

ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA B-64.VN LÊN CÁC CHỈ SỐ SINH HÓA VÀ MÔ BỆNH HỌC ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM

PGS.TS. NGUYỄN HOÀNG NGÂN
ThS. VŨ NGỌC THẮNG, TS. NGUYỄN THANH HÀ TUẤN
Học viện Quân y
TS. VƯƠNG VĂN TRƯỜNG, TS. PHẠM DUY NAM
Trung tâm Nhiệt đới Việt-Nga
ThS. NGUYỄN CẨM THẠCH - Bệnh viện TƯQĐ108
Phản biện khoa học: PGS.TS. VŨ XUÂN NGHĨA
Phó Chủ nhiệm Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y

TÓM TẮT: *Mục tiêu:* Nghiên cứu ảnh hưởng của B-64.VN khi dùng tái sinh không khí trong buồng kín lên các chỉ số sinh hóa và hình ảnh mô bệnh học của động vật thực nghiệm. *Phương pháp:* Chuột nhắt trắng được nhốt trong buồng kín trong thời gian 10 ngày, 20 ngày và 30 ngày, hô hấp nhờ sự tái sinh không khí của tấm B-64.VN. Đánh giá các chỉ số sinh hóa máu và hình ảnh mô bệnh học gan, lách, thận, não, phổi chuột. So sánh giữa các lô chuột dùng B-64.VN trong buồng kín với lô chứng trong buồng hở. *Kết quả:* Không có sự khác biệt về các chỉ số sinh hóa máu (gồm AST, ALT, bilirubin toàn phần, creatinin và albumin huyết tương) giữa chuột các lô nghiên cứu so với lô chứng. Hình ảnh mô bệnh học của gan, lách, thận, não, phổi chuột các lô nghiên cứu và lô chứng đều không có bất thường. *Kết luận:* B-64.VN dùng tái sinh không khí trong buồng kín không gây ảnh hưởng đến các chỉ số sinh hóa máu và hình ảnh mô bệnh học gan, lách, thận, não, phổi của động vật thực nghiệm.

Từ khóa: B-64.VN, sinh hóa máu, hình ảnh mô bệnh học.

ABSTRACT: *Object:* Study the effect of B-64.VN when used to regenerate air in closed chamber on the serum biochemistry indexes, and histopathological images of experimental animals. *Method:* Swiss mice were housed in closed chamber during 10, 20 and 30 days, respiration due to air regeneration of B-64.VN. Evaluation of the serum biochemistry indexes and histopathological images of liver, spleen, kidney, brain and lung. Comparison of B-64.VN groups in the closed chamber with control group in the open chamber. *Results:* There was no statistically significant differences between B-64.VN groups compared to control group in the serum biochemistry indexes include AST, ALT, total bilirubin, creatinin and albumin. Histopathological images of the liver, spleen, kidneys, brain, lung were normal.

Keywords: B-64.VN, serum biochemistry, histopathological images.

Chịu trách nhiệm nội dung: PGS.TS. Nguyễn Hoàng Ngân, Email: nguyenhoangnganth@yahoo.com.vn

Ngày nhận bài: 16/7/2018; mời phản biện khoa học: 25/7/2018; chấp nhận đăng: 02/10/2018.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Tái sinh không khí có ý nghĩa vô cùng quan trọng cho nhu cầu hô hấp của người lao động trong các môi trường kín, biệt lập, đặc biệt là hoạt động tác chiến của thủy thủ tàu ngầm [2], [6]. Trên thế giới, đã có một số sản phẩm có tác dụng tái sinh không khí được nghiên cứu sản xuất, phân phối và sử dụng. Song, nghiên cứu sản xuất trong nước với chi phí phù hợp, nhằm chủ động cung cấp đầy đủ, kịp thời cho các hoạt động quân sự là yêu cầu cấp thiết. Dựa theo nguyên mẫu tấm tái sinh không khí B-64 (do Liên bang Nga sản xuất), Trung tâm Nhiệt đới Việt-Nga đã nghiên cứu sản xuất tấm B-64.VN có những tính năng, tác dụng tương tự.

