

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KLARA KRAVOS

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI PROGRAM
LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KLARA KRAVOS

**DOLOČITEV KONCENTRACIJE KORTIZOLA V SLINI S
TANDEMSKO MASNO SPEKTROMETRIJO ZA OPREDELITEV
ODZIVA NA STRES PRI PEDIATRIČNIH BOLNIKI S
SLADKORNO BOLEZNIJO TIPA 1**

**DETERMINATION OF CORTISOL CONCENTRATION IN SALIVA
WITH TANDEM MASS SPECTROMETRY TO EVALUATE STRESS
RESPONSE IN PEDIATRIC PATIENTS WITH TYPE 1 DIABETES**

MAGISTRSKI PROGRAM

LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala v Laboratoriju za specialno laboratorijsko diagnostiko na Pediatrični kliniki, UKC Ljubljana, pod mentorstvom izr. prof. dr. Katarine Trebušak Podkrajšek, univ. dipl. kem., spec. med. biokem., spec. lab. med. gen. in somentorstvom asist. dr. Barbke Repič Lampret, spec. med. biokem.

ZAHVALE

Hvala mentorici izr. prof. dr. Katarini Trebušak Podkrajšek, univ. dipl. kem., spec. med. biokem., spec. lab. med. gen. za strokovno pomoč, nasvete in pregled magistrske naloge.

Hvala somentorici asist. dr. Barbki Repič Lampret, spec. med. biokem. za strokovne nasvete in vodenje skozi laboratorijsko delo ter za vzpodbudo in pomoč pri izdelavi magistrske naloge.

Zahvala gre tudi vsem zaposlenim v laboratoriju za presnovne motnje na Pediatrični kliniki, predvsem Vanji Čuk, Žigu Remcu in Andražu Šmonu za pomoč pri laboratorijskem delu.

Zahvaljujem se tudi vodji laboratorija Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko Mirjani Zupančič mag. med. biokem., da mi je omogočila opravljanje naloge v laboratoriju za presnovne motnje, Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko Pediatrične klinike v Ljubljani.

Zahvaljujem se tudi družini, ki mi je tekom celotnega študija stala ob strani, me vedno podpirala in spodbujala.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom izr. prof. dr. Katarine Trebušak Podkrajšek, univ. dipl. kem., spec. med. biokem., spec. lab. med. gen. in somentorstvom asist. dr. Barbke Repič Lampret, spec. med. biokem. Naloga je del raziskovalnega programa P3-0343 Etiologija, zgodnje odkrivanje in zdravljenje bolezni pri otrocih in mladostnikih pri Agenciji Republike Slovenije za raziskovanje, ki ga vodi prof. dr. Tadej Battelino, dr. med.

Klara Kravos

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	STRES	1
1.1.1	Os hipotalamus-hipofiza-skorja nadledvičnice (HPA os) in stresni odziv.....	1
1.1.2	Vpliv psihosocialnega stresa na delovanje HPA osi	3
1.2	SLADKORNA BOLEZEN TIP A I	5
1.2.1	Vzroki za razvoj SBT1 in možni mehanizmi	5
1.2.2	Vpliv psihosocialnega stresa na razvoj SBT1	6
1.3	MERJENJE STRESNEGA ODZIVA IN KORTIZOL	8
1.3.1	Kortizol v slini otrok	8
1.3.2	Dejavniki, ki vplivajo na vrednosti kortizola v slini otrok	9
1.3.3	Testiranje HPA osi s stimulacijskim testom z analogom ACTH	11
1.4	METODE DOLOČANJA KORTIZOLA V SLINI.....	12
1.4.1	Analitski postopek LC-MS/MS	13
2	NAMEN DELA	15
3	MATERIALI IN METODE	17
3.1	MATERIALI	17
3.1.1	Naprave in pribor.....	17
3.1.2	Raztopine in reagenti	17
3.1.3	Biološki vzorci.....	18
3.2	METODE IN POGOJI MERITEV	20
3.2.1	Priprava vzorcev sline	20
3.2.2	Priprava osnovnih raztopin in premice za preverjanje linearnosti	21
3.2.3	Priprava kontrolnega materiala.....	23
3.2.4	LC-MS/MS pogoji in potek analize vzorcev	24
3.3	STATISTIČNA ANALIZA	29
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	34
4.1	LINEARNOST	34
4.2	NATANČNOST	35

4.3	TOČNOST	37
4.4	RAZMERJE SIGNAL/ŠUM IN MEJA KVANTIFIKACIJE	38
4.5	VPLIV MATRIKSA	39
4.6	KONCENTRACIJE KORTIZOLA V VZORCIH SLINE PREISKOVANCEV. 40	
4.6.1	Osnovna opisna statistika	40
4.6.2	Primerjava starosti in koncentracije kortizola ob času 0' med skupino s SBT1 in kontrolno skupino.....	43
4.6.3	Primerjava koncentracije kortizola ob času 0' in 60' v kontrolni skupini.....	46
4.6.4	Primerjava koncentracije kortizola ob času 0' in 60' v skupini s SBT1.....	48
5	SKLEP	54
6	LITERATURA	57
7	PRILOGE	62

KAZALO SLIK

Slika 1:	Prikaz osi hipotalamus-hipofiza-nadledvična žleza. Privzeto in prirejeno po (5)...	2
Slika 2:	Kemijska struktura kortizola. Privzeto in prirejeno po (22).....	9
Slika 3:	Slikovna navodila za odvzem vzorcev sline s salivetami. Privzeto in prirejeno po (40).	20
Slika 4:	LC-MS/MS aparat (fotografija je bila posneta v presnovnem laboratoriju Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko na Pediatrični kliniki).	24
Slika 5:	Shema analize z LC-MS/MS aparatom.	25
Slika 6:	Preklopni ventil z vezano kolono 1 (črne barve) in kolono 2 (srebrne barve) (fotografija je bila posneta v presnovnem laboratoriju Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko na Pediatrični kliniki).....	26
Slika 7:	Postopek APCI ionizacije (36); S – molekule mobilne faze, SH+ - ionizirane molekule mobilne faze, A – molekule analita, AH+ - ionizirane molekule analita.	26
Slika 8:	Primer kromatograma analize kortizola.	28
Slika 9:	Premica pripravljena v MeOH.....	35
Slika 10:	Premica pripravljena v zlivku sline.	35
Slika 11:	Določitev LOQ na vzorcu raztopine standarda v MeOH s koncentracijo 1 nmol/L. Rdeče puščice nakazujejo označeno območje za določitev S/N signala.	38

Slika 12: Določitev S/N razmerja na realnem vzorcu sline preiskovanca s koncentracijo kortizola 1,31 nmol/L. Rdeči puščici nakazujeta označeno območje za določitev S/N signala.	39
Slika 13: Priprava premice s katero smo opredelili odnos med koncentracijo kortizola in razmerjem odziva analit/IS.	40
Slika 14.A: Histogram prikazuje porazdelitev koncentracij kortizola pred sinaktenskim testom ob času 0'. B: Histogram prikazuje porazdelitev koncentracij kortizola po sinaktenskem testu ob času 60'. C: Histogram prikazuje porazdelitev razlike koncentracije kortizola po in pred sinaktenskim testom (koncentracija 60' - koncentracija 0'). "Mean" – povprečna vrednost, Std. Dev. – standardna deviacija (SD), N – število oseb.	42
Slika 15.A: Histogram prikazuje porazdelitev koncentracij kortizola pred psihološkim testiranjem ob času 0'. B: Histogram prikazuje porazdelitev koncentracij kortizola po psihološkem testiranju ob času 60'. C: Histogram prikazuje porazdelitev razlike koncentracije kortizola po in pred psihološkim testiranjem (koncentracija 60'-koncentracija 0'). "Mean" – povprečna vrednost, Std. Dev. – standardna deviacija (SD), N – število oseb.	43
Slika 16: Kvantilni diagram koncentracij kortizola ob času 0' v kontrolni skupini in skupini s SBT1.	45
Slika 17 : Kvantilni diagram koncentracij kortizola ob času 0' (pred psihološkim testiranjem) in času 60' (po psihološkem testiranju) v kontrolni skupini.	47
Slika 18: Kvantilni diagram koncentracij kortizola ob času 0' (pred psihološkim testiranjem) in času 60' (po psihološkem testiranju) v skupini s SBT1.	49
Slika 19: Korelacija koncentracije kortizola v serumu in slini po sinaktenskem testu.	51
Slika 20: Koncentracija kortizola v serumu po sinaktenskem testu <600 nmol/L in pripadajoče koncentracije kortizola v slini (modri krogi) in koncentracija kortizola v serumu po sinaktenskem testu >=600 nmol/L in pripadajoče koncentracije kortizola v slini (zeleni krogi).	52

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Priprava raztopin standarda za premico v 20 % MeOH.	22
Preglednica II: Priprava raztopin standarda za premico v zlivku sline.	22
Preglednica III: Spreminjanje sestave MF.	25

Preglednica IV: Parametri MS/MS analize.....	27
Preglednica V: Pogoji trojnega kvadrupola za MRM analizo kortizola.	27
Preglednica VI: Primer serije pripravljene za analizo z LC-MS/MS; B – slepi vzorec, K – kontrolni serum, KS – notranja kontrola sline, VZ – vzorec sline	28
Preglednica VII: Koncentracija raztopine standarda in razmerje odzivov (analit/IS) za premico pripravljeno v MeOH.	34
Preglednica VIII: Koncentracija raztopine standarda in razmerje odzivov (analit/IS) za premico pripravljeno v zlivku sline.	34
Preglednica IX: Natančnost metode znotraj dneva.....	36
Preglednica X: Natančnost metode med dnevi.	36
Preglednica XI: Izračun koncentracije standarda s pomočjo premice v zlivku sline in s pomočjo IS. Podano je povprečje in RE izračunanih vrednosti standarda v raztopinah.....	37
Preglednica XII: Podatki o najnižji (c_{\min}), najvišji (c_{\max}) in povprečni (c_{povpr}) koncentraciji kortizola. Podano je povprečje razlike koncentracij kortizola pred in po intervenciji (koncentracija 60' - koncentracija 0') za obe skupini.....	41
Preglednica XIII: Podatki o najnižji (c_{\min}), najvišji (c_{\max}) in povprečni (c_{povpr}) koncentraciji kortizola v krvi in v slini po sinaktenskem testu.	50

POVZETEK

Sladkorna bolezen tipa 1 je kronična bolezen z etiologijo, ki ni popolnoma pojasnjena. Vse pogosteje se omenja vpliv dolgotrajnega psihosocialnega stresa na razvoj ali potek sladkorne bolezni tipa 1. Ob stresu se aktivira os hipotalamus-hipofiza-skorja nadledvičnice, ki regulira stresni odziv z izločanjem kortizola. Kortizol sproži mnogo adaptivnih procesov, s katerimi se v telesu ohranja homeostaza. Pod vplivom dolgotrajnega psihosocialnega stresa pride do neustreznega delovanja in regulacije osi hipotalamus-hipofiza-skorja nadledvičnice in posledično trajno zvišane koncentracije kortizola. Adaptivni procesi postanejo patološki in so lahko vzrok za razvoj sladkorne bolezni tipa 1. Namen magistrske naloge je bil določitev koncentracije kortizola v slini s tandemsko masno spektrometrijo pri pediatričnih bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 1 z namenom opredelitve njihovega odziva na stres.

Uvedli smo metodo določanja koncentracije kortizola v vzorcih sline z metodo tekočinske kromatografije sklopljene s tandemsko masno spektroskopijo in izvedli osnovno verifikacijo metode. Ovrednotili smo linearnost, točnost, natančnost, mejo kvantifikacije in ocenili vpliv matriksa na odziv analiznega inštrumenta. Z metodo tekočinske kromatografije sklopljene s tandemsko masno spektroskopijo smo določili koncentracije kortizola v vzorcih sline, ki so bili vzeti preiskovancem pred intervencijo in po intervenciji. Intervencijo v kontrolni skupini zdravih otrok in mladostnikov predstavlja psihološko testiranje, v skupini otrok in mladostnikov s sladkorno boleznijo tipa 1 pa sinaktenski test. Z izmerjeno koncentracijo kortizola smo opredelili delovanje hipotalamus-hipofiza-skorja nadledvičnice osi in stresni odziv pri zdravih otrocih in mladostnikih ter pri otrocih in mladostnikih s sladkorno boleznijo tipa 1.

Ugotovili smo, da je metoda linearna v koncentracijskem območju do 55,2 nmol/L. Metoda je točna pri višjih koncentracijah kortizola, kjer relativna napaka ne presega 15 %, prav tako je dobro ponovljiva znotraj dneva in med dnevi. Iz razmerja signal/šum smo določili mejo kvantifikacije, ki je 1 nmol/L. Spojine iz matriksa vzorca nimajo vpliva na odziv analitskega inštrumenta. S primerjavo koncentracij kortizola med kontrolno skupino in skupino s sladkorno boleznijo tipa 1 pred intervencijo, smo ugotovili, da imajo otroci in mladostniki s sladkorno boleznijo tipa 1 višje bazalne vrednosti kortizola kot zdravi otroci in mladostniki, kar je lahko posledica nepravilnega delovanja osi hipotalamus-hipofiza-skorja nadledvičnice. Ker je bilo psihološko testiranje pričakovan stres, se je v kontrolni skupini

koncentracija kortizola po psihološkem testiranju znižala. Po sinaktenskem testu v skupini preiskovancev s sladkorno boleznijo tipa 1, pa se je koncentracija kortizola v povprečju zvišala za 25,7 nmol/L. Koncentracije kortizola v slini dobro korelirajo s koncentracijami v krvi, le da so te v slini bistveno nižje.

Ključne besede: psihosocialni stres, stresni odziv, os hipotalamus-hipofiza-skorja nadledvičnice, sladkorna bolezen tipa 1, kortizol v slini

ABSTRACT

Type 1 diabetes is a chronic disease with a largely unknown etiology. It has been suggested that psychosocial stress might be one of the factors which may induce or promote diabetes type 1. During acute stress, activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis results in the release of glucocorticoid hormones, which regulate the stress response. Cortisol induces a number of adaptive responses through which the body maintain homeostasis. On the other hand, chronic psychosocial stress causes incorrect activation and regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Moreover, deregulation of the stress response leads to chronically elevated cortisol concentrations. Adaptive responses become pathological and may lead to type 1 diabetes. In this master's thesis the levels of cortisol in the saliva of pediatric populations was measured in order to define their stress response.

We introduced a method for measurement of salivary cortisol concentrations with liquid chromatography tandem mass spectroscopy. Method was verified by linearity, accuracy, precision, limit of quantification and matrix effect. With liquid chromatography tandem mass spectroscopy salivary cortisol concentrations were measured before and after intervention. Intervention in control group of healthy children and adolescents was psychological testing, intervention in group of children and adolescents with type 1 diabetes was synachten test. Saliva cortisol measurements were used to assess activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and stress response in healthy children and adolescents and in children and adolescents with type 1 diabetes.

We showed that the method is linear up to the concentration of 55,2 nmol/L and accurate at higher cortisol concentrations where relative error does not exceed 15 %. Moreover, the method is repeatable in both intraday and interday intervals. From the signal to noise ratio it was determined that the limit of quantification was 1 nmol/L. Compounds from the sample matrix did not interfere with the analytical instrument response. Cortisol concentrations in the saliva of healthy children and children with type I diabetes were also compared before intervention. Basal saliva cortisol concentrations were higher in the group of children with type 1 diabetes than in control group. This result may be due to the incorrect activation or regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Furthermore, as psychological testing was expected by children in the control group, the added stress resulted in higher salivary cortisol concentration before intervention. In the group of children with type 1 diabetes,

salivary cortisol concentrations were much higher after the synachten test, on average 25,7 nmol/L. The salivary cortisol concentrations were also compared with serum cortisol concentrations. Cortisol concentrations in saliva and serum have a linear relationship, despite significantly lower quantity in the saliva.

Key words: psychosocial stress, stress response, hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA axis), diabetes type 1, salivary cortisol

SEZNAM OKRAJŠAV

11 β -HSD2	11 β -hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 2
ACTH	adenokortikotropni hormon (angl. adrenocorticotropic hormone)
APCI	ionizacija z razprševanjem pri atmosferskem tlaku (angl. atmospheric-pressure chemical ionization)
APPI	fotoionizacija pri atmosferskem tlaku (angl. atmospheric-pressure Photoionisation)
aPt	avtoprotitelesa
CAD	tlak kolizijskega plina (angl. collision gas)
CBG	kortikosteroide vezavni globulin (angl. corticosteroid-binding globulin)
CRFR1	CRH receptor tipa 1 (angl. corticotropin-releasing hormone receptor 1)
CRH	kortikoliberin (angl. corticotropin-releasing hormone)
CUR	tlak razprševalnega plina (angl. curtain gas)
ELISA	encimsko imunske metode (angl. enzyme-linked ImmunoSorbent Assay)
ESI	elektrozprševalna ionizacija (angl. electrospray ionisation)
GADA	avtoprotitelesa proti glutamat dekarboksilazi
GC-MS	plinska kromatografija sklopljena z masnim spektrometrom
GR	glukokortikoidni receptor (angl. glucocorticoid receptor)
GS	tlak ionskega izvora (angl. ion source gas)
HPA os	os hipotalamus-hipofiza-skorja nadledvičnice (angl. hypothalamic pituitary adrenal axis)
IA-2A	avtoprotitelesa proti tirozin fosfatazi (angl. insulinoma-2-associated autoantibodies)
IAA	avtoprotitelesa proti inzulinu (angl. insulin autoantibodies)
ICA	avtoprotitelesa proti β celicam (angl. islet cell antibodies)
IS	interni standard
IT	ionska past (angl. ion trap)
LC	tekočinska kromatografija (angl. liquid chromatography)
LC-MS	tekočinska kromatografija sklopljena z masnim spektrometrom
LC-MS/MS	tekočinska kromatografija sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo
LC-UV	tekočinska kromatografija sklopljena z ultravijolično detekcijo
LLE	ekstrakcija tekoče/tekoče
LOQ	meja kvantifikacije (angl. limit of quantification)
m/z	razmerje med maso in nabojem

MC2-R	ACTH receptor tipa 2 (angl.)
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MHC	poglavitni histokompatibilni kompleks (angl. major histocompatibility complex)
MM	molska masa
MRM	multirezidualna analiza (angl. multiple reaction monitoring)
MS	masna spektroskopija (angl. mass spectroscopy)
MS/MS	tandemski masni spektrometer
NC	napetost nebulizatorja (angl. nebulizer current)
PMK	proste maščobne kisline
PPT	precipitacija proteinov (angl. protein precipitation)
Pt	protitelesa
PVN	paraventrikularno jedro (angl. paraventricular nucleus)
Q	kvadrupol
QQQ	trojni kvadrupolni masni analizator
RE	relativna napaka (angl. relative error)
RIA	radioimunske metode (angl. radioimmunoassay)
RSD	relativna standardna deviacija (angl. relative standard deviation)
S/N	razmerje signal/šum (angl. signal to noise ratio)
SBT1	sladkorna bolezen tipa 1
SD	standardni odklon (angl. standard deviation)
SF	stacionarna faza
SPE	ekstrakcija na trdni fazi (angl. solid phase extraction)
TEM	temperatura (angl. temperature)
Th17	T celice pomagalk
Th2	protitelesni imunski odziv
TOF	masni analizator na osnovi časa preleta (angl. time of flight)
Treg	regulatorne T celice
UP	umeritvena premica

1 UVOD

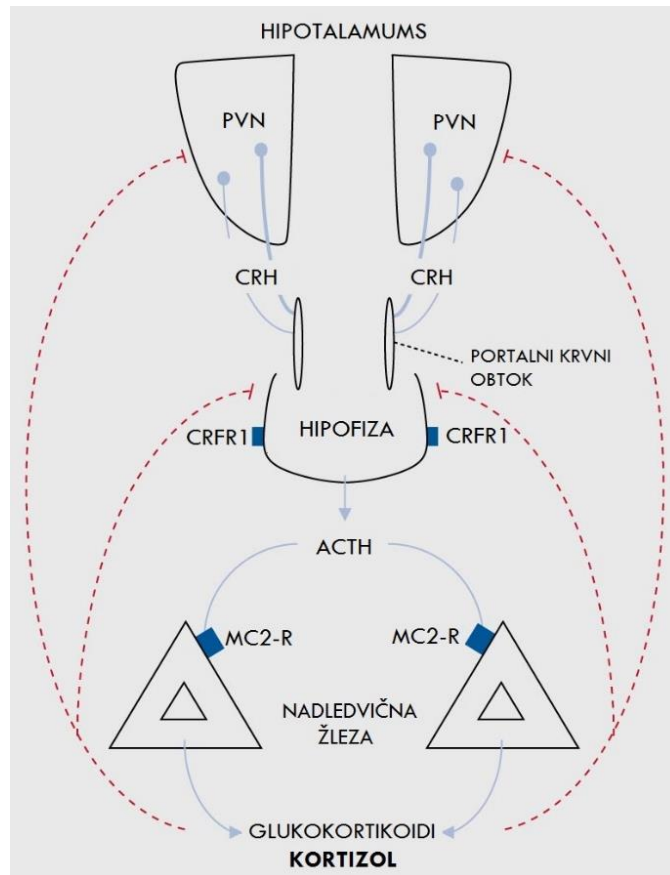
1.1 STRES

Stres je beseda z mnogo konotacijami, pogovorno jo uporabljamo, kadar smo preobremenjeni, bodisi zaradi pomanjkanja časa ali prevelike količine dela (1). V biologiji in medicini pa stres predstavlja vsaka sprememba v okolju ali organizmu, ki potencialno ali dejansko vpliva na homeostazo telesa (2).

