Neurosci. Biobehav. Rev. 2014; 45: 46–62. Doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.05.007.
38. Siwek M, Sowa-Kućma M, Dudek D, Styczeń K, Szewczyk B, Kotarska K i wsp. *Oxidative stress markers in affective disorders*. Pharmacol. Rep. 2013; 65: 1558–1571.
39. Manser WW, Khan MA, Hasan KZ. *Trace element studies on Karachi population. Part IV: Blood copper, zinc, magnesium and lead levels in psychiatric patients with depression, mental retardation and seizure disorders*. J. Pak. Med. Assoc. 1989; 39: 269–274.
40. McLoughlin IJ, Hodge SJ. *Zinc in depressive disorder*. Acta Psychiatr. Scand. 1990; 82: 451–453.
41. Schlegel-Zawadzka M, Zieba A, Dudek D, Krosniak M, Szymaczek M, Nowak G. *Effect of depression and of antidepressant therapy on serum zinc levels – a preliminary clinical study*. W: Roussel AM, Anderson RA, Favrier AE. red. *Trace elements in man and animals 10*. New York; Kluwer Academic Plenum Press; 2000. s. 607–610.
42. Stanley PC, Wakwe VC. *Toxic trace metals in the mentally ill patients*. Niger. Postgrad. Med. J. 2002; 9: 199–204.

Adres: Krzysztof Styczeń  
Zakład Zaburzeń Afektywnych, Katedra Psychiatrii UJ CM  
31-501 Kraków, ul. Kopernika 21a

Otrzymano: 11.10.2017  
Zrecenzowano: 3.11.2017  
Otrzymano po poprawie: 8.11.2017  
Przyjęto do druku: 9.11.2017



Kraków dnia 03.01.2018r

prof. dr hab. Gabriel Nowak

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor prac pt.:

1. "The serum zinc concentration as a potential biological marker in patients with major depressive disorder"; autorzy: Krzysztof Styczeń, Magdalena Sowa-Kućma, Marcin Siwek, Dominika Dudek, Witold Reczyński, Bernadeta Szewczyk, Paulina Misztak, Roman Topór-Mądry, Włodzimierz Opoka, Gabriel Nowak, opublikowanej w czasopiśmie *Metabolic Brain Disease (Metab Brain Dis.* 2017 Feb;32(1):97-103. doi: 10.1007/s11011-016-9888-9. Epub 2016 Aug 8).

2. "Study of the serum Cu levels in patients with major depressive disorder"; autorzy: Krzysztof Styczeń, Magdalena Sowa-Kućma, Marcin Siwek, Dominika Dudek, Witold Reczyński, Paulina Misztak, Bernadeta Szewczyk, Roman Topór-Mądry, Włodzimierz Opoka, Gabriel Nowak, opublikowanej w *Biological Trace Element Research* (2016 Dec;174(2):287-293. Epub 2016 May 5).

3. "Stężenie cynku i miedzi nie różnicuje choroby afektywnej dwubiegunowej i jednobiegunowej"; autorzy: Krzysztof Styczeń, Magdalena Sowa-Kućma, Dominika Dudek, Marcin Siwek, Witold Reczyński, Bernadeta Szewczyk, Paulina Misztak, Roman Topór-Mądry, Włodzimierz Opoka, Gabriel Nowak, opublikowanej w czasopiśmie *Psychiatria Polska (Online First nr 85:1-9, 15 December 2017, DOI: https://doi.org/10.12740/PP/OnlineFirst/80069).*

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie prac w formie publikacji to opracowywanie koncepcji badania klinicznego, opieka merytoryczna nad badaniem oraz pomoc w redagowaniu manuskryptów.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w prac przez lek. Krzysztofa Stycznia jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. prac wykazuje indywidualny wkład lek. Krzysztofa Stycznia przy opracowywaniu koncepcji badania, wykonywaniu części eksperymentalnej (rekrutacja do badania), opracowaniu i interpretacji wyników tych prac, przygotowywanie tekstów poszczególnych artykułów.