Việc đánh giá tính an toàn của sản phẩm trên động vật thực nghiệm là nội dung cần phải tiến hành trước khi sản phẩm có thể được đưa ra đánh giá trên người. Tấm B-64.VN được sử dụng để tái sinh không khí, nhằm cung cấp O_2 và tiêu thụ CO_2

phục vụ cho hô hấp trong không gian kín.

Nghiên cứu này nhằm đánh giá ảnh hưởng của tấm B-64.VN lên các chỉ số sinh hóa và hình ảnh mô bệnh học của động vật thực nghiệm khi dùng để tái sinh không khí trong buồng kín.

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

2.1. Đối tượng và thiết bị nghiên cứu:

- Chất liệu nghiên cứu: tấm tái sinh không khí B-64.VN đạt tiêu chuẩn chất lượng sản phẩm, do Viện Độ bền Nhiệt đới (Trung tâm Nhiệt đới Việt-Nga) sản xuất và cung cấp.

- Động vật nghiên cứu: chuột nhắt trắng, chủng Swiss, cả hai giống, cân nặng trung bình mỗi con $25 \pm 1g$. Chuột do Ban Chăn nuôi động vật thí nghiệm (Học viện Quân y) cung cấp, nuôi dưỡng trong phòng nuôi động vật thí nghiệm ít nhất 1 tuần trước khi thí nghiệm; thức ăn theo tiêu chuẩn thức ăn cho động vật nghiên cứu; uống tự do nước sạch đun sôi để nguội.

- Thiết bị phục vụ nghiên cứu: hệ thống PowerLab (ADI Australia) với các thiết bị ngoại vi; máy Biosystem BTS-350 (Nhật Bản) xét nghiệm các chỉ số hóa sinh; buồng kín 60 lít, thiết kế chuyên biệt dùng cho nghiên cứu trên động vật.

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

- Thời gian nghiên cứu, cách phân lô động vật nghiên cứu và các chỉ tiêu đánh giá tính an toàn của tấm tái sinh không khí trên động vật thực nghiệm được xây dựng theo hướng dẫn của Bộ Y tế Việt Nam [1], khuyến cáo của OECD [5] về đánh giá tính an toàn trên động vật thực nghiệm. Thiết kế buồng nghiên cứu và điều kiện thử nghiệm dựa theo phương pháp của Jordan B. Holquist và cộng sự (2014) [3], [4], có sửa đổi cho phù hợp với mục tiêu nghiên cứu.

- Chuột nhắt trắng đủ tiêu chuẩn thí nghiệm, chia ngẫu nhiên thành 4 lô, mỗi lô 40 con.

+ Lô 1 (lô trị 1): cho 40 chuột vào buồng kín với tấm B-64.VN trong 10 ngày.

+ Lô 2 (lô trị 2): cho 40 chuột vào buồng kín với tấm B-64.VN trong 20 ngày.

+ Lô 3 (lô trị 3): cho 40 chuột vào buồng kín với tấm B-64.VN trong 30 ngày.

+ Lô 4 (lô chứng): cho 40 chuột vào buồng mở, thở không khí tự nhiên.

Sau khi kết thúc thời gian nuôi trong buồng kín, chia ngẫu nhiên chuột từ lô 1 đến lô 3, mỗi lô thành 2 nhóm, mỗi nhóm 20 con. Một nhóm được giết và xác định các chỉ tiêu nghiên cứu ngay khi ra khỏi buồng kín (các nhóm 1a, 2a, 3a); một nhóm được tiếp tục nuôi ở điều kiện bình thường trong thời gian 10 ngày (các nhóm 1b, 2b, 3b), nhằm đánh giá tác dụng hồi phục tổn thương (nếu có), sau đó giết và xác định các chỉ tiêu nghiên cứu. Riêng lô 4

(lô chứng) được lấy ra ngẫu nhiên mỗi lần 10 chuột tại các thời điểm sau 10 ngày, 20 ngày, 30 ngày và 40 ngày để xác định các chỉ tiêu nghiên cứu, hình thành các nhóm 4-1, 4-2, 4-3 và 4-4.