Telo se na vsakodnevne zahteve iz okolja odzove z izločanjem kortizola in drugih stresnih hormonov z namenom, da pripravi organizem na t.i. odziv "boj ali beg" (1). Gre za stereotipni obrambni odziv, ki se kaže predvsem preko kardiovaskularnih in presnovnih učinkov. Možgani usmerijo pozornost na dejavnik, ki je bil v organizmu zaznan kot grožnja. Poveča se frekvenca srčnega utripa in moč kontrakcije srčne mišice (3), pospešijo se katabolni procesi in posledično se poveča sproščanje glukoze iz jeter in prostih maščobnih kislin iz maščevja (4). Vsi naštetih fiziološki učinki povzročijo v telesu mnogo adaptivnih procesov. Ti morajo biti strogo nadzorovani in uravnavani, saj imajo lahko v nasprotnem primeru patološke učinke na različne fiziološke, čustvene in vedenjske procese. Sladkorna bolezen, hipertenzija, motnje razpoloženja, duševne motnje, huda depresija, motnje prehranjevanja in samomorilnost so le nekatera bolezenska stanja, ki so lahko posledica stresa (3).

1.1.1 Os hipotalamus-hipofiza-skorja nadledvičnice (HPA os) in stresni odziv

Vrhovni center, ki uravnava in usmerja stresni odziv, se nahaja v možganih in zajema mnogo anatomskih struktur centralnega in perifernega živčnega sistema. Iz limbičnih predelov možganske skorje se informacije prenesejo v več tarčnih struktur, tudi v hipokampus, ki ima vlogo pri aktivaciji osi hipotalamus-hipofiza-skorja nadledvičnice (HPA os). HPA os sestavljajo trije anatomske centri: hipotalamus, hipofiza in nadledvična žleza, njeno delovanje je shematsko prikazano na sliki 1. V paraventricularnem jedru (PVN) hipotalamusa se sintetizira in sprošča kortikoliberin (CRH), ki se preko portalnih žil prenese do hipofize, kjer se veže na CRH receptor tipa 1 (CRFR1). Vezava sproži sproščanje adrenokortikotropnega hormona (ACTH) iz hipofize v sistemski krvni obtok. Tarčna žleza cirkulirajočega ACTH je skorja nadledvičnice, ACTH se veže na receptorje tipa 2 (MC2-R) in s tem stimulira sintezo glukokortikoidov iz skupnega predhodnika holesterola. Glavni predstavnik glukokortikoidov je hormon kortizol, ki se iz skorje nadledvičnice nato izloča v kri (5).



Slika 1: Prikaz osi hipotalamus-hipofiza-nadledvična žleza. Privzeto in prirejeno po (5).

Kortizol je v krvnem obtoku večinoma vezan na plazemski protein, kortikosteroide vezavni globulin (CBG), v manjšem deležu na albumin, približno 10 % pa ga je nevezanega, v t.i. prosti fiziološko aktivni obliki. Nevezana oblika hormona je nujna za vezavo na glukokortikoidne receptorje (GR), nastali kompleksi hormon-receptor se prenesejo v jedro, kjer se vežejo na promotorski del tarčnih genov in s tem sprožijo sintezo ustreznih proteinov. Nastali proteini v telesu sprožijo presnovne, protivnetne in imunosupresivne učinke, z namenom obrambe oziroma prilagoditve telesa na stres (4). Omenjena pot regulacije je pomembna za ohranjanje homeostaze ob stresu. Kortizol je zmožen regulirati tudi lastno izločanje preko negativne povratne zveze. V stresni situaciji koncentracija kortizola naraste in s tem sproži zgoraj opisane fiziološke spremembe. Hkrati pa je povišana koncentracija kortizola v krvi inhibitorni signal za hipotalamus in hipofizo, s čimer se zavre delovanje HPA osi in s tem zmanjša izločanje kortizola. Kortizol ima torej pomembno vlogo pri regulaciji delovanja HPA, z negativno povratno zvezo pa uravnava tudi jakost in trajanje aktivacije HPA osi ob stresnem odzivu (5).

Pod vplivom psihosocialnega ali fizičnega stresa se v krvi zviša koncentracija kortizola. Kadar je stres kratkotrajen (akutni stres) ima zvišan kortizol pozitivne učinke. Pospeši katabolne procese in s tem telesu zagotavlja večjo količino energije, ki je potrebna za ohranjanje homeostaze. Gre za kratkotrajen proces, ki je časovno omejen z negativno povratno zvezo. Ko stresa več ni, se zmanjša aktivacija HPA osi. Posledično se zniža tudi koncentracija kortizola v krvi. Če je izpostavitve stresu kronična ali ponavljajoča, se zaradi stalne stimulacije HPA osi v krvi ohranja zvišan nivo kortizola dalj časa. Kronično zvišan kortizol povzroči poškodbe nevronov hipokampusu in nepravilno delovanje HPA osi. Okvarjena HPA os ni več zmožna uravnati koncentracije kortizola v krvi, posledično ostane kortizol v krvi zvišan, čeprav telo ni več izpostavljeno stresu. Fiziološki procesi, ki ob normalnem delovanju HPA osi telesu pomagajo ohranjati homeostazo, postanejo patološki in so lahko vzrok za razvoj kroničnih bolezni ali pa povečajo tveganje za nastanek le teh. Dolgotrajen in/ali nepravilen, lahko pretiran ali nezadosten odziv na stres, imenujemo tudi alostatična preobremenjenost (2).

1.1.2 Vpliv psihosocialnega stresa na delovanje HPA osi

Razvoj HPA osi se začne v fetalnem obdobju in je pogojen z genetskimi dejavniki in dejavniki okolja. Vsi dejavniki okolja, ki jih v fetalnem obdobju zaznava mati, kasneje v neonatalnem obdobju in otroštvu pa otrok sam, lahko vplivajo na razvoj HPA osi in odziv posameznika na stres (6).

PSIHOSOCIALNI STRES

Stresorji iz okolja so zelo različni. Lahko gre za biološke potrebe (lakota, mraz, bolečina), bolezenska stanja (okužbe, poškodbe), življenjske dogodke (začetek šolanja, smrt bližnjih, rojstvo otroka, selitev) in odnose (ločitev staršev, izguba bližnjih) (1). Pri otrocih je za razvoj HPA osi ključnega pomena interakcija z okoljem. To okolje v času odraščanja predstavljajo starši ali skrbniki oz. varni in stabilni odnosi s prvo bližnjo osebo (6). Vse zahteve iz okolja, ki presegajo otrokove zmožnosti ali ogrožajo njegovo življenje in s tem vplivajo na odnos med otrokom in okoljem (starši, skrbniki), predstavljajo psihosocialni stres (7). Ključni mehanizmi, ki uravnavajo stresni odziv, so nameščeni v hipotalamusu. Hipotalamus informacije za uravnavanje HPA osi prejema iz lastnega organizma, kar pomeni, da nima neposredne zveze z zunanjim svetom oz. informacijami, ki prihajajo iz okolja (8). Stresorje in druge informacije iz okolja mora preko posrednih povezav prenesti do hipotalamusa, da lahko te vplivajo na delovanje HPA osi. Vezni element med zunanjim okoljem in

hipotalamusom predstavlja limbični predel možganske skorje (5). Psihosocialni stresorji posredno preko limbičnega sistema poglavitno vplivajo na razvoj in kasnejše delovanje HPA osi pri otrocih. Normalno delujoča HPA os, pa je nujna za regulacijo stresnega odziva. Poudarili smo, da je v otroštvu zelo pomembna navezanost med otrokom in prvo bližnjo osebo (6). Dejavniki, ki vplivajo na razvoj zgodnjega odnosa, so povezani s povečano reaktivnostjo HPA osi in posledično z zvišanimi vrednostmi kortizola pri otrocih. Pogosti dejavniki so: neodzivnost matere, slabo starševstvo, odsotnost matere, izguba staršev (7), stres pri starših/skrbnikih, materina depresija (9).

Zakaj je pri otrocih tako pomembna zgodnja navezanost, opisuje t.i. teorija navezanosti, katere utemeljitelj je John Bowlby. Teorija poudarja, da je odnos med otrokom in prvo bližnjo osebo zelo pomemben. Prav tako je pomembna fizična bližina te osebe, saj otroku predstavlja varno zatočišče. Navezanost je podrobno raziskovala tudi Mary Ainsworth. Ugotovila je, da obstaja več tipov navezanosti, varna navezanost in različni tipi negotove navezanosti. Tipi navezanosti so povezani z vedenjem otroka in skrbnika ter z lastnostmi njune interakcije. Pri varnem tipu navezanosti otroci vedo, da jim mati predstavlja varno zatočišče in, da je odzivna na njihove potrebe. Ti otroci bodo raziskovali okolje in vzpostavljali stike s tujci. Pri negotovih tipih navezanosti, pa se otrok zaradi neodzivnosti matere na njegove signale, ne bo mogel posvetiti igri in raziskovanju okolja. Več pozornosti bo usmeril k materi, da bi ugotovil, ali je ta še prisotna, ali ga opazuje in ali je odzivna na njegove signale (10). Zgodnja interakcija ima torej pomemben vpliv na razvoj otroka, saj preko te razvije t.i. notranje delovne modele, na podlagi katerih bo v prihodnosti razvijal odnose z drugimi osebami in predstavo sam o sebi (11).

PSIHOSOCIALNI STRES IN PRETIRANA ODZIVNOST HPA OSI

Pri otroku tip navezanosti ni pomemben zgolj za razvoj notranjih delovnih modelov, ampak tudi za razvoj stresnega odziva. Pri varnem tipu navezanosti se ob stresu v telesu sprožijo adaptivni procesi, ki vzdržujejo homeostazo in posledično normalne vrednosti kortizola. Pri negotovih tipih navezanosti pa pride zaradi ponavljajočega stresa, ki ga lahko otroku predstavljajo povsem vsakdanje okoliščine in dogodki, do neustreznega razvoja in pretirane odzivnosti HPA osi (8). Pomembna je tudi intenzivnost in trajanje izpostavitve psihosocialnim stresorjem. Posledica pretirane odzivnosti HPA osi je kronično zvišan kortizol, izpostavljenost visokim vrednostim kortizola, pa ima dokazano škodljiv učinek na fiziološke, čustvene in vedenjske procese. Fiziološke posledice so povečana rezistenca na

učinke inzulina, nagnjenost k debelosti, pospešeni procesi osteoporoze. Zaradi poškodb hipokampalnih nevronov lahko pride do motenj spomina. Pri osebah je spremenjen tudi imunski odziv (9). Posledice spremenjenih čustvenih in vedenjskih procesov so zelo različne in odvisne od vrste psihosocialnega stresorja (8). Spremenjena je čustvena regulacija, pojavijo se lahko simptomi psihoze, anksioznosti in depresije (9). Pri otrocih opazimo ekstremno obnašanje, kot je huda jeza in agresivnost (8), velikokrat se ti otroci tudi odmaknejo iz socialnega okolja. Pretiran stres v otroštvu trajno modulira odziv na stres in posledično poveča tveganje za razvoj različnih patologij, ki se lahko razvijejo v otroštvu ali kasneje v življenju (9).

1.2 SLADKORNA BOLEZEN TIPA I

Sladkorna bolezen tipa 1 (SBT1) je kronična bolezen, katere etiologija je še vedno v veliki meri nerazjasnjena (12). Pri bolezni pride do avtoimunskega uničenja β celic Langerhansovih otočkov trebušne slinavke, ki proizvajajo inzulin (4). Zaenkrat še ni v celoti pojasnjeno, kateri dejavniki sprožijo ali pospešijo avtoimunske procese vpletene v nastanek SBT1 (7). Prisotnost sprememb/polimorfizmov v določenih genih kaže na pomen genetskega dejavnika, za razvoj bolezni pa je potreben še okoljski dejavnik (4). Najbolj znan genetski dejavnik so geni pglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC) (4). Najpogosteje omenjeni dejavniki okolja pa virusne okužbe, prehranjevalne navade v nosečnosti, visoka starost matere ob porodu, porodna teža, carski rez (12), potreba po neonatalni intenzivni negi in zdravstveno stanje matere v nosečnosti. Vsi omenjeni dejavniki prispevajo k razvoju SBT1 na različne načine. V telesu se lahko poveča potreba po inzulinu, lahko se zmanjša izločanje inzulina iz β celic, pojavi se lahko inzulinska rezistenca ali pa ti dejavniki negativno vplivajo na imunski sistem posameznika (13).

1.2.1 Vzroki za razvoj SBT1 in možni mehanizmi

Razvitih je bilo več modelov, ki razlagajo etiologijo SBT1. Higienska hipoteza pravi, da je vzrok povečana higiena v modernem svetu. S pretirano higieno pride do sprememb črevesne bakterijske flore, ki je pomembna za normalen razvoj imunskega sistema. Imunski sistem postane bolj občutljiv, kar zmanjšuje njegovo učinkovitost, zato so osebe bolj dovzetne za razvoj nekaterih bolezni, tudi SBT1. Pogost okoljski dejavnik je okužba z virusi, o tem govori virusna hipoteza. Nekateri virusi so zmožni poškodovati trebušno slinavko in Langerhansove otočke. Drugi izkazujejo veliko podobnost z avtoantigeni, ki se pojavljajo pri SBT1. To lahko sproži avtoimunski proces uničevanja β celic pri genetsko

predisponiranih posameznikih. Na razvoj SBT1 vplivajo tudi prehranjevalne navade in vnos toksičnih snovi, o tem govori prehranjevalna hipoteza. Pri novorojenčkih je glavni vir prehrane materino mleko, ki ima pomembno zaščitno vlogo v prvih mesecih življenja. Prehiter prehod z materinega mleka na kravje mleko pri novorojenčku sproži imunsko reakcijo, ki je lahko sprožilni dejavnik avtoimunosti pri genetsko predisponiranih posameznikih (14).

Najpomembnejši hipotezi sta hipoteza pospeševanja (angl. accelerator hypothesis) in hipoteza β -celičnega stresa (angl. β -cell stress hypothesis). Prva hipoteza zagovarja teorijo, da uničenje β celic pospešujejo trije procesi. Prvi proces je programirana celična smrt. Gre za naravni proces β celične apoptoze, ki je nujen, ne pa zadosten dejavnik za razvoj SBT1. Drugi pospeševalec je inzulinska rezistenca, ki je posledica nezadostne fizične aktivnosti in prekomerne telesne teže. Ta še dodatno pospeši proces apoptoze β celic. Tretji pospeševalec je avtoimunost, ki se razvije kot posledica dejavnikov okolja pri genetsko predisponiranih osebah. Fizična neaktivnost in prekomerna telesna teža seveda nista edina dejavnika, ki povečata β celični stres (7). Po hipotezi β -celičnega stresa, so vsi dejavniki, ki v telesu povečajo potrebno po inzulinu ali povečajo inzulinsko rezistenco, potencialni dejavniki tveganja za razvoj SBT1. Med temi se najpogosteje omenja psihosocialni stres, ki lahko preko opisanih živčnih in hormonskih mehanizmov prispeva k razvoju ali napredovanju SBT1 (1).

1.2.2 Vpliv psihosocialnega stresa na razvoj SBT1

SBT1 je avtoimunska bolezen, pri kateri pride do avtoimunskega uničenja β celic, ki proizvajajo inzulin (1). Inzulin je presnovni hormon, ki je odgovoren za usmerjanje glukoze v celice in za njeno pretvorbo v glikogen in trigliceride. Hkrati pa zavira procese, pri katerih se glukoza iz jeter sprošča v kri. Vsakršno pomanjkanje učinkov inzulina se kaže kot motnja, pri kateri pride do povišane koncentracije glukoze v krvi (hiperglikemija) (4). V avtoimunski proces razvoja SBT1 so najpogosteje vpletena avtoprotitelesa (aPt) proti inzulinu (IAA), celicam β (ICA), tirozin-fosfatazi (IA-2A) in glutamat-dekarboksilazi (GADA), ki so v visokih količinah prisotna pri novoodkritih bolnikih. Avtoimunski proces naj bi se začel zgodaj v otroštvu pri genetsko predisponiranih posameznikih, okoljski dejavniki pa so tisti, ki proces sprožijo. Propadanje β celic se nadaljuje tekom otroštva, dejavniki okolja lahko proces propadanja β celic modificirajo ali pa ga pospešijo. Ko je propadlih β celic toliko, da preostale telesu ne morejo več zagotavljati zadostne količine inzulina, pride do kliničnega

začetka bolezni. Dejavnik okolja, na katerega se bomo osredotočili, je psihosocialni stres. Ta lahko proces avtoimunosti sproži ali pa ga pospeši (1).

Pri SBT1 ni pomembno zgolj izločanje inzulina, ampak tudi občutljivost tkiv na učinke inzulina (inzulinska občutljivost). Normoglikemija je rezultat vzajemnega delovanja β -celičnega izločanja inzulina in inzulinske občutljivosti. Na inzulinsko občutljivost lahko prav tako vpliva psihosocialni stres, govorimo o inzulinski rezistenci. Inzulinska rezistenca se razvije kot posledica zmanjšane občutljivosti mišic, jeter in maščobnega tkiva na učinke inzulina. Na proces med drugim vplivajo tudi hormoni, ki imajo obratne učinke kot inzulin, delujejo kot antagonisti. Med antagonisti inzulina je tudi kortizol, vrednost katerega se poveča ravno pod vplivom stresa (16). Če povzamemo, pod vplivom psihosocialnega stresa se poveča izločanje kortizola, ki zavira učinke inzulina in vodi v razvoj inzulinske rezistence, ta pa posledično pripomore k razvoju SBT1 (1).