.....  
prof. dr hab. Gabriel Nowak





Kraków dnia 27.12.2017

Dr hab. Bernadeta Szewczyk

## OŚWIADCZENIE

Jako współautorka prac pt.:

1. "The serum zinc concentration as a potential biological marker in patients with major depressive disorder"; autorzy: Krzysztof Styczeń, Magdalena Sowa-Kućma, Marcin Siwek, Dominika Dudek, Witold Reczyński, Bernadeta Szewczyk, Paulina Misztak, Roman Topór-Mądry, Włodzimierz Opoka, Gabriel Nowak, opublikowanej w czasopiśmie *Metabolic Brain Disease* (*Metab Brain Dis.* 2017 Feb;32(1):97-103. doi: 10.1007/s11011-016-9888-9. Epub 2016 Aug 8).
2. "Study of the serum Cu levels in patients with major depressive disorder"; autorzy: Krzysztof Styczeń, Magdalena Sowa-Kućma, Marcin Siwek, Dominika Dudek, Witold Reczyński, Paulina Misztak, Bernadeta Szewczyk, Roman Topór-Mądry, Włodzimierz Opoka, Gabriel Nowak, opublikowanej w *Biological Trace Element Research* (2016 Dec;174(2):287-293. Epub 2016 May 5).
3. "Stężenie cynku i miedzi nie różnicuje choroby afektywnej dwubiegunowej i jednobiegunowej"; autorzy: Krzysztof Styczeń, Magdalena Sowa-Kućma, Dominika Dudek, Marcin Siwek, Witold Reczyński, Bernadeta Szewczyk, Paulina Misztak, Roman Topór-Mądry, Włodzimierz Opoka, Gabriel Nowak, opublikowanej w czasopiśmie *Psychiatria Polska* (Online First nr 85:1-9, 15 December 2017, DOI: <https://doi.org/10.12740/PP/OnlineFirst/80069>).

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie prac w formie publikacji to przygotowanie materiału do analizy ilościowej oraz opis uzyskanych wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w prac przez lek. Krzysztofa Stycznia jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. prac wykazuje indywidualny wkład lek. Krzysztofa Stycznia przy opracowywaniu koncepcji badania, wykonywaniu części eksperymentalnej (rekrutacja do badania), opracowaniu i interpretacji wyników tych prac, przygotowywanie tekstów poszczególnych artykułów.

.....  
dr hab. Bernadeta Szewczyk

**Mgr Paulina Misztak**

## OŚWIADCZENIE

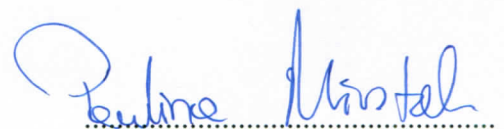
Jako współautorka prac pt.:

1. "The serum zinc concentration as a potential biological marker in patients with major depressive disorder"; autorzy: Krzysztof Styczeń, Magdalena Sowa-Kućma, Marcin Siwek, Dominika Dudek, Witold Reczyński, Bernadeta Szewczyk, Paulina Misztak, Roman Topór-Mądry, Włodzimierz Opoka, Gabriel Nowak, opublikowanej w czasopiśmie Metabolic Brain Disease (Metab Brain Dis. 2017 Feb;32(1):97-103. doi: 10.1007/s11011-016-9888-9. Epub 2016 Aug 8).
2. "Study of the serum Cu levels in patients with major depressive disorder"; autorzy: Krzysztof Styczeń, Magdalena Sowa-Kućma, Marcin Siwek, Dominika Dudek, Witold Reczyński, Paulina Misztak, Bernadeta Szewczyk, Roman Topór-Mądry, Włodzimierz Opoka, Gabriel Nowak, opublikowanej w Biological Trace Element Research (2016 Dec;174(2):287-293. Epub 2016 May 5).
3. "Stężenie cynku i miedzi nie różnicuje choroby afektywnej dwubiegunowej i jednobiegunowej"; autorzy: Krzysztof Styczeń, Magdalena Sowa-Kućma, Dominika Dudek, Marcin Siwek, Witold Reczyński, Bernadeta Szewczyk, Paulina Misztak, Roman Topór-Mądry, Włodzimierz Opoka, Gabriel Nowak, opublikowanej w czasopiśmie Psychiatria Polska (Online First nr 85:1-9, 15 December 2017, DOI: <https://doi.org/10.12740/PP/OnlineFirst/80069>).

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie prac w formie publikacji to przygotowanie materiału do analizy ilościowej oraz opis uzyskanych wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w prac przez lek. Krzysztofa Stycznia jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. prac wykazuje indywidualny wkład lek. Krzysztofa Stycznia przy opracowywaniu koncepcji badania, wykonywaniu części eksperymentalnej (rekrutacja do badania), opracowaniu i interpretacji wyników tych prac, przygotowywanie tekstów poszczególnych artykułów.