- Trong thiết kế nghiên cứu, lượng chất tái sinh không khí (tấm B-64.VN) được tính toán cung cấp đầy đủ cho chuột trong suốt quá trình thử nghiệm. Để bảo đảm nồng độ các chất khí bên trong buồng kín luôn nằm trong khoảng sinh lý bình thường và giữ ổn định, nồng độ các khí O_2 , CO_2 trong bình được kiểm tra cách ngày (tuân thủ nguyên tắc bảo đảm khí trong bình luôn được giữ kín). Các vụn giấy có độ thấm cao được lót dưới đáy buồng kín để hút hết nước tiểu, nhanh chóng làm khô phân chuột, tránh gây ô nhiễm cho không khí thở trong buồng kín. Cung cấp nước lọc, thức ăn sấy khô đầy đủ và không làm hở khí của bình kín. Như vậy, nếu có bất kỳ tổn thương nào gây ra cho động vật thí nghiệm, tổn thương đó sẽ đến từ việc chuột phải sử dụng O_2 tái sinh từ tấm B-64.VN, không phải do tình trạng thiếu O_2 trong không khí thở gây ra.

- Kết thúc thí nghiệm của mỗi nhóm, giết chuột lấy máu, đánh giá các chỉ số sinh hóa máu (creatinine, AST, ALT, bilirubin toàn phần, albumin) và làm tiêu bản mô bệnh học các tạng gan, lách, thận, phổi, não để đánh giá tổn thương vi thể (đọc tại Bộ môn - Khoa Giải phẫu bệnh - Pháp y, Bệnh viện Quân y 103).

- Xử lý số liệu: các số liệu được trình bày dạng trị số trung bình và độ lệch chuẩn ($Mean \pm SD$), so sánh thống kê bằng ANOVA test trên phần mềm SPSS 16.0. Khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN.

3.1. Ảnh hưởng của B-64.VN đến các chỉ tiêu sinh hóa chuột:

Bảng 1. Ảnh hưởng của B-64.VN đến hoạt độ AST, ALT và nồng độ Bilirubin toàn phần máu chuột.

Nhóm chuột	Hoạt độ AST (UI/l)	Hoạt độ ALT (UI/l)	Bilirubin toàn phần (μmol/l)	p
Thời điểm ngày thứ 10				
Nhóm 4-1 (n = 10) ⁽¹⁾	103,70 ± 10,78	41,47 ± 9,28	97,48 ± 12,53	p ₂₋₁ > 0,05
Nhóm 1a (n = 20) ⁽²⁾	104,74 ± 8,28	38,71 ± 10,78	97,17 ± 32,01	
Thời điểm ngày thứ 20				
Nhóm 4-2 (n = 10) ⁽³⁾	119,67 ± 23,53	42,85 ± 7,09	40,30 ± 4,57	p ₄₋₃ > 0,05
Nhóm 1b (n = 20) ⁽⁴⁾	103,95 ± 10,54	40,74 ± 8,02	39,39 ± 1,25	p ₅₋₄ > 0,05
Nhóm 2a (n = 20) ⁽⁵⁾	109,31 ± 21,72	37,35 ± 10,22	37,27 ± 4,51	p ₅₋₃ > 0,05
Thời điểm ngày thứ 30				
Nhóm 4-3 (n = 10) ⁽⁶⁾	108,91 ± 10,46	41,67 ± 8,54	38,91 ± 3,50	p ₇₋₆ > 0,05
Nhóm 2b (n = 20) ⁽⁷⁾	101,43 ± 10,95	38,26 ± 11,98	39,97 ± 4,31	p ₈₋₆ > 0,05
Nhóm 3a (n = 20) ⁽⁸⁾	119,39 ± 11,44	42,74 ± 8,69	39,32 ± 3,68	p ₈₋₇ > 0,05
Thời điểm ngày thứ 40				
Nhóm 4-4 (n = 10) ⁽⁹⁾	98,56 ± 9,54	37,91 ± 8,19	41,26 ± 5,21	p ₁₀₋₉ > 0,05
Nhóm 3b (n = 20) ⁽¹⁰⁾	104,11 ± 14,35	41,87 ± 9,31	37,99 ± 4,41	

Tại cùng thời điểm, hoạt độ AST, ALT và nồng độ bilirubin toàn phần trong máu chuột ở các nhóm dùng B-64.VN không khác biệt so với ở nhóm chứng ($p > 0,05$). Như vậy, B-64.VN dùng tái sinh không khí cho chuột trong buồng kín trong 10 ngày, 20 ngày và 30 ngày không gây tổn thương tế bào gan.