Na začetku smo omenili, da se ob stresu sproži stereotipni obrambni odziv "boj ali beg", ki pomaga telesu vzdrževati homeostazo (1). Pospeši se izločanje kortizola in drugih stresnih hormonov, med slednjimi sta najpomembnejša adrenalin in testosteron (7). Adrenalin v telesu pospeši sproščanje glukoze iz jeter in prostih maščobnih kislin iz maščevja (PMK). Glukoza in PMK sta pomembna vira energije v telesu, ki je v tem primeru gonilna sila adaptivnih procesov, ki pomagajo ob stresu ohranjati homeostazo telesa (4). Pod vplivom adrenalina, kot tudi testosterona, se zaradi povečanih energijskih potreb, v telesu poveča tudi potreba po inzulinu in s tem pritisk na β celice. Po drugi strani pa zvišane koncentracije kortizola zavirajo delovanje inzulina, kar še dodatno poveča pritisk na β celice. Rezultat omenjenih procesov je povečana predstavitev avtoantigenov in nastajanje aPt, značilnih za SBT1. Nastala aPt lahko sprožijo proces avtoimunskega uničenja β celic ali pa ta proces pospešijo in tako prispevajo k razvoju SBT1 (7).

Psihosocialni stres vpliva tudi na delovanje imunskega sistema. Dokazano je, da kronični stres zavira delovanje imunskega sistema in vpliva na imunsko ravnovesje v telesu. Pod vplivom kroničnega stresa se zmanjša izločanje protivnetnih citokinov IL-5, IL-10, IL-13 in IL-17 in kemokinov CCL2, CCL3 in CXCL10. Posledično se zavre delovanje protitelesnega imunskega odziva (Th2), regulatornih T celic (Treg) in T celic pomagalk (Th17). Th2 celice imajo pomembno zaščitno vlogo pri napadu na β celice, slabša regulacija Treg in Th2 celic pa je povezana s pospešitvijo avtoimunskih procesov v telesu. Imunsko ravnovesje je porušeno, nagnjeno je k protivnetnemu (Th1) odzivu in s tem vpleteno v razvoj avtoimunskih

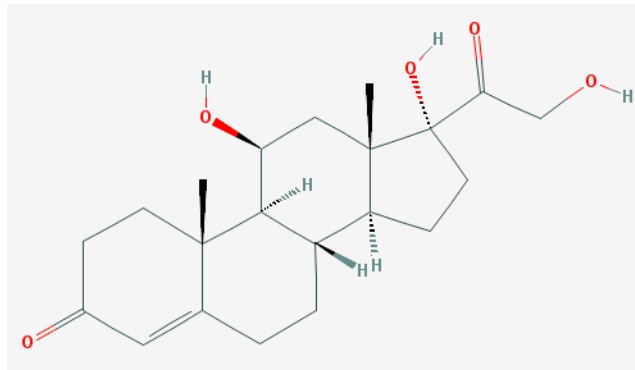
bolezni, tudi SBT1. *Carlsson E. in sodelavci* so ugotovili, da imajo otroci, ki so bili izpostavljeni psihosocialnemu stresu, pojačan tudi imunski odziv na avtoantigene značilne za SBT1 (GAD₆₅, IA-2) (17). Po drugi strani so osebe z oslabiljenim imunskim sistemom tudi bolj dovzetne za najrazličnejše okužbe. Okužbe z virusi so lahko ravno zaradi oslabitve imunskega sistema okoljski dejavnik tveganja za razvoj SBT1 (7). Porušeno imunsko ravnovesje lahko torej na različne načine prispeva k razvoju in poteku SBT1 (1).

1.3 MERJENJE STRESNEGA ODZIVA IN KORTIZOL

Stresni odziv lahko ocenjujemo na različne načine. Poslužimo se lahko psiholoških metod, pri katerih se uporabljajo različni vprašalniki in intervjuji. Določamo lahko končne produkte aktivacije HPA osi (kateholamine in glukokortikoide) v krvi, urinu ali slini. Določamo lahko koncentracije hormonov vpletenih v aktivacijo HPA osi, kot sta CRH v likvorju in ACTH v krvi (18). Stres lahko vpliva na vse omenjene hormone, največji vpliv pa ima na glukokortikoidni hormon kortizol, zato se ta najpogosteje uporablja za ocenjevanje delovanja HPA osi in stresnega odziva (19). Z določanjem vrednosti kortizola lahko dobimo informacije o delovanju in regulaciji HPA osi, odzivnosti HPA osi na dražljaje iz okolja in o boleznih, ki so posledica nepravilnega delovanja HPA osi (20).

1.3.1 Kortizol v slini otrok

Proučevanje HPA osi in stresnega odziva pri otrocih je problematično predvsem zaradi potrebe po uporabi čim manj invazivnih metod. Kortizol merimo v različnih bioloških vzorcih, največkrat v krvi in urinu. Zbiranje krvnih vzorcev pri otrocih predstavlja velik stres, zbiranje urina pa je velikokrat težavno. Veliko raziskav zato temelji na vzorcih slin, katerih odvzem je enostaven in neinvaziven (21). Pri tem se poraja vprašanje ali vrednosti kortizola dobro korelirajo s koncentracijo v krvi. Kortizol, struktura katerega je prikazana na sliki 2, je lipidotopen steroidni hormon (19) z molsko maso (MM) 362.466g/mol (22), kar mu omogoča enostavno prehajanje lipidnih membran celic s pasivno difuzijo. Z omenjenim mehanizmom nevezan kortizol prehaja iz krvnega obtoka preko žlez slinavk v slino. To pomeni, da vrednosti kortizola v slini odražajo količino fiziološko aktivne oblike hormona v telesu. Ker se v slini kortizol metabolizira do kortizona, za kar je odgovoren encim 11 β -hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 2 (11 β -HSD2), so koncentracije tudi 10 do 30-krat nižje kot v krvi. Koncentracije kortizola torej dobro korelirajo s koncentracijami prostega kortizola v krvi, le da so te nižje (19).



Slika 2: Kemijska struktura kortizola. Privzeto in prirejeno po (22).

1.3.2 Dejavniki, ki vplivajo na vrednosti kortizola v slini otrok

Kadar ocenjujemo delovanje HPA osi z merjenjem kortizola, moramo biti pozorni na dejavnike, ki vplivajo na vrednosti kortizola. Iz literature je razvidno, da se med laboratoriji pojavljajo večje razlike v izmerjenih vrednostih kortizola, ki so posledica bioloških in metodoloških dejavnikov. Med biološkimi dejavniki se najpogosteje omenja cirkadiani ritem, ki določa tudi čas vzorčenja, pomembni so tudi spol in starost, biološka variabilnost znotraj osebe, biološka variabilnost med osebami, vpliv letnega časa, način prehranjevanja, fizična aktivnost in življenjski slog. Izmerjene vrednosti so odvisne tudi od metodologije, variabilnost je posledica različnega načina zbiranja vzorcev in shranjevanja vzorcev, močno pa je odvisna tudi od uporabljene analitske metode (23).

BIOLOŠKI DEJAVNIKI

∞ Cirkadiani ritem in čas vzorčenja

Kortizol je hormon, katerega sproščanje ni konstantno, ampak periodično, zato vrednosti čez dan nihajo. Govorimo o cirkadianem ritmu kortizola (19). 30 do 40 min po tem, ko se zbudimo, koncentracija kortizola strmo naraste. Po 60 do 75 min začne koncentracija padati in tekom dneva pade pod bazalno vrednost. Najnižje koncentracije kortizola lahko izmerimo zvečer pred spanjem. Bazalna vrednost je definirana kot normalna vrednost kortizola pri posamezniku, pri čemer se upošteva dnevno nihanje kortizola. Ker so koncentracije kortizola najvišje zjutraj, se vzorce slin najpogosteje jemlje zjutraj ali v dopoldanskem času, pomembno je, da se dosledno beleži čas vzorčenja (24).

∞ Starost in spol

Pri odvzemu moramo upoštevati starost posameznika. Novorojenčki cirkadianega ritma še ne izkazujejo, ta se začne razvijati četrty mesec po rojstvu in se razvija do 3-4 leta, takrat se

ta uskladi s cirkadianim ritmom odraslih. Pri starostnikih se lahko ritem kortizola zaradi starostnih sprememb razlikuje od otrok in odraslih. Na vrednosti kortizola v slini lahko vpliva tudi spol, čeprav zaenkrat v literaturi še ni uniformnih podatkov, ki bi opredelile vpliv spola na vrednosti kortizola (20).

∞ Prehrana

Obroki z visoko vsebnostjo proteinov in lipoproteinov lahko zvišajo koncentracijo kortizola v slini. Iz tega razloga jemljemo vzorce slin vsaj 30 min po obroku (23).

∞ Ostali dejavniki

Vsi omenjeni dejavniki vplivajo na vrednosti kortizola v slini pri pediatrični populaciji, pri odraslih pa dodatno še uživanje alkohola, kajenje, hudi fizični napor in zdravila (23).

METODOLOŠKI DEJAVNIKI

∞ Način zbiranja vzorcev

Vrednosti kortizola se razlikujejo glede na okolje, kjer je bil vzorec odvzet. Zbiranje vzorcev slin v domačem okolju je za otroke manj stresno kot v bolnišnicah ali zdravstvenih domovih, zato so koncentracije kortizola v slini navadno nižje, če so vzorci odvzeti v domačem okolju (25). Načinov zbiranja je več. Vzorci se zbirajo z enostavnim pljuvanjem slin v plastični vsebnik ali pa z uporabo komercialno dostopnih zbirnikov slin z vpojnimi gobicami. Izkazalo se je, da daje zbiranje slin z vpojnimi gobicami bolj točne rezultate, zato je tudi preferenčni način zbiranja (26).

∞ Način shranjevanja vzorcev

Stabilnost vzorcev slin ni problematična. Vzorci shranjeni pri temperaturi 5 °C so stabilni do 3 mesece, zamrznjeni vzorci shranjeni pri temperaturi od -20 °C do -80 °C do enega leta. Večkratno odtajevanje in zmrzovanje vzorcev nima vpliva na koncentracijo kortizola v slini. Shranjevanje vzorcev na sobni temperaturi, pa lahko vpliva na vrednosti kortizola, koncentracija s časom pada približno za 10 % na mesec (23).

∞ Uporabljena analitska metoda

Za določanje kortizola v slini se uporabljajo imunokemijske in kromatografske metode, ki bodo podrobneje predstavljene v poglavju 1.4 Metode določanja kortizola v slini. Večinoma se uporabljajo imunokemijske metode, predvsem zaradi dostopnosti. Največjo omejitev pri

teh predstavlja uporaba protiteles in s tem povezana občutljivost in specifičnost imunokemijskih metod. Večina laboratorijev se zato poslužuje uporabe tekočinske kromatografije sklopljene s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS). LC-MS/MS ima 10-100× boljšo občutljivost in bistveno boljšo specifičnost kot imunokemijske metode. Ker so principi metod zelo različni, se to odraža tudi v vrednostih kortizola. Glavni vzrok za to je pomanjkanje harmonizacije analitskih metod za določanje kortizola v slini, pomanjkanje certificiranih referenčnih materialov, zunanjih kontrol kakovosti, programov in smernic, ki bi to področje urejale (27). Za primerljivost rezultatov med laboratoriji je pomemben jasno in dovolj podrobno zapisan protokol metode. Če so protokoli ustrezno zabeleženi, lahko drugi laboratoriji metodo enostavno in pravilno ponovijo, rezultati pa so posledično med laboratoriji bolj primerljivi. Prav tako si laboratoriji prizadevajo, da bi se vpeljala referenčna metoda, s katero bi se izognili večini opisanih težav (23).

1.3.3 Testiranje HPA osi s stimulacijskim testom z analogom ACTH

Danes obstaja veliko testov, s katerimi lahko ocenimo delovanje HPA osi, nekatere smo omenili v poglavju 1.3 Merjenje stresnega odziva in kortizol. Kot zlati standard se še vedno uporablja inzulinski tolerančni test, nove smernice pa za oceno delovanja HPA osi priporočajo kratek stimulacijski test z analogom ACTH oz. sinaktenski test (angl. synachten test) (28).

Pri sinaktenskem testu se preiskovanim osebam intravenozno ali intramuskularno vbrizga točno določeno količino analoga ACTH. HPA os se na ACTH analog odzove enako kot na endogeni ACTH. Iz nadledvične žleze se začnejo izločati glukokortikoidni hormoni. Izločene hormone lahko določamo z različnimi laboratorijskimi tehnikami v različnih bioloških vzorcih. Najpogosteje se določa serumski kortizol 30 min ali 60 min po stimulaciji z ACTH analogom. (29). Kadar določamo kortizol v serumu, določamo celotni serumski kortizol, vezano in nevezano frakcijo kortizola. Kortizol je v krvi vezan na CBG in albumin. Vsakršna sprememba v koncentraciji CBG in albumina, kar je pogosto pri različnih patologijah, vpliva na količino vezanega kortizola in posledično na prost kortizol v krvi. Interpretacija celotnega serumskega kortizola lahko tako vodi v napačno klinično interpretacijo rezultatov (28). Omenjen razlog, je eden izmed glavnih vzrokov, da se je začelo razmišljati o uporabi drugih bioloških vzorcev, tudi sline. Vzorčenje sline ima nekaj slabosti, omejitve predstavljajo nizke koncentracije kortizola v slini in navzkrižna reaktivnost z eksogenimi glukokortikoidi ali endogenimi metaboliti kortizola. Ima pa tudi

veliko prednosti, vzorčenje je neinvazivno in neboleče, vzorci slin so dobro stabilni in kar je najpomembnejše, kortizol v slini dobro korelira s prosto frakcijo kortizola v serumu in ni pod vlivom CBG ali albuminov (30).

S sinaktenskim testom v telesu stimuliramo maksimalni kortizolski odziv, ki je pogojen z normalnim delovanjem HPA osi. Če je HPA os okvarjena, potem bo kortizolski odziv zmanjšan, kar se odraža v nižjih izmerjenih koncentracijah serumskega kortizola ali kortizola v slini (28). V serumu normalen kortizolski odziv na ACTH analog predstavljajo koncentracije, ki presežejo mejno vrednost. Splošno sprejete mejne vrednosti ni, v literaturi smo zasledili vrednosti 500 nmol/L (29), 550 nmol/L (31) in 600 nmol/L (32, 33, 34) po 30 min ali 60 min. Najboljši kompromis med občutljivostjo in specifičnostjo sinaktenskega testa za klinično interpretacijo rezultatov, predstavlja mejna vrednost 600 nmol/L (32, 33, 34). Ker lahko s postavljenjo mejo zgrešimo določeno število oseb z okvarjeno HPA osjo, je dodaten pogoj zvišanje kortizola za več kot 200 nmol/L. V kolikor se koncentracija kortizola po sinaktenskem testu ne zviša za 200 nmol/L ali več, to nakazuje nenormalen kortizolski odziv. Za kortizol v slini zaenkrat še ni določene mejne vrednosti, na podlagi katere lahko sklepamo o normalnem kortizolskem odzivu (31). *Patel S.R. in sodelavci* (29) ter *Cornes P.M. in sodelavci* (31) so mejne vrednosti v slini določili s pomočjo korelacije med serumskim kortizolom in kortizolom v slini. *Patel S.R. in sodelavci* so mejno vrednost postavili pri 15nmol/L po 60 min, kortizol v slini so določali z LC-MS/MS metodo (29). *Cornes P.M. in sodelavci* pa pri 10,2 nmol/L, kortizol v slini so določali z radioimunsko metodo (RIA) (31).

1.4 METODE DOLOČANJA KORTIZOLA V SLINI

Kortizol v slini določamo z različnimi analitskimi metodami. Večina opisanih metod je imunokemijskih, najpogosteje RIA, imunofluorescenčne metode in encimsko imunske metode (ELISA) (20). Imunokemijske metode temeljijo na osnovni reakciji analita s specifičnimi protitelesi (Pt). Čeprav so uporabljena Pt specifična za analit, v našem primeru kortizol, lahko strukturno podobne molekule, npr. drugi steroidni hormoni iz vzorca, prav tako tekmujejo za vezavo Pt (t.i. navzkrižna reaktivnost). Izmerjena koncentracija kortizola je posledično višja, kot je dejanska koncentracija v slini, občutljivost in specifičnost metode pa sta na ta račun slabši. Najpogostejšo takšno interferenco predstavlja kortizon (35). Pri različnih imunokemijskih metodah se uporabljajo Pt z različnimi lastnostmi, kar se odraža tudi v lastnostih medmolekulske interakcije Pt z analitom. Ker se Pt med metodami

razlikujejo, se razlikuje tudi afiniteta Pt do kortizola in drugih sestavin vzorca, kar se odraža v izmerjeni koncentraciji. Če bi isti vzorec določali z različnimi imunokemijskimi metodami, bi se izmerjena koncentracija med metodami razlikovala (35).

Omenjene omejitve imunokemijskih metod so vodile v razvoj bolj specifičnih in občutljivih metod, ki temeljijo na tekočinski kromatografiji (LC). V začetku se je uporabljala LC sklopljena z ultravijolično detekcijo (LC-UV) ali LC sklopljena z masnim spektrometrom (LC-MS). Veliko se je uporabljala tudi plinska kromatografija sklopljena z masnim spektrometrom (GC-MS). Danes pa je preferenčna metoda za merjenje kortizola v slini LC-MS/MS. Kromatografske metode sklopljene s tandemsko masno spektrometrijo imajo bistveno boljšo občutljivost in specifičnost kot imunokemijske. Glavna slabost je dostopnost metode, saj niso vsi laboratoriji opremljeni z ustreznimi aparaturami, metode pa so tudi zahtevnejše za izvedbo (36).

1.4.1 Analitski postopek LC-MS/MS

Analitski postopek je sestavljen iz petih glavnih korakov: zbiranje vzorcev, priprava vzorcev, analiza, kvantifikacija in analiza podatkov. Ustrežno zbiranje in priprava vzorcev sta ključna koraka, s katerima zagotovimo kvalitetno analizo z LC-MS/MS. Ker je koncentracija kortizola v slini nizka, je potrebno pred analizo vzorce ustrezno očistiti in koncentrirati. S tem pripomoremo k večji občutljivosti in specifičnosti LC-MS/MS pri določanju kortizola (36). Poznamo različne metode čiščenja in ekstrakcije vzorcev. Najenostavnejša metoda je precipitacija proteinov (PPT) z organskimi topili npr. acetonitril, metanol (MeOH) ali z raztopino cinkovega sulfata. Poznamo ekstrakcijo tekoče/tekoče (LLE) in ekstrakcijo na trdni fazi (SPE) (37). Veliko se uporablja SPE metoda, saj jo je možno sklopiti z LC-MS/MS sistemom in tako pripravo vzorcev delno avtomatizirati. SPE sklopljena z LC-MS/MS je direktna metoda, s katero skrajšamo predpripravo vzorca in zmanjšamo verjetnost človeške napake. Vzorčenju in pripravi vzorcev sledi analiza z LC-MS/MS (36).

LC je kromatografska tehnika, ki temelji na porazdeljevanju komponent vzorca med stacionarno in mobilno fazo. Sestavine vzorca se zaradi različnih fizikalno-kemijskih lastnosti različno porazdeljujejo med stacionarno fazo, ki je lahko trdna ali tekoča, in tekočo mobilno fazo. LC glede na mehanizem zadrževanja delimo na porazdelitveno (ali tekoče-tekoče), adsorpcijsko (ali tekoče-trdno), ionsko-izmenjevalno, izključitveno (ali gelsko) in afinitetno kromatografijo. Najpogosteje se uporablja porazdelitvena kromatografija, ki jo

delimo na normalno-fazno in reverzno-fazno kromatografijo. Pri normalno-fazni LC je mobilna faza (MF) nepolarna, stacionarna faza pa polarna (SF), pri reverzno-fazni LC je MF polarna, SF pa nepolarna. Vrsto LC se izbere glede na fizikalno-kemijske lastnosti analita, največkrat na podlagi topnosti in MM (38).