(podpis współautora)



Kraków, dnia 04.01.2018r.

Prof. dr hab. n. med. Dominika Dudek  
Zakład Zaburzeń Afektywnych  
Katedra Psychiatrii CM UJ, Kraków

## OŚWIADCZENIE

Jako współautorka prac pt.:

1. "The serum zinc concentration as a potential biological marker in patients with major depressive disorder"; autorzy: Krzysztof Styczeń, Magdalena Sowa-Kućma, Marcin Siwek, Dominika Dudek, Witold Reczyński, Bernadeta Szewczyk, Paulina Misztak, Roman Topór-Mądry, Włodzimierz Opoka, Gabriel Nowak, opublikowanej w czasopiśmie *Metabolic Brain Disease* (*Metab Brain Dis.* 2017 Feb;32(1):97-103. doi: 10.1007/s11011-016-9888-9. Epub 2016 Aug 8).
2. "Study of the serum Cu levels in patients with major depressive disorder"; autorzy: Krzysztof Styczeń, Magdalena Sowa-Kućma, Marcin Siwek, Dominika Dudek, Witold Reczyński, Paulina Misztak, Bernadeta Szewczyk, Roman Topór-Mądry, Włodzimierz Opoka, Gabriel Nowak, opublikowanej w *Biological Trace Element Research* (2016 Dec;174(2):287-293. Epub 2016 May 5).
3. "Stężenie cynku i miedzi nie różnicuje choroby afektywnej dwubiegunowej i jednobiegunowej"; autorzy: Krzysztof Styczeń, Magdalena Sowa-Kućma, Dominika Dudek, Marcin Siwek, Witold Reczyński, Bernadeta Szewczyk, Paulina Misztak, Roman Topór-Mądry, Włodzimierz Opoka, Gabriel Nowak, opublikowanej w czasopiśmie *Psychiatria Polska* (Online First nr 85:1-9, 15 December 2017, DOI: <https://doi.org/10.12740/PP/OnlineFirst/80069>).

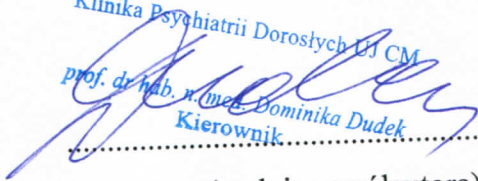
oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie prac w formie publikacji to opracowywanie koncepcji badania klinicznego, wstępna kwalifikacja pacjentów do badania, opieka merytoryczna nad badaniem oraz pomoc w redagowaniu manuskryptów.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w prac przez lek. Krzysztofa Stycznia jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.



Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. prac wykazuje indywidualny wkład lek. Krzysztofa Stycznia przy opracowywaniu koncepcji badania, wykonywaniu części eksperymentalnej (rekrutacja do badania), opracowaniu i interpretacji wyników tych prac, przygotowywanie tekstów poszczególnych artykułów.

Klinika Psychiatrii Dorosłych UJ CM  
prof. dr hab. n. med. Dominika Dudek  
Kierownik



(podpis współautora)

Kraków, dnia 04.01.2018r.

Dr hab n. med. Marcin Siwek  
Zakład Zaburzeń Afektywnych  
Katedra Psychiatrii CM UJ, Kraków

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor prac pt.:

1. "The serum zinc concentration as a potential biological marker in patients with major depressive disorder"; autorzy: Krzysztof Styczeń, Magdalena Sowa-Kućma, Marcin Siwek, Dominika Dudek, Witold Reczyński, Bernadeta Szewczyk, Paulina Misztak, Roman Topór-Mądry, Włodzimierz Opoka, Gabriel Nowak, opublikowanej w czasopiśmie *Metabolic Brain Disease* (*Metab Brain Dis.* 2017 Feb;32(1):97-103. doi: 10.1007/s11011-016-9888-9. Epub 2016 Aug 8).
2. "Study of the serum Cu levels in patients with major depressive disorder"; autorzy: Krzysztof Styczeń, Magdalena Sowa-Kućma, Marcin Siwek, Dominika Dudek, Witold Reczyński, Paulina Misztak, Bernadeta Szewczyk, Roman Topór-Mądry, Włodzimierz Opoka, Gabriel Nowak, opublikowanej w *Biological Trace Element Research* (2016 Dec;174(2):287-293. Epub 2016 May 5).
3. "Stężenie cynku i miedzi nie różnicuje choroby afektywnej dwubiegunowej i jednobiegunowej"; autorzy: Krzysztof Styczeń, Magdalena Sowa-Kućma, Dominika Dudek, Marcin Siwek, Witold Reczyński, Bernadeta Szewczyk, Paulina Misztak, Roman Topór-Mądry, Włodzimierz Opoka, Gabriel Nowak, opublikowanej w czasopiśmie *Psychiatria Polska* (Online First nr 85:1-9, 15 December 2017, DOI: <https://doi.org/10.12740/PP/OnlineFirst/80069>).

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie prac w formie publikacji to wstępna kwalifikacja pacjentów do badania, współtworzenie analizy statystycznej oraz pomoc w redagowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w prac przez lek. Krzysztofa Stycznia jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. prac wykazuje indywidualny wkład lek. Krzysztofa Stycznia przy opracowywaniu koncepcji badania, wykonywaniu części eksperymentalnej (rekrutacja do badania), opracowaniu i interpretacji wyników tych prac, przygotowywanie tekstów poszczególnych artykułów.

Dr hab. n. med. MARCIN SIWEK  
specjalista psychiatra  
2695415

.....  
(podpis współautora)

## 12.1. WYKAZ SKRÓTÓW

MDD – *major depressive disorder* – zaburzenia depresyjne nawracające

BD – *bipolar disorder* – choroba afektywna dwubiegunowa

DSM – *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* – Klasyfikacja Zaburzeń Psychicznych Amerykańskiego Towarzystwa Psychiatrycznego

ICD – *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems* – Międzynarodowa Klasyfikacja Zaburzeń Psychicznych i Zaburzeń Zachowania

HPA – *hypothalamic–pituitary–adrenal* – oś hormonalna podwzgórze–przysadka–nadnercza

IL – *interleukin* – interleukina

TNF $\alpha$  – *tumor necrosis factor alpha* – czynnik martwicy guza alfa

CRP – *C-Reactive Protein* – białko ostrej fazy

MDA – *Malondialdehyde* – malondialdehyd

8-OHdG – *8-hydroxy-2'-deoxyguanosine* – 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna

SOD – *SuperOxide dismutase* – dysmutaza ponadtlenkowa

TNFsR1 – *tumor necrosis factor soluble receptor* – rozpuszczalny receptor czynnika martwiczego nowotworu 1

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

BDNF – *Brain-Derived Neurotrophic Factor* – neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego

NT – *neurotrophin* – neurotrofina

NGF – *nerve growth factor* – czynnik wzrostu nerwów

GABA – *gamma-aminobutyric acid* – kwas  $\gamma$ -aminomasłowy

NMDA – *N-Methyl-D-aspartic acid* – kwas N-metylo-D-asparaginowy

ROS – *reactive oxygen species* – reaktywne formy tlenu

DNA – *deoxyribonucleic acid* – kwas deoksyrybonukleinowy

RNS – *reactive nitrogen species* – reaktywnych form azotu

RNA – *ribonucleic acid* – kwas rybonukleinowy

AMPA – *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* – kwas α-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-isoksazolepropionowy

GSK – *glycogen synthase kinase* – kinaza syntazy glikogenu

ZCNs – *zinc containing neurons* – neurony zawierające cynk

SSRIs – *selective serotonin reuptake inhibitors* – selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny

SNRIs – *selective serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors* – selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny

TCA – *tricyclic antidepressants* – trójcykliczne leki przeciwdepresyjne

MADRS – *Montgomery-Asberg Depression Rating Scale* – skala depresji Montgomery-Asberg

HDRS – *Hamilton Rating Scale for Depression* – skala depresji Hamiltona

BDI – *Beck Depression Inventory* – inwentarz depresji Becka

YMRS – *Young Mania Rating Scale* – skala manii Young'a

FAAS – *flame atomic absorption spectrometry* – metoda płomieniowej atomowej spektrometrii absorpcyjnej

BD NOS – *bipolar disorder not otherwise specified* – choroba afektywna dwubiegunowa nie określona