Bảng 2. Ảnh hưởng của B-64.VN đến albumin huyết tương và nồng độ creatinin máu chuột.

Nhóm chuột	Nồng độ albumin huyết tương (g/L)	Nồng độ creatinin máu (μmol/l)	p
Thời điểm ngày thứ 10			
Nhóm 4-1 (n = 10) ⁽¹⁾	39,30 ± 2,26	79,30 ± 7,27	p ₂₋₁ > 0,05
Nhóm 1a (n = 20) ⁽²⁾	39,10 ± 2,03	82,16 ± 8,53	
Thời điểm ngày thứ 20			
Nhóm 4-2 (n = 10) ⁽³⁾	40,30 ± 4,57	80,36 ± 9,27	p ₄₋₃ > 0,05
Nhóm 1b (n = 20) ⁽⁴⁾	39,39 ± 1,25	89,59 ± 9,09	p ₅₋₄ > 0,05
Nhóm 2a (n = 20) ⁽⁵⁾	37,27 ± 4,51	79,29 ± 8,58	p ₅₋₃ > 0,05
Thời điểm ngày thứ 30			
Nhóm 4-3 (n = 10) ⁽⁶⁾	38,91 ± 3,50	85,29 ± 8,92	p ₇₋₆ > 0,05
Nhóm 2b (n = 20) ⁽⁷⁾	39,97 ± 4,31	83,09 ± 7,96	p ₈₋₆ > 0,05
Nhóm 3a (n = 20) ⁽⁸⁾	39,32 ± 3,68	86,27 ± 9,26	p ₈₋₇ > 0,05
Thời điểm ngày thứ 40			
Nhóm 4-4 (n = 10) ⁽⁹⁾	41,26 ± 5,21	82,24 ± 9,12	p ₁₀₋₉ > 0,05
Nhóm 3b (n = 20) ⁽¹⁰⁾	37,99 ± 4,41	81,96 ± 8,93	

Tại cùng thời điểm, nồng độ albumin huyết tương và nồng độ creatinin máu chuột ở các nhóm dùng B-64.VN không khác biệt so với ở nhóm chứng ($p > 0,05$). Như vậy, B-64.VN dùng tái sinh không khí cho chuột trong buồng kín trong 10 ngày, 20 ngày và 30 ngày không gây ảnh hưởng đến chức năng chuyển hóa albumin của gan và chức năng thải trừ creatinin của thận chuột.

3.2. Ảnh hưởng của B-64.VN đến mô bệnh học tạng chuột thí nghiệm:

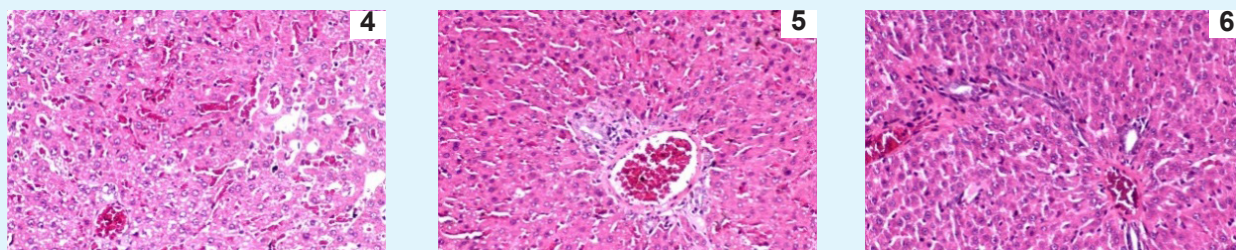
- Hình ảnh đại thể:



Hình ảnh đại thể gan, lách, thận, phổi, não chuột nghiên cứu (hình 1: chuột số 9, nhóm chứng 4-4; hình 2: chuột số 13, nhóm 3a; hình 3: chuột số 5, nhóm 3b).