Z masno spektrometrijo (MS) detektiramo komponente vzorca glede na razmerje med maso in nabojem (m/z) nabitih delcev. Masni spektrometer je sestavljen iz treh glavnih komponent: ionskega izvora, masnega analizatorja in detektorja. Vsi sestavni deli razen ionskega izvora se nahajajo v vakumu, saj ta preprečuje trke med posameznimi ioni. Prva komponenta masnega spektrometra je ionski izvor. Kadar uporabljamo MS kot samostojno metodo, se vzorec prenese neposredno do ionskega izvora. Če je metoda sklopljena z LC, pa se vzorec z LC najprej kromatografsko loči in nato prenese do ionskega izvora MS (36). Vzorec vstopi v ionski izvor v plinski fazi, za kar poskrbi dotočni sistem (angl. inlet system). V ionskem izvoru se molekule vzorca ionizirajo, nastali kationi in anioni se prenesejo v masni analizator, ki ione razvršča glede na m/z vrednosti. Zadnja komponenta MS je detektor, ta prevede signal masnega analizatorja v električni signal, ki ga z ustrezno računalniško programsko opremo obdelamo (38). Poznamo več tipov ionskih izvorov, najpogosteje se uporabljajo elektrorazprševalna ionizacija (ESI), kemijska ionizacija z razprševanjem pri atmosferskem tlaku (APCI) in fotoionizacija pri atmosferskem tlaku (APPI) (39). Izbiramo lahko med več vrstami masnih filtrov: masni analizator z ionsko pastjo (IT), enojni kvadrupolni masni analizator (Q), trojni kvadrupolni masni analizator (QQQ) in masni analizator na osnovi časa preleta (TOF) (39).

Za kvantitativno analizo spojin v nizkih koncentracijah se zaradi visoke selektivnosti in občutljivosti metode pogosto uporablja tandemski masni spektrometer (MS/MS). Pri MS/MS metodi s QQQ masnim analizatorjem so med seboj povezani trije kvadrupoli. Vsak kvadrupol ima ločeno funkcijo. Prvi kvadrupol prepušča samo določene starševske ione, drugi kvadrupol je kolizijska celica, kjer poteče fragmentacija starševskih ionov na hčerinske, tretji kvadrupol pa prepušča samo določene hčerinske ione. Temu sledi detekcija, ki je odvisna od izbranega tipa meritve. Kadar iz starševskega iona nastane več hčerinskih ionov, uporabimo multirezidualno analizo (MRM, angl. multiple reaction monitoring), s katero lahko spremljamo več prehodov (36). Metoda LC-MS/MS, ki smo jo uporabili za določanje koncentracije kortizola v vzorcih sline, bo podrobneje predstavljena v poglavju 3.2.4 LC-MS/MS pogoji in potek analize vzorcev.

2 NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je določitev koncentracije kortizola v slini s tandemsko masno spektrometrijo pri pediatričnih bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 1 z namenom opredelitve njihovega odziva na stres. Zato smo si zastavili sledeče specifične cilje:

- ∞ Uvesti metodo določanja koncentracije kortizola v vzorcih sline z metodo LC-MS/MS in izvesti osnovno verifikacijo metode: ovrednotiti linearnost, točnost, natančnost, mejo kvantifikacije in oceniti vpliv matriksa na odziv analiznega inštrumenta.
- ∞ Z metodo LC-MS/MS določiti koncentracije kortizola v vzorcih sline, ki so bili odvzeti preiskovancem pred intervencijo in po intervenciji. Intervencijo v kontrolni skupini zdravih otrok in mladostnikov predstavlja psihološko testiranje, v skupini otrok in mladostnikov s SBT1 pa sinaktenski test. S tem bi opredelili delovanje HPA osi (stresni odziv) pred in po intervenciji v kontrolni skupini in v skupini bolnikov s SBT1.
- ∞ Primerjati koncentracije kortizola med skupinama pred intervencijo in znotraj skupin pred in po intervenciji.
- ∞ Opredeliti korelacijo med serumskimi koncentracijami kortizola in koncentracijami kortizola v slini po sinaktenskem testu v skupini preiskovancev s SBT1

S tem želimo potrditi naslednje hipoteze:

- ∞ Metoda LC-MS/MS je primerna metoda za določitev koncentracije kortizola v vzorcih sline.
- ∞ Otroci in mladostniki s SBT1 imajo višje bazalne vrednosti kortizola kot zdravi otroci in mladostniki, kar je lahko posledica nepravilnega delovanja HPA osi.
- ∞ Pri zdravih otrocih in mladostnikih po psihološkem testiranju so koncentracije kortizola v slini višje kot pred testom.
- ∞ Pri otrocih in mladostnikih s SBT1 se koncentracije kortizola v slini po sinaktenskem testu zvišajo.
- ∞ Koncentracije kortizola v slini dobro korelirajo s serumskimi koncentracijami.

Magistrska naloga je bila izdelana v okviru raziskave Etiologija in vpliv psihološkega stresa na otroke in mladostnike s sladkorno boleznijo tipa 1, ki je del programa P3-0343 (Etiologija,

zgodnje odkrivanje in zdravljenje bolezni pri otrocih in mladostnikih) pri Agenciji Republike Slovenije za raziskovanje. Raziskava se je izvajala na Pediatrični kliniki, UKC Ljubljana in sicer na Kliničnem oddelku za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni in v Službi za specialno laboratorijsko diagnostiko, sodelovale pa so tudi različne slovenske osnovne šole. Raziskavo je odobrila komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje Republike Slovenije 16.8.2013 (60/08/13).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Naprave in pribor

- Sistem LC-MS/MS: tekočinski kromatograf HPLC PerkinElmer Series 200 (PerkinElmer, Massachusetts, ZDA), sklopljen z masnim spektrometrom QTRAP® 3200 LC-MS/MS System (ABSciex, Massachusetts, ZDA)
- Kolona 1: Poros™ R1 10 µm, 4.6 × 50mm, 0.8 mL (ThermoFisher Scientific, Applied Biosystems™, Massachusetts, ZDA)
- Kolona 2: ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 100 mm, 3.5 µm (Agilent, Kalifornija, ZDA)
- Analitska tehnica Sartorius TE124S-OCE (Sartorius Corporation, New York)
- Stresalnik Vibromix 10 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- Centrifuga 5702 R (Eppendorf® Research®, Hamburg, Nemčija)
- Mikrocentrifuga MiniSpin® (Eppendorf® Research®, Hamburg, Nemčija)
- Zamrzovalnik -19±2 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- Hladilnik 4±2 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- Polavtomatske pipete: 0.5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL (Eppendorf® Research®, Hamburg, Nemčija)
- Plastične centrifugirke TPP® 10 mL (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Švica)
- Plastične mikrocentrifugirke Eppendorf® Safe-Lock 1,5 mL (Eppendorf® Research®, Hamburg, Nemčija)
- Plastične krioviale T309-3A Cryovial® 2 mL (Simport®, Beloeil, Kanada)
- Kromatografske vialne – Agilent 1,5 mL
- Ostalo: merilni valji (250 mL in 10 mL), merilne bučke (500 mL), steklenica z zamaškom (150 mL), nastavki za pipete, parafilm®M, spatula, tehtalni čolniček, zamaški za vialne, inserti za vialne, zaščitne rokavice, zaščitna očala

3.1.2 Raztopine in reagenti

- Metanol LC-MS ChromasolV®, FLUKA Methanol (CH₃OH); MM = 32.04 g/mol, čistost: >99,9 % (Sigma Aldrich, Darmstadt, Nemčija)

- Voda LC-MS ChromasolV®, Honeywell Riedel-de Haën™ (H₂O); MM = 18.02 g/mol (Sigma Aldrich, Darmstadt, Nemčja)
- 2-popanol EMSURE® ((CH₃)₂CHOH); MM = 60.10 g/mol, čistost: ≥99.8 % (Sigma Aldrich, Darmstadt, Nemčja)
- Mravljična kislina, Honeywell Fluka™ (CH₂O₂); MM= 46,03 g/mol (Sigma Aldrich, Darmstadt, Nemčja)
- Cinkov sulfat (ZnSO₄*7H₂O); MM = 287.56 g/mol, čistost: ≥99.5 % (Sigma Aldrich, Darmstadt, Nemčja)
- Raztopina 10g/L cinkovega sulfata v 80 % MeOH
- 80 %, 50 % in 20 % raztopina MeOH

- Certificiran Interni standard za kortizol (C₂₁H₂₆D₄O₅): Cortisol-D₄ (9,11,12,12-D₄), raztopina 100 µg/mL v metanolu; MM: 366.48 g/mol, čistost = 98 % (Cerilliant, Sigma Aldrich, Darmstadt, Nemčja)
- Standardni material – hidrokortizon (C₂₁H₃₀O₅): Hydrocortisone H4001 Sigma, bel prah; MM = 362.46 g/mol, čistost ≥ 98 % (Sigma Aldrich, Darmstadt, Nemčja)
- Kontrolni material – liofiliziran človeški serum ERM®-DA192: količina kortizola v ampuli 0,1315 µg ± 0,0025 µg, koncentracija kortizola v rekonstituiranem serumu 273 ± 6 nmol/L (98,8 µg/L ± 2,0 µg/L) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Nemčja)

3.1.3 Biološki vzorci

Vzorci so bili zbrani v okviru raziskave Etiologija in vpliv psihološkega stresa na otroke in mladostnike s sladkorno boleznijo tipa 1. Za merjenje kortizola v sklopu testiranja HPA osi, so bili pri otrocih in mladostnikih odvzeti vzorci sline. Vzorci otrok in mladostnikov s SBT1 so bili zbrani v Ambulanti za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni na Pediatrični kliniki v UKC Ljubljana, vzorci zdravih otrok in mladostnikov pa v različnih osnovnih šolah. V raziskavo je bilo vključenih 142 otrok, starih od 8 do 15 let. Zbranih je bilo 88 vzorcev bolnikov s SBT1 in 54 vzorcev zdravih otrok, ki sestavljajo kontrolno skupino. Vsak otrok je oddal dva vzorca sline, skupno število zbranih vzorcev je bilo 284. Zdravi otroci so oddali prvi vzorec sline pred psihološkim testiranjem (ob času 0') in drugega po psihološkem testiranju po 60 min (ob času 60'). Opravljen je bil intervju z otrokom: Intervju navezanosti otroka. Izpoljenih je bilo tudi več različnih vprašalnikov, ki so jih izpolnjevali otroci, mladostniki in starši, in sicer vprašalnik o splošnih/sociodemografskih podatkih, vprašalnik

za ugotavljanje stresa pri starših, vprašalnik za oceno psihopatologije pri otrocih in mladostnikih, vprašalnik o hudih življenjskih dogodkih, vprašalnik o izpostavljenosti travmatičnim dogodkom in vprašalnik o navezanosti v bližnjih odnosih za starše. Bolniki s SBT1 so oddali prvi vzorec sline ob prihodu v ambulanto (ob času 0') in drugega po sinaktenskem testu po 60 min (ob času 60').

SINAKTENSKI TEST

Testiranje HPA osi pri bolnikih s SBT1 je bilo opravljeno s stimulacijskim testom z analogom ACTH (Synachten, Novartis, 0.25 mg/mL). Odvzeti so bili serumski vzorci in vzorci sline. Koncentracija kortizola v serumu je bila določena z avtomatiziranim imunološkim analizatorjem, ki deluje na osnovi merjenja kemiluminiscence (Immulite 2000), koncentracija kortizola v slini pa z LC-MS/MS metodo.

Test je potekal tako, da so ob času 0' preiskovancem s SBT1 odvzeli vzorec venske krvi in vzorec sline za določitev kortizola. Nato so ti otroci prejeli do 1 mL preparata Synachten intramuskularno, odmerek so prilagodili glede na telesno težo otroka. Po 60 min je sledil ponoven odvzem venske krvi in sline za določitev kortizola. Vzorci sline so bili do priprave in analize shranjeni v zmrzovalniku pri -19 °C.

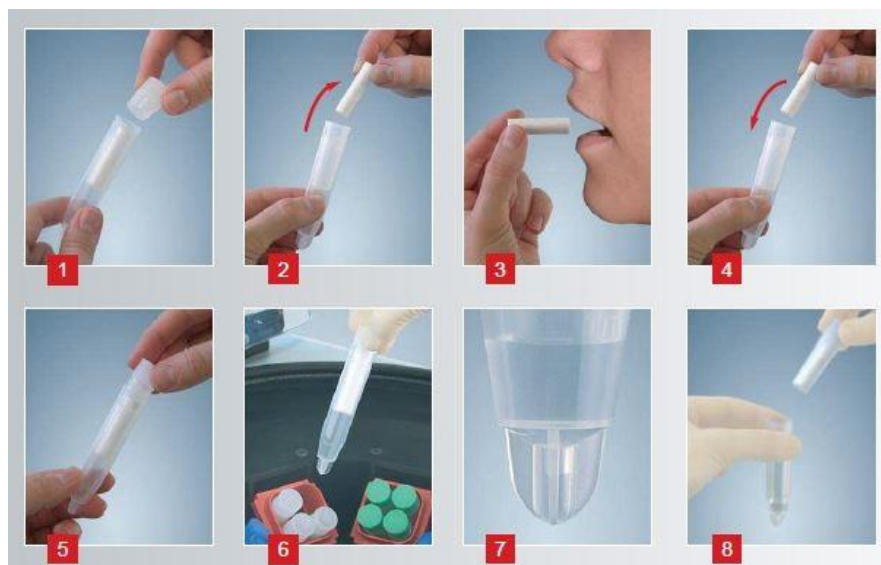
ZBIRANJE VZORCEV KRV

Periferna venska kri je bila odvzeta v epruveto brez antikoagulanta. Kri je potrebno narahlo premešati in pustiti stati 1-2 uri na sobni temperaturi pri 20-24 °C. Za tem se kri centrifugira pri 1000-1300 × g, 10 min pri sobni temperaturi. Serum se odpipetira v čisto epruveto. Serum lahko hranimo 7 dni pri 2-8 °C; dlje časa (do tri mesece) pa ga hranimo pri -20 °C.

ZBIRANJE VZORCEV SLINE

Vzorci sline so bili zbrani s pomočjo salivet, odvzemnikov namenjenih zbiranju vzorcev sline (Salivette® Cortisol, Sarstedt, Nemčija). Navodila za zbiranje sline s salivetami so predpisana s strani proizvajalca in prikazana na sliki 3. Vsaj 15 min pred odvzemom si preiskovanec ne sme umivati zob, jesti ali piti. Ob odvzemu je potrebno zabeležiti čas odvzema, nato pa se držati proizvajalčevih navodil za odvzem sline. Preiskovanec najprej odpre saliveto in iz nje vzame vpojno bombažno blazinico. To vstavi v usta, najbolje tako, da se pri tem s prsti ne dotika blazinice. Blazinico premika po ustih vsaj 45 s, ko je ta dobro omočena, jo vrne nazaj v saliveto in to dobro zapre. Tako zbrani vzorci sline so pripravljene za obdelavo v laboratoriju, do takrat pa jih je potrebno hraniti v zmrzovalniku (40). V okviru

raziskave so bili vzorci zbrani in do obdelave in analize shranjeni v zmrzovalniku pri -19°C .



Slika 3: Slikovna navodila za odvzem vzorcev sline s salivetami. Privzeto in prirejeno po (40).

3.2 METODE IN POGOJI MERITEV

3.2.1 Priprava vzorcev sline

V salivete zbrane vzorce sline smo najprej centrifugirali 2 min pri $2500 \times g$. Pri tem se v konico salivete, ki je posebej oblikovana, ujamejo delci in sluz, v zgornjem delu salivete pa dobimo čist vzorec sline. Blazinice smo po centrifugiranju zavrgli, centrifugirane vzorce sline smo do nadaljnje uporabe hranili v zmrzovalniku.

Pred analizo smo vzorce sline najprej temperirali na sobni temperaturi, dokler se niso odtalili in jih nato dobro premešali na stresalniku. V plastične mikrocentrifugirke smo odpipetirali $390 \mu\text{L}$ sline in dodali $20 \mu\text{L}$ 200 ng/mL raztopine IS ter dobro premešali na stresalniku. Končna koncentracija IS v vzorcih je 5 ng/mL . Nato smo dodali $390 \mu\text{L}$ raztopine 10 g/L cinkovega sulfata v 80% MeOH, dobro premešali na stresalniku in centrifugirali na mikrocentrifugi 10 min pri $12100 \times g$. Z opisanim korakom čiščenja vzorcev smo oborili proteine in s tem zmanjšali morebitne interference proteinov, ki so prisotni slini. Supernatant smo odpipetirali v vialo, te ustrezno označili in vzorci sline so bili pripravljene za analizo. Če je bilo zbranega vzorca sline premalo, smo ga pripravili iz $\frac{1}{2}$ volumna ($180 \mu\text{L}$ sline) ali $\frac{1}{4}$ volumna ($95 \mu\text{L}$ sline) in ustreznega volumna raztopine 10 g/L cinkovega sulfata v 80% MeOH in IS. Kadar smo vzorce pripravili iz $\frac{1}{2}$ volumna ali $\frac{1}{4}$ volumna, smo supernatant zaradi male količine vzorca odpipetirali v inserte v vialah. Ker je stabilnost vzorcev sline

neproblematična, smo si vzorce večkrat pripravili tudi vnaprej in jih do analize hranili v zmrzovalniku. Vsak vzorec smo pripravili v dveh paralelkah.

3.2.2 Priprava osnovnih raztopin in premice za preverjanje linearnosti

Za pripravo internega standarda, standardnih raztopin in raztopine 10 g/L cinkovega sulfata v 80 % MeOH smo najprej pripravili 80 %, 50 % in 20 % raztopine MeOH v vodi.

PRIPRAVA INTERNEGA STANDARDA

Izhodno raztopino internega standarda (IS) 100 µg/mL smo najprej redčili 100-krat, da smo dobili raztopino s koncentracijo 1000 ng/mL. 100 µL IS 100 µg/mL smo dodali 9,9 mL MeOH. Dobljeno raztopino 1000 ng/mL smo nadalje redčili 5-krat, 200 µL IS 1000 ng/mL smo dodali 800 µL 50 % raztopine MeOH. Dobljena končna raztopina IS ima koncentracijo 200 ng/mL. Končno raztopino IS 200 ng/mL smo alikvotirali v plastične krioviale in te do uporabe hranili v zmrzovalniku na -19 °C.

PRIPRAVA STANDARDNIH RAZTOPIN

Standardne raztopine smo pripravili s pomočjo standardnega materiala. Iz standardnega materiala smo najprej pripravili izhodno raztopino s koncentracijo 1 mg/mL. V plastično centrifugirko smo zatehtali 0,01 g standardnega materiala hidrokortizona in dodali 10mL MeOH. Iz dobljene izhodne standardne raztopine s koncentracijo 1 mg/mL smo pripravili sledeče standardne raztopine:

- 1000 ng/mL – izhodno standardno raztopino redčimo 1000-krat; odpipetiramo 1 µL izhodne standardne raztopine 1 mg/mL in dodamo 999 µL MeOH
- 100 ng/mL – standardno raztopino 1000 ng/mL redčimo 10-krat s 50 % raztopino MeOH; odpipetiramo 100 µL standardne raztopine 1000 ng/mL in dodamo 900 µL 50 % raztopine MeOH
- 10 ng/mL – standardno raztopino 100 ng/mL redčimo 10-krat s 50 % raztopino MeOH; odpipetiramo 100 µL standardne raztopine 100 ng/mL in dodamo 900 µL 50 % raztopine MeOH

Standardne raztopine smo pripravili v krioviale in jih hranili v zmrzovalniku do uporabe.

PRIPRAVA ZLIVKA SLINE

V salivete smo zbrali vzorce slin 7 naključnih zaposlenih v Laboratoriju za specialno laboratorijsko diagnostiko na Pediatrični kliniki, UKC Ljubljana. Vzorci so bili zbrani

popoldan. Zbrane vzorce smo centrifugirali 2 min pri $2500 \times g$. Centrifugirane vzorce smo zatem združili in dobro premešali na stresalniku. Združeno slino smo uporabili za preverjanje linearnosti, točnosti in kot notranjo kontrolo za preverjanje natančnosti.

PRIPRAVA RAZTOPIN STANDARDA ZA PREVERJANJE LINEARNOSTI

Izdelali smo dve premici, prvo v 20 % raztopini MeOH in drugo v zlivku sline (41, 42, 43, 44). Pripravili smo 5 raztopin standarda v koncentracijskem območju od 2,76 nmol/L do 55,2 nmol/L in vzorec s koncentracijo 0. Za izdelavo smo uporabili standardne raztopine 1000 ng/mL, 100 ng/mL in 10 ng/mL, 20 % raztopino MeOH in končno raztopino IS 200 ng/mL. Končna koncentracija IS v vseh pripravljenih raztopinah standarda je 5 ng/mL.

Pretvorbeni faktor iz ng/mL v nmol/L: $1 \text{ ng/mL} = 2,76 \text{ nmol/L}$.

Najprej smo izdelali premico v 20 % raztopini MeOH, kot je prikazano v preglednici I. Raztopine standarda smo pripravili v vialih in izmerili z LC-MS/MS.

Preglednica I: Priprava raztopin standarda za premico v 20 % MeOH.

Koncentracija raztopine standarda [nmol/L]	Volumen std/konc. std	Volumen 20% MeOH (μL)	Volumen IS 200ng/mL(μL)
0 (z IS)	/	487,5	12,5
2,76	5 μL 100ng/mL	482,5	12,5
55,4	10 μL 100ng/mL	477,5	12,5
11,0	20 μL 100ng/mL	467,5	12,5
27,6	5 μL 1000ng/mL	482,5	12,5
55,2	10 μL 1000ng/mL	477,5	12,5

Drugo premico smo izdelali v zlivku sline. Slini smo najprej dodali standardno raztopino, kot je prikazano v preglednici II.

Preglednica II: Priprava raztopin standarda za premico v zlivku sline.

Koncentracija raztopine standarda [nmol/L]	Volumen std/konc. std	Volumen zlivka sline (μL)
0	/	500
2,76	5 μL 100ng/mL	495
55,4	10 μL 100ng/mL	490
11,0	20 μL 100ng/mL	480
27,6	5 μL 1000ng/mL	495
55,2	10 μL 1000ng/mL	490

Tako pripravljene raztopine standarda v zlivku sline smo obdelali kot vzorce sline, glej poglavje 3.2.1. Priprava vzorcev sline. Dobljeni supernatant smo odpipetirali v vialo in izmerili z LC-MS/MS.

PRIPRAVA RAZTOPINE CINKOVEGA SULFATA

Za pripravo 50 mL raztopine smo zatehtali 0,89 g cinkovega sulfata in dodali 50 mL 80 % MeOH. Količina zadostuje za pripravo približno 125 vzorcev. Pripravljeno raztopino smo hranili v hladilniku največ 3 mesece in po potrebi pripravili svežo.

PRIPRAVA MOBILNIH FAZ

MF A in MF B smo vedno pripravili sveži na dan merjenja.

- MF A: voda + 0,1 % mravljična kislina + 2 % izopropanol

Z merilnimi valji smo odmerili 489,5 mL vode in 10 mL izopropanola. Odmerjeni količini vode in izopropanola smo združili v 500 mL bučko in dobro premešali. Na koncu smo v bučko odpipetirali še 500 µL mravljične kisline in ponovno dobro premešali.

- MF B: MeOH + 0,1 % mravljična kislina + 2 % izopropanol

Z merilnimi valji smo odmerili 489,5 mL MeOH in 10 mL izopropanola. Odmerjeni količini MeOH in izopropanola smo združili v 500 mL bučko in dobro premešali. Na koncu smo v bučko odpipetirali še 500 µL mravljične kisline in ponovno dobro premešali.

3.2.3 Priprava kontrolnega materiala

Zaradi nedostopnosti kontrolnega materiala sline smo za kontrolni material uporabili liofiliziran človeški serum. Liofiliziran serum smo morali naprej rekonstituirati po sledečem postopku:

1. Ampulo z liofiliziranim človeškim serumom najprej ogrejemo na sobno temperaturo.
2. Ampulo rahlo potresemo tako, da je ves liofilizat zbran na dnu ampule.
3. Prelomimo ampulo na za to označenem mestu, pri čemer pazimo, da se morebitni delci stekla ne zmešajo z vsebino ampule.
4. Rekonstituiramo liofilizat s počasnim dodajanjem 1,25 mL vode, ki mora biti prav tako ogreta na sobno temperaturo 20-22 °C.

5. Ampulo zapremo s parafilmom in nekajkrat previdno obrnemo ter rahlo stresemo, nato pustimo stati 20 min, po 20 min pa spet narahlo pretresemo in počakamo še 10 min.
6. Tako rekunstituiran liofiliziran človeški serum je pripravljen za uporabo.

Kontrolni serumski material smo pred analizo redčili 1:10. 100 μ L kontrolnega materiala smo dodali 25 μ L 200 ng/mL raztopine IS, to smo dobro premešali na stresalniku. Za tem smo dodali 775 μ L vode in 100 μ L raztopine 10 g/L cinkovega sulfata v 80 % MeOH. Končna koncentracija IS v serumskem kontrolnem materialu je 5 ng/mL. Serumski kontrolni material smo uporabili za ugotavljanje natančnosti metode.

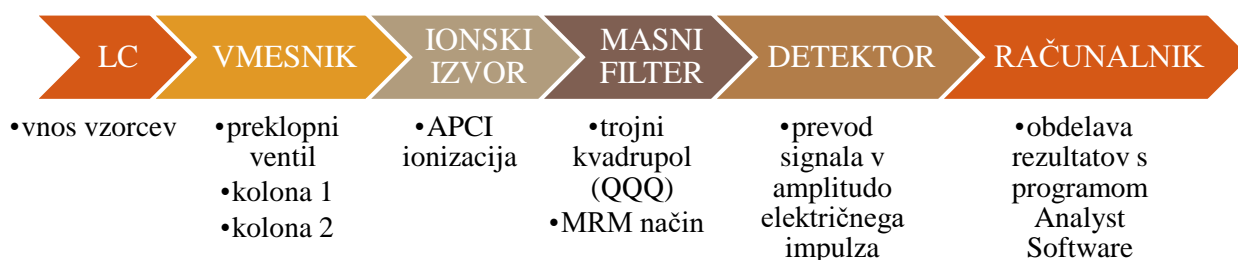
Sami smo pripravili tudi notranji kontrolni material sline. Tega smo pripravili iz zlivka sline, ki smo ga pred merjenjem obdelali enako kot vzorce sline, glej poglavje 3.2.1 Priprava vzorcev sline.

3.2.4 LC-MS/MS pogoji in potek analize vzorcev

Kortizol v vzorcih sline smo merili z LC-MS/MS metodo prirejeno po metodi Casetta B., AB SCIEX-a (41), podobne metode so opisane tudi v drugih literaturnih virih (42, 43, 44). Uporabili smo APCI ionizacijo in QQQ masni filter, ki je deloval v načinu MRM. Analiza enega vzorca je trajala 20 min. LC-MS/MS aparat je prikazan na sliki 4, shema analize z LC-MS/MS pa na sliki 5.



Slika 4: LC-MS/MS aparat (fotografija je bila posneta v presnovnem laboratoriju Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko na Pediatrični kliniki).



Slika 5: Shema analize z LC-MS/MS aparatom.

LC aparat smo uporabili kot črpalko za prenos vzorcev do preklopnega ventila (VICI, Valco Instruments Co. Inc., Kanada) na MS in za spreminjanje sestave MF. Spreminjanje sestave MF je prikazano v preglednici III.

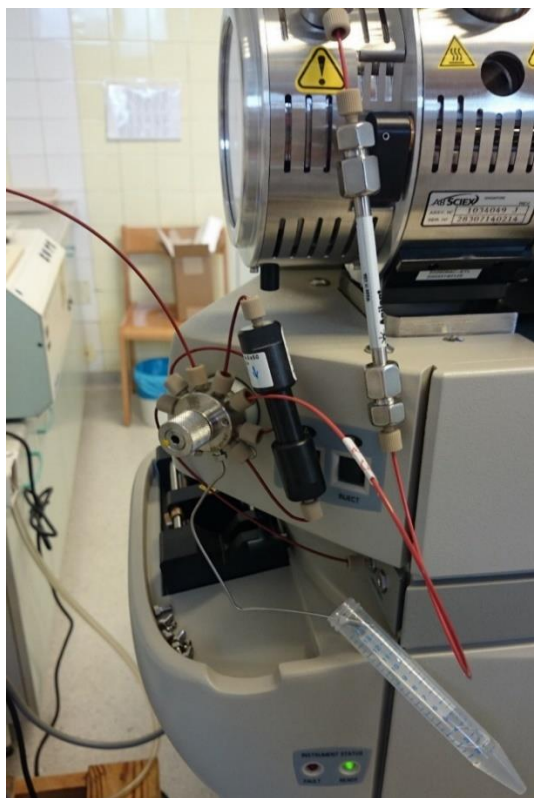
Pogoji meritev:

- pretok MF: 600 $\mu\text{L}/\text{min}$
- volumen injiciranega vzorca: 100 μL
- temperatura kolone 1 in 2: sobna temperatura ($25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1$)

Preglednica III: Spreminjanje sestave MF.

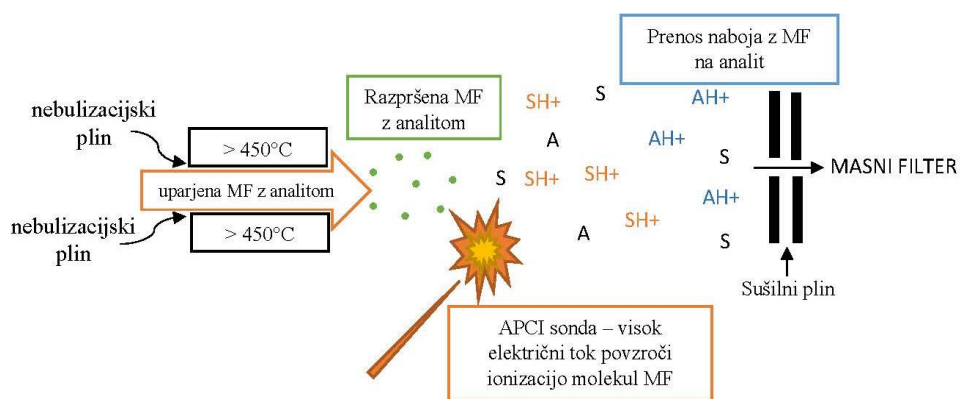
Čas [min]	Delež MF A [%]	Delež MF B [%]	POLOŽAJ VENTILA
0.1	80	20	A
7.0	80	20	A
9.0	5	95	B
15.0	5	95	B
15.5	80	20	B
20.0	80	20	B

Vmesnik med LC in MS predstavlja preklopni ventil, na katerega smo vezali kolono 1 in kolono 2, kot je prikazano na sliki 6. Ko je preklopni ventil na položaju A, LC črpalka injicira vzorec slin z MF na kolono 1 PorosTM R1 10 μm , $4.6 \times 50\text{ mm}$, 0.8 mL. Ta kolona služi čiščenju vzorca, analit se zadrži na koloni, ostale sestavine v vzorca pa se sperejo v odpad. Govorimo o analizi, ki jo v literaturi zasledimo pod imenom "on-line sample clean up" ali "on-line SPE". Po 7 min sledi preklon ventila na položaj B in injiciranje prečiščenega vzorca na kolono 2 ZORBAX Eclipse Plus C18, $4.6 \times 100\text{ mm}$, 3.5 μm , ki je direktno vezana na MS aparat. Na tej koloni se sestavine vzorca kromatografsko ločijo in z MF prenesejo do ionskega izvora.



Slika 6: Preklopni ventil z vezano kolono 1 (črne barve) in kolono 2 (srebrne barve) (fotografija je bila posneta v presnovnem laboratoriju Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko na Pediatrični kliniki).

Na ionskem izvoru se vzorec najprej upari, zatem pa poteče proces ionizacije. Uporabili smo APCI ionizacijo, katere princip je prikazan na sliki 7.



Slika 7: Postopek APCI ionizacije (36); S – molekule mobilne faze, SH+ - ionizirane molekule mobilne faze, A – molekule analita, AH+ - ionizirane molekule analita.

Ko vzorec z MF pripotuje do ionskega izvora se v nebulizatorju upari in razprši s pomočjo razprševalnega plina in grelnih elementov. Pri tem nastanejo drobne kapljice MF z analitom. Polarne komponente MF kapljic se ionizirajo pod vplivom visokega električnega toka. Uporabili smo metodo APCI v pozitivnem načinu (APCI+), kar pomeni, da se na molekule MF prenesejo protoni. MF nato deluje kot šibek donor H⁺ ionov, pozitivni naboj se torej

sčasoma prenese na molekule analita. Ioniziran vzorec se usmeri do masnega filtra (36). Najpomembnejši parametri tandemskega masnega spektrometra (MS/MS) so zbrani v preglednici IV.

Preglednica IV: Parametri MS/MS analize.

Parameter	Vrednost
Tlak razprševalnega plina (CUR, angl. curtain gas)	20 psi (1,4 bar)
Tlak kolizijskega plina (CAD, angl. collision gas)	medium
Napetost nebulizatorja (NC, angl. nebulizer Current)	4000 V
Temperatura (TEM, angl. temperature)	450 °C
Tlak ionskega izvora 1 (GS1, angl. ion Surce Gas1)	50 psi (3,4 bar)
Tlak ionskega izvora 2 (GS1, angl. ion Surce Gas1)	0 psi

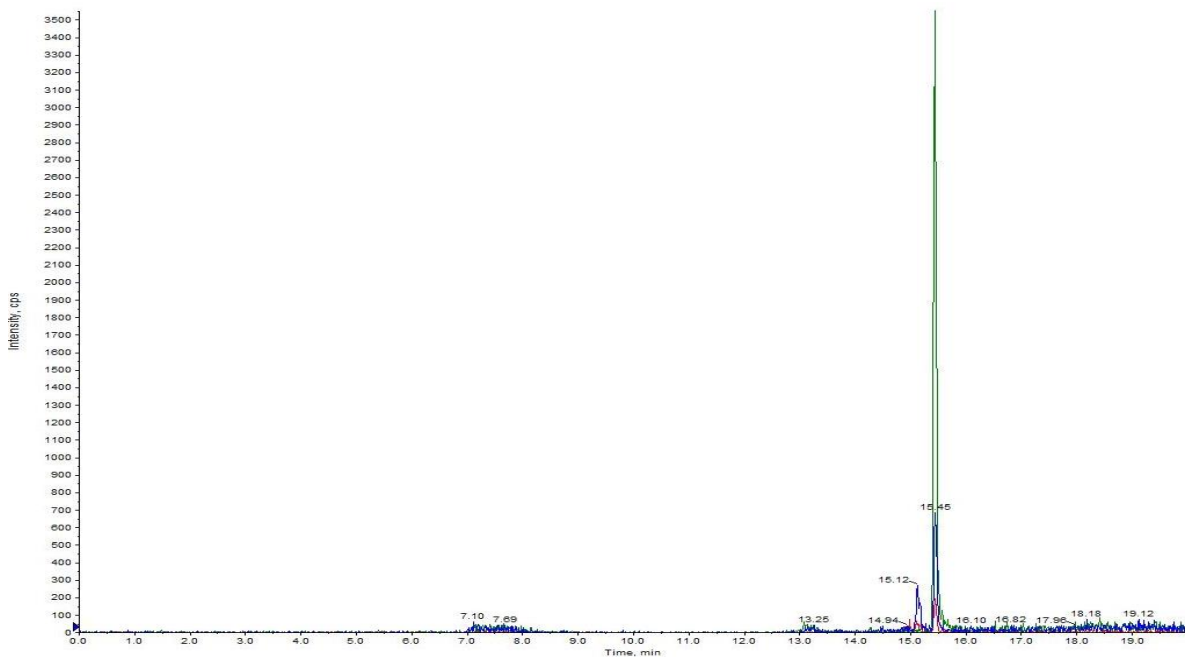
Ko so molekule analita ionizirane, jih lahko masni filter loči glede na razmerje m/z . Masni filter, ki smo ga uporabili je QTRAP® 3200 LC-MS/MS System. Gre za hibridni masni filter, ki združuje lastnosti QQQ in IT in s tem omogoča več različnih načinov delovanja. Deluje lahko kot IT masni filter, kot QQQ masni filter ali pa kot hibrid trojnega kvadrupola in ionske pasti (QTRAP). Sami smo za analizo smo uporabili QTRAP analizator v QQQ načinu.

QQQ analizator je sestavljen iz štirih kovinskih palic, ki so razporejene v kvadrat. Kovinske palice so pod električno napetostjo in ustvarjajo elektromagnetno polje, to pa določa, kateri ioni, glede na m/z , bodo prešli filter. Pri trojnem kvadrupolu imamo zaporedno vezane tri kvadrupole. Pri MRM načinu merjenja nastavimo specifično vrednost m/z na prvem (Q1) in tretjem (Q3) kvadrupolu, drugi kvadrupol (Q2) pa služi kot kolizijska celica. Ionizirane molekule analita priletijo v Q1, ki prepušča le molekule s specifično m/z , v našem primeru molekule kortizola. V Q2 se molekule kortizola fragmentirajo s kolizijskim plinom, Q3 pa nato prepušča le specifične m/z nastalih fragmentov. MRM način merjenja omogoča visoko specifično detekcijo analitov z izbrano m/z . Seveda pa mora biti znan način fragmentacije in m/z nastalih fragmentov, ki jih želimo detektirati (36). Nastavitve masnega filtra v MRM načinu za kortizol in IS so prikazane v preglednici V.

Preglednica V: Pogoji trojnega kvadrupola za MRM analizo kortizola.

analit	m/z Q1 [Da]	m/z Q3 [Da]	kolizijska energija [V]
kortizol	363,242	121,100	33000
kortizol-D ₄ (IS)	367,300	121,100	33000

Retencijski čas kortizola in IS je 15.4 min, primer dobljenega kromatograma je prikazan na sliki 8.



Slika 8: Primer kromatograma analize kortizola.

Vzorce smo analizirali v serijah, kot prikazuje preglednica VI, število analiziranih vzorcev pa je bilo odvisno od razpoložljivosti LC-MS/MS aparata. Dobljene rezultate smo obdelali s programom Analyst® 1.6.2.

Preglednica VI: Primer serije pripravljene za analizo z LC-MS/MS; B – slepi vzorec, K – kontrolni serum, KS – notranja kontrola sline, VZ – vzorec sline

B	B	K	B	KS	B	VZ 1 ob času 0'	VZ 1 ob času 0'	B	VZ 1 ob času 60'
VZ 1 ob času 60'	B	VZ 2 ob času 0'	VZ 2 ob času 0'	B	VZ 2 ob času 60'	VZ 2 ob času 60'	B	VZ 3 ob času 0'	VZ 3 ob času 0'
B	VZ 3 ob času 60'	VZ 3 ob času 60'	B	VZ 4 ob času 0'	VZ 4 ob času 0'	B	VZ 4 ob času 60'	VZ 4 ob času 60'	B
VZ ob času 0'	VZ 5 ob času 0'	B	VZ 5 ob času 60'	VZ 5 ob času 60'	B	VZ 6 ob času 0'	VZ 6 ob času 0'	B	VZ 6 ob času 60'
VZ 6 ob času 60'	B	VZ 7 ob času 0'	VZ 7 ob času 0'	B	VZ 7 ob času 60'	VZ 7 ob času 60'	B	VZ 8 ob času 0'	VZ 8 ob času 0'
B	VZ 8 ob času 60'	VZ 8 ob času 60'	B	VZ 9 ob času 0'	VZ 9 ob času 0'	B	VZ 9 ob času 60'	VZ 9 ob času 60'	B
VZ 10 ob času 0'	VZ 10 ob času 0'	B	VZ 10 ob času 60'	VZ 10 ob času 60'	B	B			

3.3 VERIFIKACIJA METODE IN STATISTIČNA ANALIZA

Občutljiva, specifična, natančna in točna metoda je nujna za kvantitativno merjenje analita v biološkem vzorcu. Parametri, ki smo jih vrednotili so linearnost, natančnost, točnost, določili smo razmerje šum/signal (S/N angl. signal to noise ratio) in mejo kvantifikacije (LOQ, angl. limit of quantification). Ocenili smo tudi vpliv matriksa vzorca na odziv analiznega inštrumenta. Pri tem smo se ravnali po priporočilih za overjanje (verifikacijo) merilnega postopka in instrumenta v kliničnem laboratoriju (45). Statistično analizo smo izvedli s programi Analyst® 1.6.2, Microsoft Office Excel 2016 in SPSS.