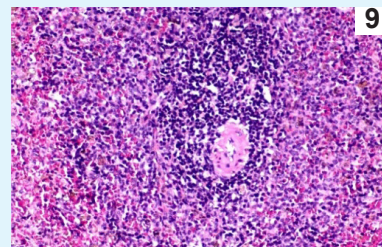
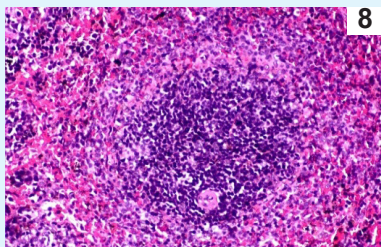
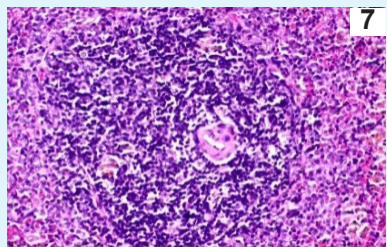
Quan sát bằng mắt thường và dưới kính lúp độ phóng đại 25 lần, thấy hình ảnh đại thể gan, lách, thận, phổi, não của chuột sử dụng tấm tái sinh không khí B-64.VN trong 30 ngày (nhóm 3a - hình 2 và nhóm 3b - hình 3) đều có màu nâu đỏ thẫm đồng đều, bề mặt nhẵn, không có u cục hoặc xuất huyết, đàn hồi khi ấn xuống; không khác biệt so với hình ảnh gan, lách, thận, phổi, não của chuột lô chứng (hình 1). Kết quả này cho phép đánh giá: sử dụng B-64.VN trong thời gian nghiên cứu không gây tổn thương đại thể trên gan, thận, lách, phổi, não của chuột nghiên cứu.

- Hình ảnh vi thể:



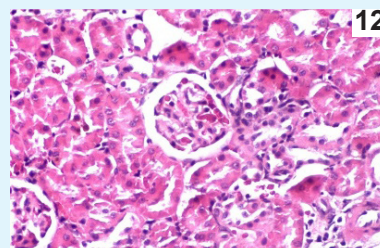
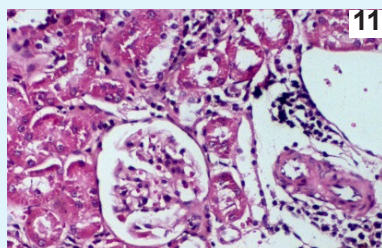
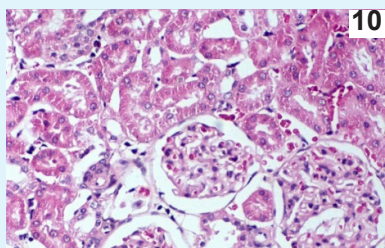
Hình ảnh vi thể gan chuột HE, x 400 (hình 4: chuột số 7, nhóm 4-4; hình 5: chuột số 15, nhóm 3a; hình 6: chuột số 18, nhóm 3b).

+ Dưới kính hiển vi độ khuếch đại 400 lần, thấy hình ảnh gan chuột lô sử dụng tấm tái sinh không khí B-64.VN trong 30 ngày (nhóm 3a - hình 5, nhóm 3b - hình 6) có cấu trúc các bè gan bình thường; không có hình ảnh hoại tử, thoái hóa tế bào gan; không khác biệt so với chuột lô chứng (hình 4).



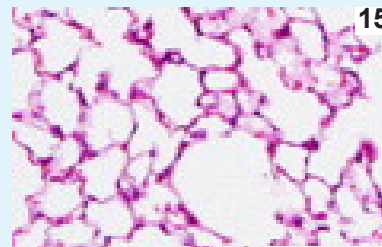
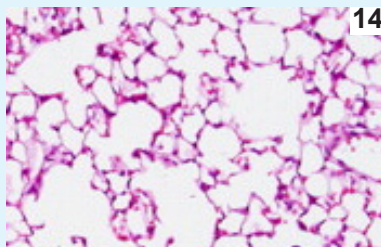
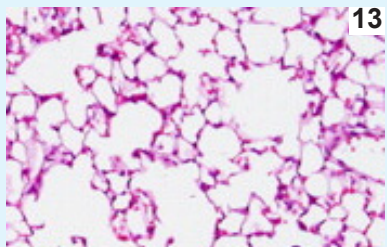
Hình ảnh vi thể lách chuột HE, x 400 (hình 7: chuột số 10, nhóm 4-4; hình 8: chuột số 15, nhóm 3a; hình 9: chuột số 17, nhóm 3b).