LINEARNOST

Analizna metoda je linearna, če je odziv LC-MS/MS premosorazmeren s koncentracijo analita. Linearnost preverjamo s statistično obdelavo odzivov standardnih vzorcev z metodo linearne regresije. Rezultat je umeritvena premica (UP), enačba 1, ki opisuje odnos med koncentracijo analita in odzivom (46).

Enačba 1:

$$y = kx + n$$

y ... razmerje površin pod kromatografskim vrhom analita in IS

k ... naklon premice

x ... koncentracija analita v vzorcu

n ... odsek na ordinati

Za preverjanje linearnosti smo pripravili 5 raztopin standarda v MeOH in v zlivku slin, kot je opisano v poglavju 3.2.2. Priprava osnovnih raztopin in premice za preverjanje linearnosti. Umeritveno premico smo izdelali s pomočjo programa Microsoft Office Excel 2016. Odnos med koncentracijo in odzivom smo ovrednotili z determinacijskim koeficientom (r^2). Kot mejo sprejemljivosti smo postavili kriterij $r^2 > 0,99$.

NATANČNOST

Natančnost (ponovljivost) je pojem, ki opisuje ujemanje med izmerjenimi vrednostmi, ki jih dobimo z večkratnimi meritvami analita pri ponovljivih pogojih, kar pomeni z isto metodo, v istem laboratoriju, z isto opremo in istim izvajalcem analize (45). Natančnost podamo s standardnim odklonom (SD), izračunamo jo s pomočjo enačbe 2.

Enačba 2:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

x_i ... vrednost posamezne meritve

\bar{x} ... povprečna vrednost meritev

n ... število meritev

Vrednost SD uporabimo za izračun relativne standardne deviacije (RSD) kot prikazuje enačba 3. Manjša kot je vrednost SD ali RSD, bolj natančna je metoda (47). Sprejemljiva meja natančnosti je 15 %.

Enačba 3:

$$RSD = 100 * \frac{SD}{\bar{x}}$$

Za ugotavljanje natančnosti smo uporabili serumski kontrolni material in notranjo kontrolo sline. Ugotavljali smo natančnost znotraj dneva in med dnevi. Za določanje natančnosti metode znotraj dneva smo pripravili 6 paralelk serumskega kontrolnega materiala in 6 paralelk notranje kontrole sline, kot je opisano v poglavju 3.2.2 Priprava osnovnih raztopin in premice za preverjanje linearnosti. Te smo izmerili znotraj enega dneva v eni seriji. Natančnost metode med dnevi smo preverjali tako, da smo v serijah poleg vzorcev sline analizirali tudi serumski kontrolni material in notranjo kontrolo sline. Povprečno vrednost meritev, SD in RSD smo izračunali s programom Microsoft Office Excel 2016.

TOČNOST

Točnost je pojem, ki opisuje ujemanje med izmerjeno in pravo vrednostjo analita, ki ga merimo. Točnost določimo z analizo vzorcev z znano koncentracijo analita. Odstopanje rezultata posamezne meritve od pravilne (ciljne) vrednosti izrazimo v obliki relativne napake (RE), ki jo izračunamo po enačbi 4 (46).

Enačba 4:

$$RE [\%] = \frac{\bar{x}_{izmerjena} - \bar{x}_{ciljna}}{\bar{x}_{ciljna}} * 100$$

Točnost metode smo preverjali tako, da smo pripravili 2 koncentraciji raztopine standarda, prvo s koncentracijo 4,14 nmol/L in drugo s koncentracijo 41,4 nmol/L. Raztopini standarda smo pripravili v 5 paralelah v zlivku slin.

- Raztopina standarda s koncentracijo 4,14nmol/L v zlivku slin

Raztopino smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirko odpipetirali 492,5 µL zlivka slin in 7,5 µL standardne raztopine 100 ng/mL ter dobro premešali na stresalniku. Tako pripravljeno raztopino standarda v zlivku slin smo obdelali kot vzorce slin, glej poglavje 3.2.1 Priprava vzorcev slin. Dobljeni supernatant smo odpipetirali v vialo in izmerili z LC-MS/MS.

- Raztopina standarda s koncentracijo 41,4nmol/L v zlivku slin

Raztopino smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirko odpipetirali 492,5 µL zlivka slin in 7,5 µL standardne raztopine 1000 ng/mL ter dobro premešali na stresalniku. Tako pripravljeno raztopino standarda v zlivku slin smo obdelali kot vzorce slin, glej poglavje 3.2.1 Priprava vzorcev slin. Dobljeni supernatant smo odpipetirali v vialo in izmerili z LC-MS/MS. Kriterij, ki smo ga postavili za točnost je $\pm 15 \%$.

RAZMERJE SIGNAL/ŠUM IN MEJA KVANTIFIKACIJE

LOQ je najnižja koncentracija analita v vzorcu, ki jo lahko z analizno metodo ponovljivo kvantificiramo. Določamo jo lahko na različne načine. Lahko gre za vizualno oceno, lahko bazira na razmerju S/N ali pa jo določimo s pomočjo SD meritev standardnih vzorcev in UP (26,44). Za določitev LOQ smo uporabili razmerje S/N, ki smo ga določili s programom Analyst® 1.6.2. Razmerje S/N ne sme biti manjše od 10.

VPLIV MATRIKSA

LC-MS/MS je analizna metoda visoke občutljivosti in selektivnosti, ena izmed njenih slabosti pa je vpliv matriksa na ionizacijo analita in posledično na točnost in natančnost metode. Matriks predstavljajo vse komponente vzorca, ki niso analit. Lahko gre za spojine, ki so normalno prisotne v bioloških vzorcih, lahko so metaboliti in razgradnji produkti analita, razne nečistote ali pa eksogene snovi npr. zdravila in njihovi metaboliti. Omenjene komponente matriksa vzorca lahko tekmujejo z analitom v procesu ionizacije v ionskem izvoru in s tem povečajo ali zmanjšajo učinkovitost ionizacije ter posledično vplivajo na odziv analitskega inštrumenta. Pojav imenujemo vpliv matriksa (angl. "matrix effect").

Vpliv matriksa lahko zmanjšamo z ustrezno pripravo vzorcev, optimizacijo kromatografskih pogojev in posledično dobro kromatografsko ločbo, ustrezno izbiro tipa ionizacije in uporabo stabilnih izotopsko označenih internih standardov. Ocena vpliva matriksa je zato pomemben del validacije metod. Po FDA smernicah je določitev vpliva matriksa predvidena, vendar ni navedenega postopka izvedbe poskusa. Vpliv matriksa smo zato ocenili z izdelavo različnih koncentracij raztopin standarda v zlivku slin s postopkom redčenja, kot so naredili *Owen L.J. in sod.* (42). Kadar je prisoten vpliv matriksa, se pripravljene redčitve porazdeljujejo nelinearno, če pa vpliva matriksa ni, pa se redčitve porazdeljujejo linearno (46,48,49).

Najprej smo pripravili raztopino standarda s koncentracijo 54,1 nmol/L v slini. Raztopino smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirko odpipetirali 500 µL zlivka slin in 10 µL standardne raztopine 1000 ng/mL ter dobro premešali na stresalniku. Slini smo nato obdelali kot vzorce slin, glej poglavje 3.2.1 Priprava vzorcev slin. Nato smo po opisanem postopku pripravili še en vzorec raztopine standarda s koncentracijo 54,1 nmol/L v slini, ki pa smo ga po pripravi redčili z 20 % raztopino MeOH v razmerju 1:1, 1:2 in 1:3. 20 % raztopini MeOH smo dodali tudi IS. S tem smo zagotovili, da ostane koncentracija IS po redčenju vzorcev nespremenjena, torej 5 ng/mL. Z redčenjem smo pripravili tri dodatne raztopine standarda s koncentracijami 27,0 nmol/L (redčitev 1:1), 18,0 nmol/L (redčitev 1:2) in 13,5 nmol/L (redčitev 1:3). Pripravili smo tudi ničelni vzorec s koncentracijo 0 nmol/L. 487,5 µL 20 % raztopine MeOH smo dodali 12,5 µL IS. Vse vzorce smo pripravili v 3 paralelah in jih izmerili z LC-MS/MS. Koncentracijo standarda v pripravljenih raztopinah standarda smo izračunali s pomočjo IS po enačbi 5, enako kot smo izračunali neznane koncentracije kortizola v vzorcih slin. Podobno kot pri preverjanju linearnosti metode, želimo tudi tukaj opredeliti odnos med koncentracijo standarda in razmerjem odziva analit/IS. V kolikor je premica, ki jo dobimo linearna, to pomeni, da je učinek matriksa zanemarljiv.

IZRAČUN NEZNANIH KONCENTRACIJ KORTIZOLA V VZORCIH SLIN

Za izračun neznanih koncentracij kortizola v vzorcih slin uporabimo metodo internega standarda. Pri tej metodi med pripravo vzorcev k vsakemu vzorcu dodamo enako količino IS, površino odziva IS pa nato uporabimo za kvantifikacijo analita v vzorcu. Uporabili smo devterirani IS kortizol-D4, ki smo ga dodali vsem vzorcem slin. Kvantifikacijo smo izvedli tako, da smo primerjali površine kromatografskih vrhov kortizola in IS, kot prikazuje *enačba 5* (50). Ker se IS kemično in kromatografsko skoraj do popolnosti enako obnaša kot analit,

lahko z omenjenim pristopom korigiramo napake, ki nastanejo med pipetiranjem vzorcev, med ekstrakcijo, med ionizacijo ali med detekcijo.

Enačba 5:

$$\text{koncentracija kortizola}(c_{kort.}) = \frac{\text{površina vrha analita}(S_{kort.})}{\text{površina vrha IS}(S_{IS})} \times \text{koncentracija IS}(c_{IS})$$

Dobljeno koncentracijo kortizola smo pretvorili v SI enote in upoštevali redčitveni faktor. Pretvorbeni faktor: 1 ng/mL = 2,76 nmol/L, redčitveni faktor: 2,05.

OBDELAVA IZMERJENIH KONCENTRACIJ KORTIZOLA V KONTROLNI SKUPINI IN SKUPINI S SBT1

Dobljene koncentracije kortizola in druge zbrane podatke o spolu, starosti in času odvzema vzorcev smo obdelali s programom SPSS. Naredili smo več analiz:

- ∞ Osnovna opisna statistika za kontrolno skupino in skupino bolnikov s SBT1.
- ∞ Primerjava starostne porazdelitve in izmerjenih koncentracij kortizola kontrolne skupine in skupine s SBT1 ob času 0'. Naredili smo t-test za dva neodvisna vzorca.
- ∞ Primerjava izmerjenih koncentracij kortizola ob času 0' in 60' znotraj posameznih skupin. Naredili smo T-test za dva odvisna vzorca.
- ∞ Korelacija med serumskimi koncentracijami kortizola in koncentracijami kortizola v slini. Naredili smo korelacijsko analizo.

Za primerjavo skupin smo upoštevali stopnjo tveganja $\alpha=0,05$ (5 %).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 LINEARNOST

Linearnost je sposobnost metode, da daje znotraj določenega koncentracijskega območja rezultate, ki so premosorazmerni s koncentracijo analita v vzorcu (46). Linearnost smo preverjali tako, da smo pripravili 5 raztopin standarda v MeOH in v zlivku sline, kot je opisano v poglavju 3.2.2 Priprava osnovnih raztopin in umeritvene premice. V preglednici VII je podana koncentracija raztopine standarda in razmerje odzivov (analit/IS) za premico pripravljeno v MeOH, v preglednici VIII pa za premico pripravljeno v zlivku sline. Kot odziv lahko uporabljamo površine ali višine dobljenih kromatografskih vrhov. Mi smo pri vseh izračunih uporabljali površine kromatografskih vrhov.

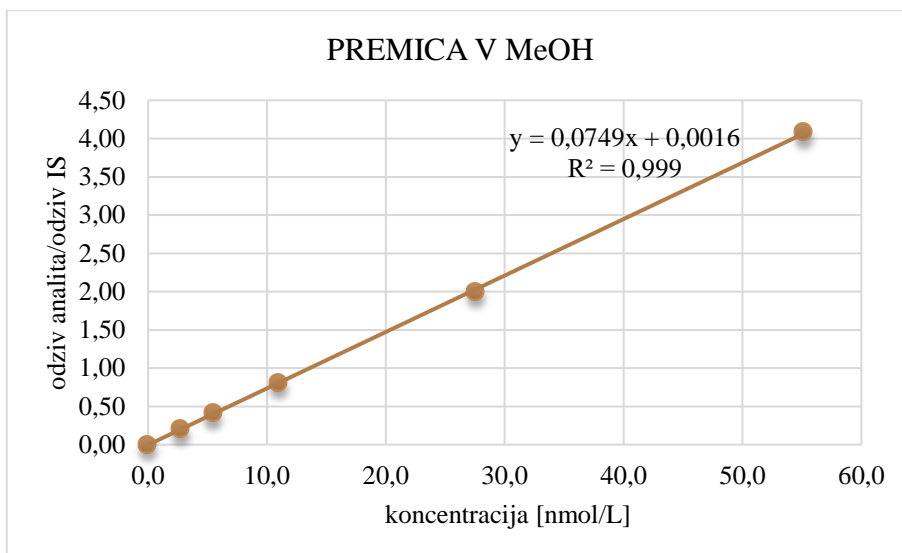
Preglednica VII: Koncentracija raztopine standarda in razmerje odzivov (analit/IS) za premico pripravljeno v MeOH.

premica v 20 % MeOH	
koncentracija raztopine standarda [nmol/L]	razmerje odzivov (analit/IS)
0 (z dodanim IS)	0,00
2,76	0,21
5,52	0,41
11,0	0,81
27,6	2,00
55,2	4,08

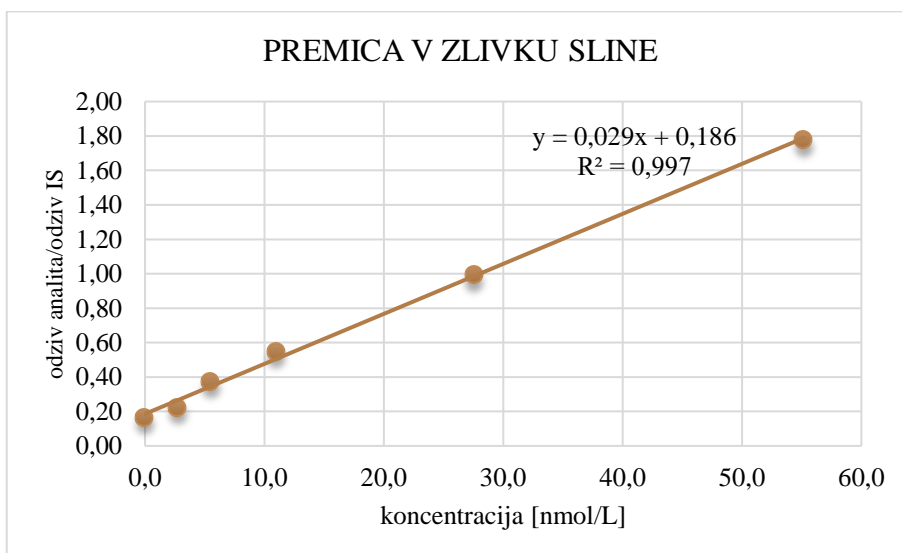
Preglednica VIII: Koncentracija raztopine standarda in razmerje odzivov (analit/IS) za premico pripravljeno v zlivku sline.

premica v zlivku sline	
koncentracija raztopine standarda [nmol/L]	razmerje odzivov (analit/IS)
0 (z dodanim IS)	0,166
2,76	0,224
5,52	0,373
11,0	0,548
27,6	0,992
55,2	1,778

Iz odzivov smo s programom Microsoft Office Excel 2016 določili enačbi premic v MeOH in v zlivku sline. Določili smo tudi determinacijski koeficient (r^2). Slika 9 prikazuje UP v MeOH in slika 10 UP v zlivku sline. Na *y* osi je podano razmerje odzivov (analit/IS), na *x* osi pa izmerjena koncentracija.



Slika 9: Premica pripravljena v MeOH.



Slika 10: Premica pripravljena v zlivku sline.

Determinacijski koeficient (r^2) za UP v MeOH znaša 0,999 in za UP v zlivku sline 0,997. Metoda za določanje kortizola v slini je linearna merjenem območju v obeh primerih, saj vrednosti r^2 ustrezajo kriteriju $r^2 > 0,990$.

4.2 NATANČNOST

Natančnost je merilo ponovljivosti rezultatov v seriji meritev (natančnost znotraj dneva) ali med serijami meritev (natančnost med dnevi). Natančnost nam daje informacije o naključnih napakah in jo številčno izrazimo z merjenjem nenatančnosti, rezultat pa podamo kot SD ali RSD (45,47). Natančnost metode znotraj dneva smo preverili z meritvijo 6 paralelek serumskega kontrolnega materiala in 6 paralelek notranje kontrole sline znotraj enega dneva

v eni seriji. Koncentracijo kortizola v serumu in slini smo izračunali po enačbi 5 s pomočjo IS. Iz dobljenih koncentracij smo izračunali povprečno vrednost, SD in RSD. Rezultati so predstavljeni v preglednici IX.

Preglednica IX: Natančnost metode znotraj dneva.

	\bar{x} [nmol/L]	SD [nmol/L]	RSD [%]
serumski kontrolni material	321	21,4	6,64
notranja kontrola sline	4,99	0,62	12,4

Koncentracija kortizola v rekonstituiranem serumskem kontrolnem materialu, navedena na certifikatu ERM®-DA193 je 273 ± 6 nmol/L. Koncentracija, ki smo jo izmerili z LC-MS/MS je 321 nmol/L, kar odstopa od navedene koncentracije na certifikatu ERM®-DA193. Ker smo določali koncentracijo kortizola v slini in ne v serumu, je lahko vzrok za odstopanje metoda LC-MS/MS, ki je prirejena za določanje kortizola v vzorcih sline in ne za določanje kortizola v serumskih vzorcih. Za ugotavljanje natančnosti nas ne zanima odstopanje od prave vrednosti, ampak ponovljivost meritev. RSD, ki smo ga dobili je 6,64 %, kar kaže na zelo dobro ponovljivost rezultatov. Vrednost RSD je znotraj postavljene meje 15 %, kar pomeni, da je natančnost metode znotraj dneva ustrezna. Preverjali smo natančnost metode znotraj dneva tudi z notranjo kontrolo sline. Dobljeni RSD je 12,4%. Nenatančnost je nekoliko večja od serumskega kontrolnega materiala, vendar še vedno znotraj postavljene meje 15 %.

Preverjali smo natančnost metode med dnevi. V vsaki seriji meritev vzorcev sline otrok, smo izmerili tudi vzorec serumskega kontrolnega materiala in notranje kontrole sline. Vseh izmerjenih vzorcev je bilo 8, rezultati so podani v preglednici X.

Preglednica X: Natančnost metode med dnevi.

	\bar{x} [nmol/L]	SD [nmol/L]	RSD [%]
serumski kontrolni material	303	20,5	6,75
notranja kontrola sline	5,48	0,37	6,80

Povprečje vzorcev serumskega kontrolnega materiala še vedno odstopa od navedene koncentracije na certifikatu ERM®-DA193, vendar manj kot pri določanju natančnosti znotraj dneva. RSD vzorcev serumskega kontrolnega materiala med dnevi je 6,75 %. Rezultat je podoben natančnosti znotraj dneva in ustreza postavljenemu kriteriju. RSD

vzorcev notranje kontrole sline znaša 6,80 %, kar kaže na boljšo ponovljivost rezultatov med dnevi kot znotraj dneva. Boljša ponovljivost rezultatov med dnevi je lahko tudi posledica večjega števila vzorcev, ki smo ga uporabili za izračun ponovljivosti med dnevi.

Vrednosti RSD znotraj dneva in med dnevi, ki smo jih določili so znotraj sprejemljive meje 15%. Rezultati ustrezajo postavljeni zahtevi natančnosti, metoda LC-MS/MS za določanje kortizola v vzorcih sline je torej dovolj natančna, tako znotraj dneva kot med dnevi.

4.3 TOČNOST

Ugotavljanjem točnosti metode določamo stopnjo ujemanja izmerjene koncentracije z dejansko koncentracijo analita v vzorcu. Točnost nam daje informacije o sistemskih napakah, med katerimi so najpogostejše napake analitika, analiznih inštrumentov in analizne metode. Vse naštetje lahko vplivajo na pravilnost analiznega postopka (45).

Za ugotavljanje točnosti smo pripravili raztopini standarda s koncentracijo 4,14 nmol/L in 41,4 nmol/L v zlivku sline v 5 paralelah, ki smo jih izmerili v eni seriji. Koncentracijo standarda v raztopini standarda smo izračunali s pomočjo pripravljene premice v zlivku sline ($y=0,029x+0,186$) in s pomočjo IS po enačbi 5, nato smo podali povprečno vrednost izračunanih koncentracij in izračunali RE [%]. Rezultati so zbrani v preglednici XI.

Preglednica XI: Izračun koncentracije standarda s pomočjo premice v zlivku sline in s pomočjo IS. Podano je povprečje in RE izračunanih vrednosti standarda v raztopinah.

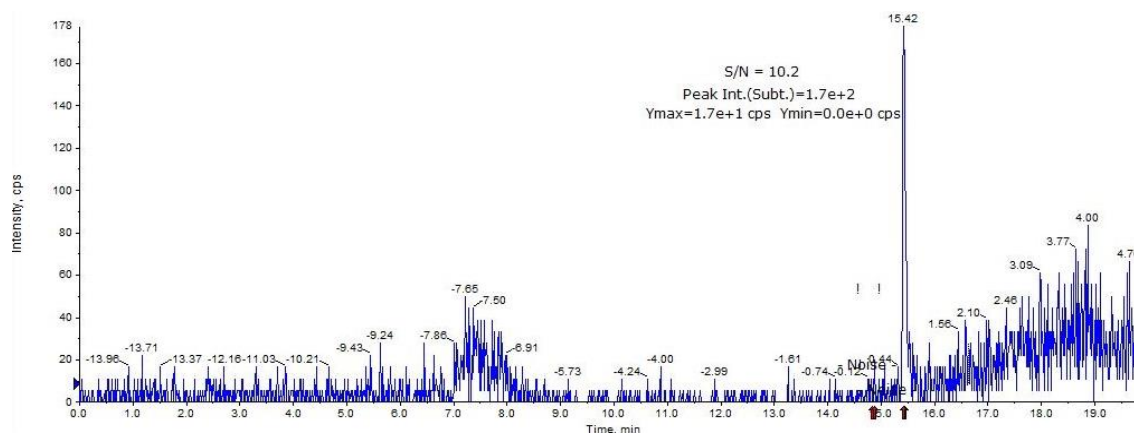
koncentracija raztopine standarda [nmol/L]	izračun koncentracije standarda na premico v zlivku	izračun koncentracije standarda na IS
4,14 nmol/L	2,52	2,73
	1,79	2,14
	3,62	3,63
	3,97	3,91
	3,79	3,77
povprečje [nmol/L]	3,14	3,24
RE [%]	-24,2	-21,6
41,4 nmol/L	41,5	34,7
	42,7	35,7
	45,5	38,0
	48,4	40,4
	41,7	34,9
povprečje [nmol/L]	44,0	36,8
RE [%]	6,44	-11,0

Iz preglednice 11 je razvidno, da sta vrednosti RE -24,2 % in -21,6 % pri nizkih koncentracijah, pri visokih koncentracijah pa 6,44 % in -11,0 %, odvisno od izračuna. Predvsem pri nizkih koncentracijah vrednosti RE presegajo postavljeno mejo ± 15 %. Vzrok za določen odstotek netočnost so lahko napake pri pripravi raztopin in vzorcev, saj smo material za ugotavljanje točnosti pripravili sami. Poleg tega zlivek slin, v katerega smo dodali znano koncentracijo kortizola, vsebuje določeno koncentracijo endogenega kortizola, ki smo ga morali pri izračunu upoštevati.

Čeprav so nekateri avtorji za sprejemljivo mejo točnosti vzeli vrednosti RE 20 % (26,51), se zavedamo, da bi morali metodo pred rutinsko uporabo dodatno preveriti z uporabo certificiranih materialov. Prav tako bi morali točnost preveriti na več različnih koncentracijskih nivojih, kar pa v našem primeru ni bilo možno zaradi premajhne zbrane količine zlivka slin.

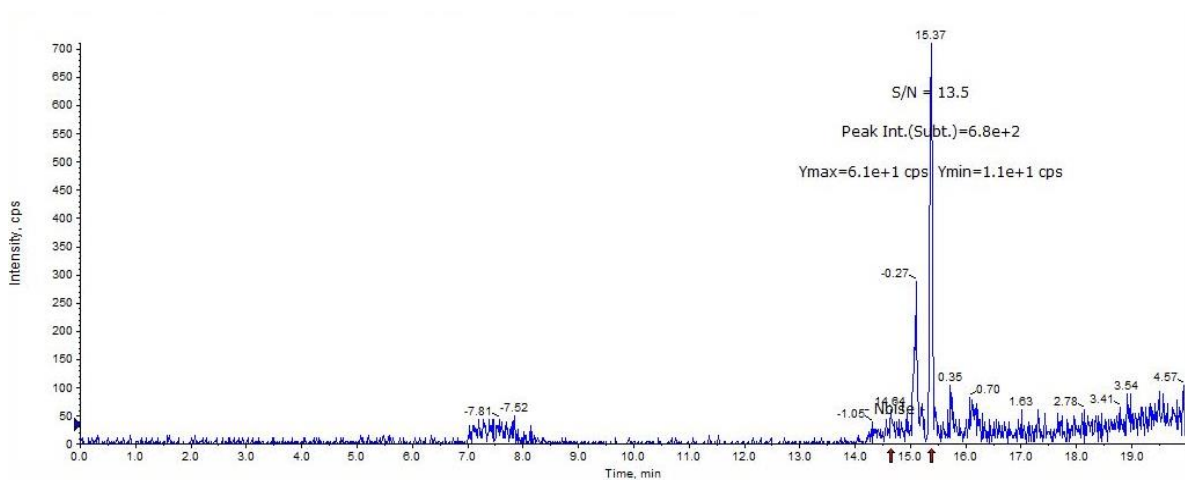
4.4 RAZMERJE SIGNAL/ŠUM IN MEJA KVANTIFIKACIJE

LOQ predstavlja najnižjo koncentracijo, pri kateri lahko z določeno stopnjo točnosti in natančnost analit kvantificiramo. LOQ lahko določamo na različne načine, sami smo LOQ določili na podlagi razmerja S/N. Koncentracija pri kateri je razmerje S/N 10 predstavlja LOQ (44). LOQ smo določili s programom Analyst® 1.6.2. tako, da smo označili območje kromatografskega vrha analita in enako široko območje levo od kromatografskega vrha analita, kar prikazuje slika 11 (rdeči puščici). To smo storili pri koncentraciji 1 nmol/L raztopine standarda v MeOH. S slike 11 lahko razberemo, da je pri koncentraciji 1 nmol/L raztopine standarda v MeOH razmerje S/N 10,2. Iz tega sklepamo, da je najnižja koncentracija analita, ki jo še lahko zanesljivo poročamo 1 nmol/L.



Slika 11: Določitev LOQ na vzorcu raztopine standarda v MeOH s koncentracijo 1 nmol/L. Rdeče puščice nakazujejo označeno območje za določitev S/N signala.

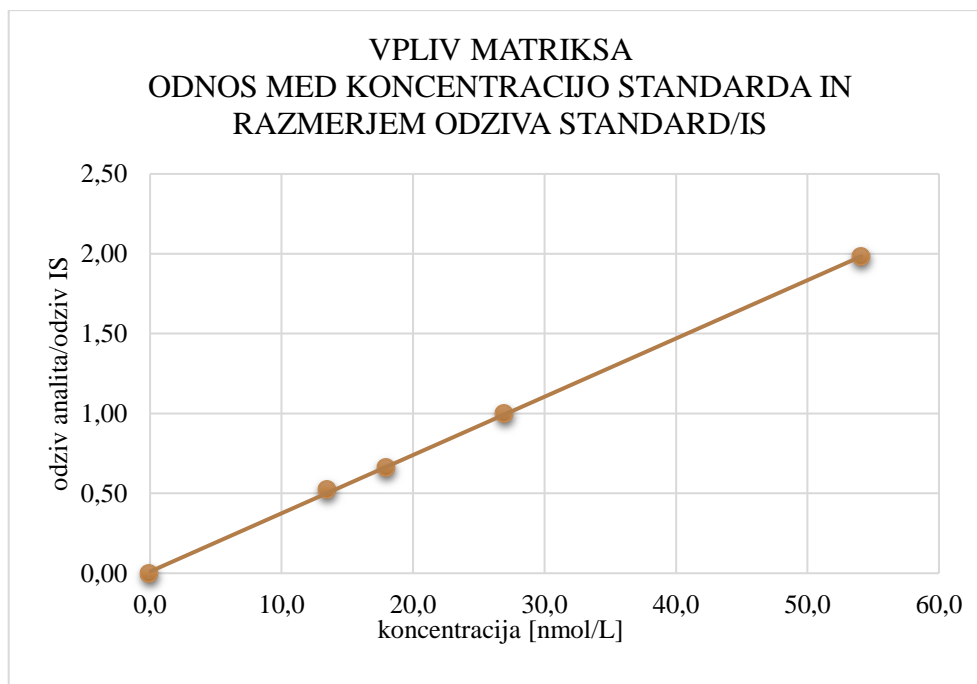
Ker smo kortizol določali v slini, smo preverili tudi razmerje S/N v vzorcu slin. Izbrali smo realni vzorec slin preiskovanca s koncentracijo kortizola 1,31 nmol/L. S slike 12 je razvidno, da je razmerje S/N 13,5. Določeno S/N razmerje je večje od 10, kar daje dodatno potrditev, da lahko izmerjene koncentracije kortizola v slini zanesljivo poročamo vsaj do koncentracije 1,31 nmol/L. Ker v nobenem vzorcu slin preiskovancev nismo izmerili nižje koncentracije kortizola kot 1,31 nmol/L, lahko sklepamo, da pri ostalih vzorcih razmerje S/N ni manjše od 10. Vse izmerjene koncentracije kortizola v slini preiskovancev so nad LOQ, kar pomeni, da lahko z uporabljenimi metodo LC-MS/MS analit ponovljivo kvantificiramo.



Slika 12: Določitev S/N razmerja na realnem vzorcu slin preiskovanca s koncentracijo kortizola 1,31 nmol/L. Rdeči puščici nakazujeta označeno območje za določitev S/N signala.

4.5 VPLIV MATRIKSA

Z oceno vpliva matriksa ugotovimo ali so v vzorcu prisotne spojine, ki lahko v procesu ionizacije tekmujejo z analitom in s tem vplivajo na odziv analitskega inštrumenta in posledično na izmerjeno koncentracijo kortizola v slini (49). Vpliv matriksa smo preverili s pripravo različnih redčitev raztopin standarda, ki smo jih pomerili z LC-MS/MS. Iz izmerjenih koncentracij smo opredelili odnos med koncentracijo standarda in razmerjem odziva analit/IS in preverili linearnost premice.



Slika 13: Priprava premice s katero smo opredelili odnos med koncentracijo kortizola in razmerjem odziva analit/IS.

Iz slike 13 je razvidno, da je odnos med koncentracijo kortizola in odzivom analit/IS linearen. Z oceno vpliva matriksa nismo ugotovili, da bi spojine matriksa vzorca vplivale na odziv analitskega inštrumenta.

4.6 KONCENTRACIJE KORTIZOLA V VZORCIH SLINE PREISKOVANCEV

4.6.1 Osnovna opisna statistika

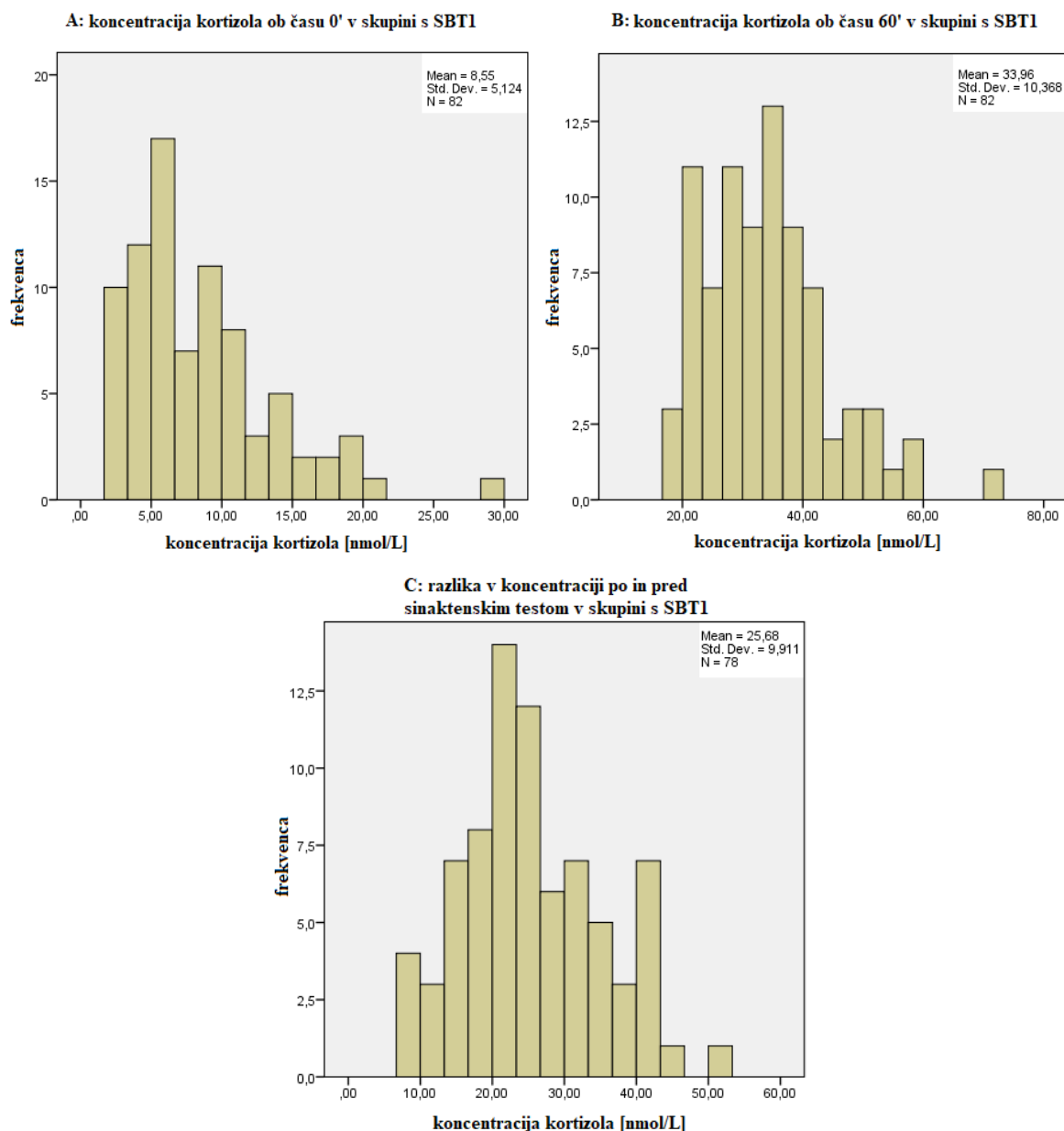
V sklopu raziskave je bilo zbranih vzorcev sline 142 otrok (284 vzorcev sline), skupino s SBT1 predstavlja 88 preiskovancev in kontrolno skupino 54 preiskovancev. Količina zbrane sline je med vzorci zelo variirala, zato smo morali večino vzorcev pripraviti iz polovičnega volumna 195uL ali celo iz četrtnine volumna 97,5uL sline. Pri 2 preiskovancih je bilo zbrane sline premalo za pripravo in analizo. Prav tako nismo mogli izvesti analize na 4 vzorcih sline odvzete ob času 0' in 4 vzorcih sline odvzete ob času 60' v skupini s SBT1. Iz istega razloga smo pri 10 osebah pripravili le po eno paralelko vzorca. Z LC-MS/MS smo tako določili koncentracijo kortizola pri 140 preiskovancih oz. v 272 vzorcih sline. Analizirali smo 108 vzorcev sline otrok in mladostnikov s kontrolni skupini skupine in 164 vzorcev sline otrok in mladostnikov s SBT1. Koncentracije kortizola, ki smo jih v slini otrok in mladostnikov določili z LC-MS/MS so zbrane v prilogi I. Podane so tudi informacije o starosti in spolu preiskovancev ter čas odvzema vzorcev sline.

Preiskovanci, ki so bili vključeni v raziskavo so bili stari med 8 in 15 let, v povprečju 11,5 let. V kontrolni skupini je bila povprečna starost 10,92 in v skupini s SBT1 11,80. Vsi vzorci so bili odvzeti v dopoldanskem času med 7:02 in 10:06 uro. Po navodilih raziskave je moralo med odvzemom prvega in drugega vzorca preteči 60 min, v povprečju je bila časovna razlika 58 min. V raziskavo je bilo po podatkih vključenih 55 (45,8 %) oseb moškega spola in 65 (54,2 %) oseb ženskega spola, manjkajočih podatkov o spolu je bilo 20. V kontrolni skupini je bilo 15 (27,8 %) oseb moškega spola in 19 (35,2 %) oseb ženskega spola, manjkajočih podatkov o spolu v kontrolni skupini je bilo 20 (37,0 %). V skupini s SBT1 je bilo 40 (46,5 %) oseb moškega spola in 46 (53,5 %) oseb ženskega spola, manjkajočih podatkov ni bilo. Podatki o najnižji, najvišji in povprečni koncentraciji kortizola v slini ob času 0' in 60' znotraj posamezne skupine so podani v preglednici XII.

Preglednica XII: Podatki o najnižji (c_{\min}), najvišji (c_{\max}) in povprečni (c_{povpr}) koncentraciji kortizola. Podano je povprečje razlike koncentracij kortizola pred in po intervenciji (koncentracija 60' - koncentracija 0') za obe skupini.