+ Dưới kính hiển vi độ khuếch đại 400 lần, thấy hình ảnh lách chuột lô sử dụng tấm tái sinh không khí B-64.VN trong 30 ngày (nhóm 3a - hình 8, nhóm 3b - hình 9) vùng tủy trắng bất màu xanh thẫm, tập trung các nang lympho lớn; vùng tủy đỏ bất màu xanh đỏ, các xoang nang chứa nhiều hồng cầu và một số đại thực bào; không có xuất huyết hoặc hoại tử; không khác biệt so với chuột ở lô chứng (hình 7).



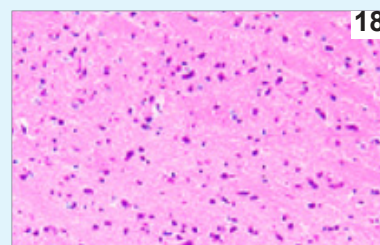
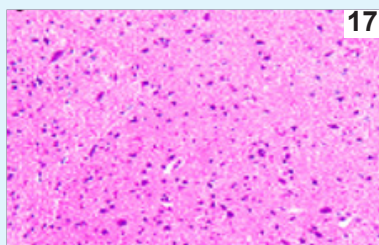
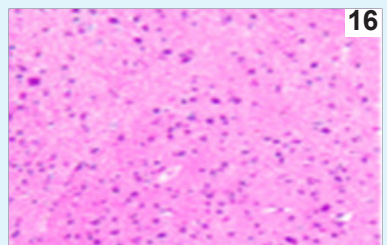
Hình ảnh vi thể thận chuột HE, x 400 (hình 10: chuột số 5, nhóm 4-4; hình 11: chuột số 16, nhóm 3a; hình 12: chuột số 8, nhóm 3b).

+ Dưới kính hiển vi độ khuếch đại 400 lần, thấy hình ảnh thận chuột lô sử dụng tấm tái sinh không khí B-64.VN trong 30 ngày (nhóm 3a - hình 11, nhóm 3b - hình 12) có cấu trúc các tế bào ống thận và các vùng chức năng thận bình thường; không khác biệt so với chuột lô chứng (hình 10).



Hình ảnh vi thể phổi chuột HE, x 400 (hình 13: chuột số 4, nhóm 4-4; hình 14: chuột số 12, nhóm 3a; hình 15: chuột số 2, nhóm 3b).

+ Dưới kính hiển vi độ khuếch đại 400 lần, thấy hình ảnh phổi chuột lô sử dụng tấm tái sinh không khí B-64.VN trong 30 ngày (nhóm 3a - hình 14, nhóm 3b - hình 15) có cấu trúc các lòng phế nang và thành phế quản bình thường; không khác biệt so với chuột ở lô chứng (hình 13).



Hình ảnh vi thể não chuột HE, x 400 (hình 16: chuột số 1, nhóm 4-4; hình 17: chuột số 18, nhóm 3a; hình 18: chuột số 9, nhóm 3b).

+ Dưới kính hiển vi độ khuếch đại 400 lần, thấy hình ảnh thận chuột lô sử dụng tấm tái sinh không khí B-64.VN trong 30 ngày (nhóm 3a - hình 17, nhóm 3b - hình 18) có cấu trúc không khác biệt so với chuột lô chứng (hình 16).

Kết quả này cho phép đánh giá: sử dụng B-64.VN trong thời gian nghiên cứu không gây tổn thương vi thể trên gan, thận, lách, phổi, não của chuột nghiên cứu.

4. KẾT LUẬN.

Nghiên cứu đánh giá tính an toàn của tấm tái sinh không khí B-64.VN trên động vật thực nghiệm theo hướng dẫn của Bộ Y tế Việt Nam và khuyến cáo của OECD về đánh giá tính an toàn trên động vật thực nghiệm, kết quả cho thấy: chuột hô hấp trong buồng kín bằng tấm B-64.VN trong thời gian 10 ngày, 20 ngày và 30 ngày đều không gây ảnh hưởng đến các chỉ số sinh hóa máu (creatinine, AST, ALT, bilirubin TP, albumin), không gây tổn thương trên mô bệnh học các tạng gan, lách, thận, phổi, não của chuột.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Bộ Y tế (2012), *Thông tư số 03/2012/TT-BYT, ngày 02/02/2012, Hướng dẫn về thử thuốc trên lâm sàng.*
2. Vương Văn Trường (2015), *Nghiên cứu khả năng chế tạo tấm tái sinh không khí theo mẫu B-64 sử dụng trên tàu ngầm, Đề tài cấp Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga, Hà Nội, 2015.*
3. Holquist J.B, Klaus D.M, Graf J.C (2014), *Characterization of Potassium Superoxide and a Novel Packed Bed Configuration for Closed Environment Air Revitalization*, 44th International Conference on Environmental Systems, 13-17 July 2014, Tucson, Arizona.
4. Holquist J.B, Koenig P, Tozer S, Williams A.A, Klaus D.M et al (2014), *Atmosphere Regeneration for the Transport of Rodents to and from the ISS - Design Trades and Test Results*, AIAA 43rd international conference on environmental systems, AIAA-2014-3461, AIAA, Vail, CO.
5. OECD (2002), *Drug Safety Evaluation I: Acute and subchronic toxicity assessment*; USA Academy Press.
6. *Средства химической регенерации воздуха* (Tài liệu học tập của sĩ quan hóa học trên tàu ngầm Kilo 636). □

NGHIÊN CỨU MỐI LIÊN QUAN GIỮA NỒNG ĐỘ CORTISOL HUYẾT TƯƠNG...

(Tiếp theo trang 26)

5. KẾT LUẬN.

Nghiên cứu 45 BN trầm cảm chủ yếu, điều trị nội trú tại Khoa Tâm thần, Bệnh viện Quân y 103, từ tháng 10/2017 đến 7/2018, chúng tôi kết luận:

- Điểm trắc nghiệm tâm lí Beck trung bình trước điều trị trên BN trầm cảm chủ yếu mức độ nặng là $39,52 \pm 6,86$ điểm, trầm cảm chủ yếu mức độ trung bình là $25,19 \pm 4,4$ điểm, trầm cảm chủ yếu mức độ nhẹ là $18,50 \pm 1,29$ điểm; khác biệt có ý nghĩa thống kê.

- Nồng độ cortisol huyết tương trung bình trước điều trị trên BN trầm cảm chủ yếu mức độ nặng là $15,3988 \pm 4,6851$ $\mu\text{g/dL}$, trầm cảm chủ yếu mức độ trung bình là $13,3869 \pm 4,6199$ $\mu\text{g/dL}$, trầm cảm chủ yếu mức độ nhẹ là $13,0550 \pm 3,6161$ $\mu\text{g/dL}$; khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

- Nồng độ cortisol huyết tương trung bình trên BN có ý tưởng, hành vi tự sát và BN không có ý tưởng, không có hành vi tự sát khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

- Mối tương quan giữa nồng độ cortisol huyết tương với tuổi, thời gian mắc bệnh không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Có sự tương quan thuận giữa nồng độ cortisol huyết tương với điểm trắc nghiệm tâm lí Beck, khác biệt có ý nghĩa thống kê.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Kessler R.C, Birnbaum H.G, Shahly V, Bromet E, Hwang I et al (2010), "Age differences in the prevalence and co-morbidity of DSM-IV major depressive episodes: results from the WHO World Mental Health Survey Initiative", *Depress, Anxiety*, 27: 351-364.
2. Theodor M, Iosif G.G, Elena B. Getal (2016), "Increased Cortisol Levels in Depression: A Comparative Study Evaluating the Correlation of Hypercortisolemia with Prosocial Coping Mechanisms", *Acta Medica Marisensis*, 62 (1): 68-72.
3. Beck A.T, Steer R.A, Brown G.K (1996), "BDI-II: Beck Depression Inventory Manual 2nd ed. San Antonio, TX", *Psychological Corporation*.
4. Brandon L, Goldstein Greg Perlman, Roman Kotov, Joan E, Broderick, Keke Liu, Camilo Ruggero, Daniel N, Klein (2016), "Etiologic specificity of waking Cortisol: Links with maternal history of depression and anxiety in adolescent girls", *Journal of Affective Disorders*.
5. Nabeta H, Mizoguchi Y, Matsushima J et al (2014), "Association of salivary cortisol levels and later depressive state in elderly people living in a rural community: a 3-year follow-up study", *J. Affect Disord*, Apr, 158: 85-9. □