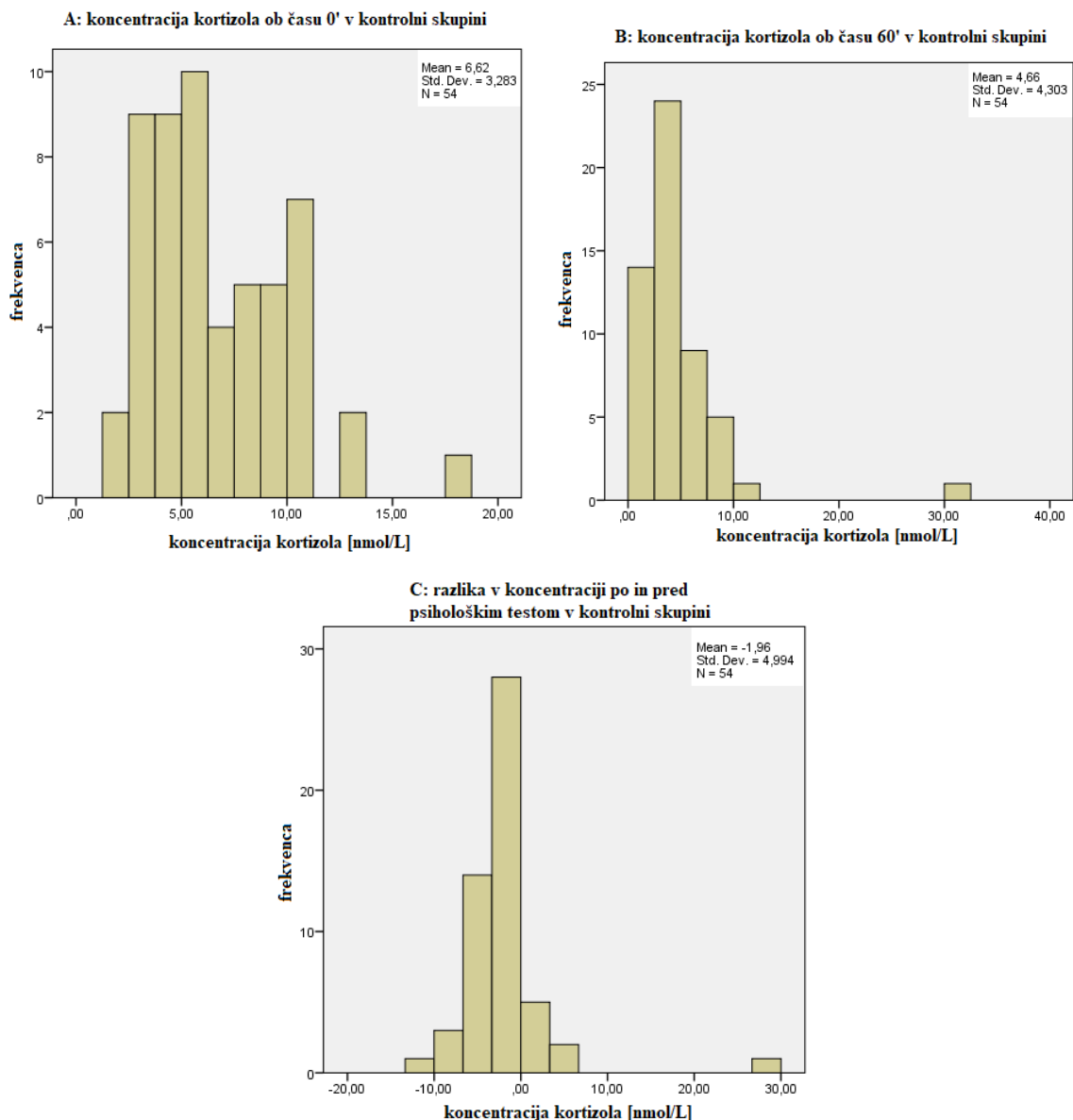
	skupina s SBT1			kontrolna skupina		
	c_{\min}	c_{\max}	c_{povpr}	c_{\min}	c_{\max}	c_{povpr}
koncentracija ob času 0' [nmol/L]	2,58	29,3	8,55	1,68	17,5	6,62
koncentracija ob času 60' [nmol/L]	16,8	70,9	33,9	1,31	30,3	4,66
koncentracija 60'-0' [nmol/L]			25,7			-1,96

Iz preglednice XII je razvidno, da v skupini s SBT1 po sinaktenskem testu koncentracija kortizola naraste. Povprečna koncentracija kortizola ob času 0' je 8,55 nmol/L, po sinaktenskem testu 33,9 nmol/L in povprečna razlika 25,7 nmol/L. Porazdeljevanje koncentracije kortizola v skupini s SBT1 pred sinaktenskim testom ob času 0' je prikazano v obliki histograma na sliki 14.A in po sinaktenskem testu ob času 60' na sliki 14.B. Slika 14.C pa prikazuje razliko v koncentraciji kortizola po in pred sinaktenskim testom. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da se je HPA os odzvala na analog ACTH, kar smo pričakovali. Ali smo s testom dosegli maksimalen odziv pa ne moremo trditi, saj ne poznamo najnižjih in najvišjih vrednosti kortizola vsakega posameznika.



Slika 14.A: Histogram prikazuje porazdelitev koncentracij kortizola pred sinaktenskim testom ob času 0'. **B:** Histogram prikazuje porazdelitev koncentracij kortizola po sinaktenskem testu ob času 60'. **C:** Histogram prikazuje porazdelitev razlike koncentracije kortizola po in pred sinaktenskim testom (koncentracija 60' - koncentracija 0'). "Mean" – povprečna vrednost, Std. Dev. – standardna deviacija (SD), N – število oseb.

V kontrolni skupini je bila situacija popolnoma drugačna, koncentracija kortizola je po psihološkem testiranju upadla. Ob času 0' je bila povprečna koncentracija kortizola 6,62 nmol/L, po psihološkem testiranju pa 4,66 nmol/L, koncentracija je v povprečju padla za 1,96 nmol/L. Porazdeljevanje koncentracije kortizola v kontrolni skupini pred psihološkimi testi je prikazano v obliki histograma na sliki 15.A in po psiholoških testih na sliki 15.B. Razliko v koncentraciji kortizola po in pred psihološkem testiranju prikazuje slika 15.C.



Slika 15.A: Histogram prikazuje porazdelitev koncentracij kortizola pred psihološkim testiranjem ob času 0'. **B:** Histogram prikazuje porazdelitev koncentracij kortizola po psihološkem testiranju ob času 60'. **C:** Histogram prikazuje porazdelitev razlike koncentracije kortizola po in pred psihološkim testiranjem (koncentracija 60' - koncentracija 0'). "Mean" – povprečna vrednost, Std. Dev. – standardna deviacija (SD), N – število oseb.

Ali so opisane razlike statistično značilne, smo preverili s t-testom odvisnih vzorcev, rezultati so predstavljeni v nadaljevanju.

4.6.2 Primerjava starosti in koncentracije kortizola ob času 0' med skupino s SBT1 in kontrolno skupino

Koncentraciji kortizola ob času 0' med skupino s SBT1 in kontrolno skupino smo primerjali s t-testom za dva neodvisna vzorca, izpis SPSS programa je v prilogi II. Preverili smo tudi starostno sestavo skupin.

STAROST

Najprej smo zapisali hipotezi, ki jih bomo s t-testom za dva neodvisna vzorca testirali.

H_0 : Starostna porazdelitev se med kontrolno skupino in skupino s SBT1 ne razlikuje oz. starostna porazdelitev je med skupinama enaka.

H_A : Starostna porazdelitev se med kontrolno skupino in skupino s SBT1 razlikuje oz. starostna porazdelitev je med skupinama različna.

V skupini s STB1 (N=71) je bila povprečna starost 11,8 in v kontrolni skupini (N=36) 10,9. Enakost varianc smo preverili z Levenovim testom in ugotovili, da enakost varianc velja ($p=0,808 > \alpha=0,05$). Nato smo naredili t-test za dva neodvisna vzorca, p vrednost, ki smo jo dobili je bila manjša od stopnje tveganja α ($p=0,037 < \alpha=0,05$). S tem smo zavrgli H_0 in sprejeli H_A . Starostna porazdelitev se med kontrolno skupino in skupino s SBT1 razlikuje, povprečna razlika v starosti je 0,886. V uvodu smo omenili, da so vrednosti kortizola starostno pogojene, na koncentracijo kortizola lahko vpliva starost posameznika (23). V raziskavo so bili vključeni otroci in mladostniki od 8-15 let, starostno gledano je bila izbrana zelo ozka skupina otrok. Čeprav je razlika v starosti med skupinama statistično različna, zaradi ozkega starostnega intervala ta ne vpliva na koncentracijo kortizola v slini. Razlika v starosti bi bila klinično pomembna, če bi primerjali skupine s širšim intervalom starosti npr. mladostnike in starostnike. Zaključimo lahko, da se skupini statistično razlikujeta po starosti, vendar ta razlika nima vpliva na izmerjene koncentracije kortizola in interpretacijo dobljenih rezultatov.

KONCENTRACIJA KORTIZOLA OB ČASU 0'

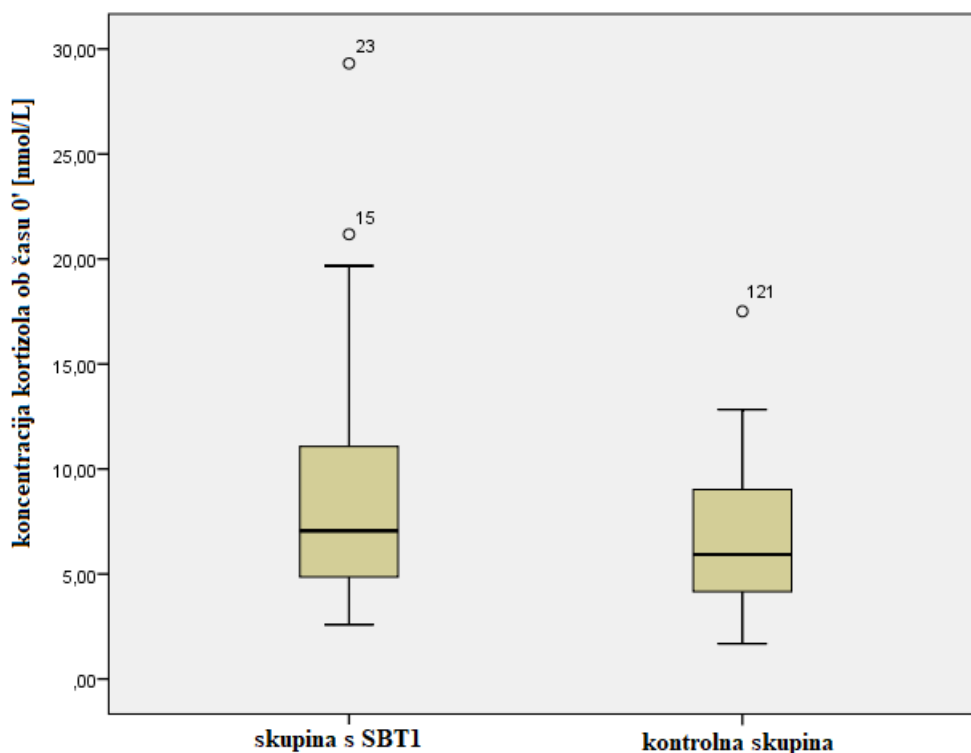
Zapisali smo hipotezi, ki jih bomo s t-testom za dva neodvisna vzorca testirali.

H_0 : Koncentracija kortizola ob času 0' se med kontrolno skupino in skupino s SBT1 ne razlikuje.

H_A : Koncentracija kortizola ob času 0' se med kontrolno skupino in skupino s SBT1 razlikuje.

V skupini s SBT1 (N=82) je bila povprečna koncentracija kortizola ob času 0' 8,55 nmol/L, v kontrolni skupini (N=54) pa 6,62 nmol/L. Enakost varianc smo preverili z Levenovim testom in ugotovili, da enakost varianc ne velja ($p=0,012 < \alpha=0,05$). Naredili smo t-test za

dva neodvisna vzorca, p vrednost, ki smo jo dobili je bila manjša od stopnje tveganja α ($p=0,00 < \alpha=0,05$). Razlika v koncentraciji kortizola ob času 0' med kontrolno skupino in skupino s SBT1 je statistično značilna. Otroci in mladostniki s SBT1 imajo v povprečju višjo bazalno vrednost kortizola za 1,93 nmol/L kot otroci in mladostniki v kontrolni skupini. Rezultati so grafično predstavljeni s kvantilnim diagramom na sliki 16.



Slika 16: Kvantilni diagram koncentracij kortizola ob času 0' v kontrolni skupini in skupini s SBT1.

Iz rezultatov sklepamo, da imajo otroci in mladostniki s SBT1 višje bazalne vrednosti kortizola kot zdravi otroci in mladostniki. Rezultat je pričakovan, saj iz literaturnih virov vemo, da je eden izmed dejavnikov razvoja ali napredovanja SBT1 delovanje HPA osi. Dlje trajajoča ali ponavljajoča izpostavljenost psihosocialnemu stresu povzroča stalno stimulacijo HPA osi in posledično kronično zvišano bazalno koncentracijo kortizola v krvi. Kronično povišan kortizol povzroča poškodbe nevronov hipokampusa in nepravilno delovanje HPA osi. Okvarjena HPA os ni več zmožna uravnati koncentracije kortizola v krvi, zato ta ostane v krvi zvišan dlje časa, tudi ko posameznik ni več izpostavljen stresu. Kronično zvišana koncentracija kortizola v krvi zavira učinke inzulina in s tem vpliva na presnovo glukoze. Posledica je razvoj inzulinske rezistence, ki pripomore k razvoju SBT1 (1,2,4,9,16). Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je pri bolnikih s SBT1 višja bazalna koncentracija kortizola posledica nepravilnega delovanja HPA osi. Nepravilno delovanje HPA osi pa

največkrat povezujemo s kroničnim stresom. Da je kronični stres bil vzrok za nepravilno delovanje HPA osi in razvoj SBT1 pri otrocih in mladostnikih iz skupine s SBT1, pa ne moremo trditi, saj na razvoj bolezni vpliva mnogo dejavnikov, je pa zagotovo eden izmed dejavnikov, ki razvoj ali potek bolezni pospešijo.

Zaključimo lahko, da zvišane bazalne koncentracije kortizola pri otrocih in mladostnikih s SBT1 nakazujejo na nepravilno delovanje HPA osi. Nepravilno delovanje HPA osi pa najverjetneje prispeva k razvoju SBT1, vendar bi za takšno sklepanje morali upoštevati še druge dejavnike, ki prispevajo k razvoju SBT1.

4.6.3 Primerjava koncentracije kortizola ob času 0' in 60' v kontrolni skupini

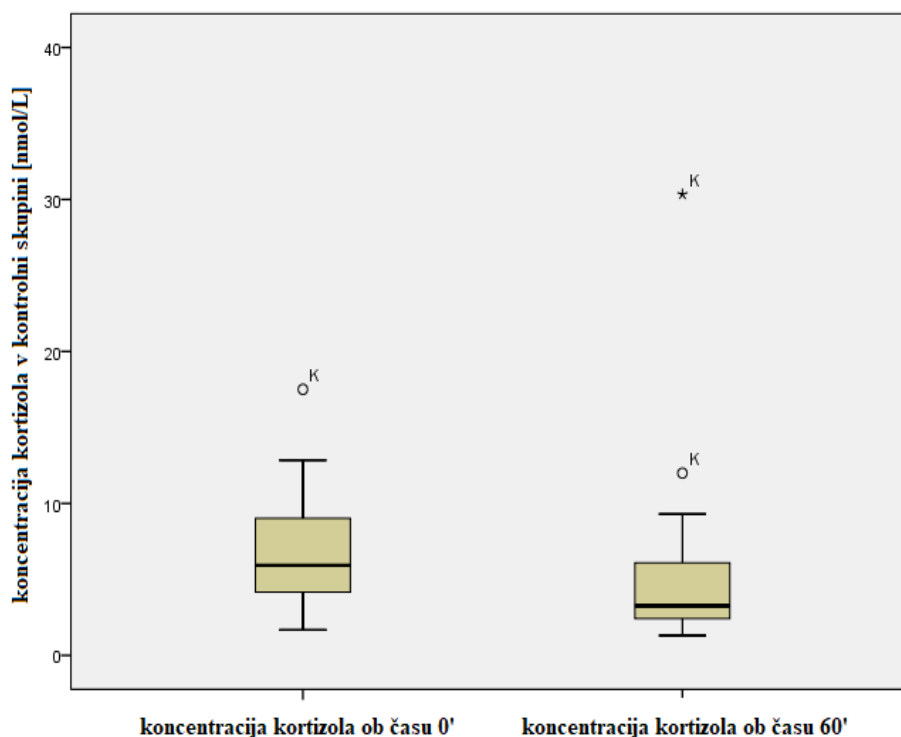
Koncentraciji kortizola ob času 0' in 60' v kontrolni skupini smo primerjali s t-testom za dva odvisna vzorca, izpis SPSS programa je v prilogi III.

Zapisi smo hipotezi, ki jih bomo s t-testom za dva odvisna vzorca testirali.

H_0 : Koncentracija kortizola se ob času 0' in 60' v kontrolni skupini ne razlikuje oz. koncentracija kortizola v kontrolni skupini se po psihološkem testiranju ne razlikuje od koncentracije kortizola pred psihološkim testiranjem.

H_A : Koncentracija kortizola ob času 0' in 60' se v kontrolni skupini razlikuje oz. koncentracija kortizola v kontrolni skupini se po psihološkem testiranju razlikuje od koncentracije kortizola pred psihološkim testiranjem.

V kontrolni skupini (N=54) je povprečna koncentracija kortizola pred psihološkim testiranjem 6,62 nmol/L, po psiholoških testiranjih pa 4,66 nmol/L. Naredili smo t-test za dva odvisna vzorca, p vrednost, ki smo jo dobili, je bila manjša od stopnje tveganja α ($p=0,006 < \alpha=0,05$). Razlika v koncentraciji kortizola ob času 0' in 60' v kontrolni skupini je statistično značilna. Rezultati so grafično predstavljeni s kvantilnim diagramom na sliki 17.



Slika 17 : Kvantilni diagram koncentracij kortizola ob času 0' (pred psihološkim testiranjem) in času 60' (po psihološkem testiranju) v kontrolni skupini.

Koncentracija kortizola je po psihološkem testiranju v povprečju nižja za 1,96 nmol/L od koncentracije kortizola pred psihološkim testiranjem. Pričakovali smo, da se bo koncentracija kortizola po psiholoških testih zvišala, saj naj bi ti predstavljali stresor. Zgodilo pa se je ravno nasprotno, koncentracija kortizola je po psihološkem testiranju padla. Znižanje koncentracije kortizola lahko razložimo z dejstvom, da so bili otroci izpostavljeni stresu, ki je bil pričakovan. Otrokom predstavlja večji stres samo pričakovanje kot pa dogodek sam, ko se zgodi. Če ponazorimo situacijo s konkretnim primerom iz vsakdanjega življenja. Predstavljajmo si, da pišemo test. Pred testom smo pod stresom, saj ne vemo kako bo test izgledal, kakšna bodo vprašanja in kakšna bo zahtevnost vprašanj. Ko pa dobimo test pred seboj, se seznanimo z vprašanji in zahtevnostjo testa in sčasoma privadimo na dano situacijo. Posledično se stres zmanjša, kortizol pa začne padati. Stres v primeru raziskave torej predstavlja pričakovanje na psihološko testiranje, npr. seznanitev z zdravstvenimi delavci, postavitve vprašanj in odvzem biološkega materiala. Tako lahko pojasnimo, da so otroci v kontrolni skupini imeli koncentracije kortizola pred psihološkim testiranjem višje, saj niso vedeli kaj lahko pričakujejo. Ko so se otroci spoznali z zdravstvenimi delavci in so bila vprašanja postavljena, pa ta niso predstavljal več tako stresne situacije, saj so otroci dobili izkušnjo, da nanje znajo odgovoriti, enako kot pri testu v šoli.

Iz izmerjenih koncentracij kortizola v kontrolni skupini je razvidno, da se je vseeno pri 5 od 54 (9,2 %) otrok kortizol po psiholoških testih zvišal (pri osebah 95, 99, 103, 111 in 114, glej prilogo I). Za te otroke je psihološko testiranje predstavljalo stres. Ker nismo imeli vpogleda v psihološka testiranja, prav tako nismo bili seznanjeni z vprašanji, ki so jih psihologi postavljali otrokom, ne moremo zagotovo trditi, kateri dejavnik je povzročil aktivacijo HPA osi pri teh otrocih. Dobili smo le osnovne informacije o vrstah psiholoških testov. Ti so se nanašali na navezanost otroka do bližnjih oseb, ugotavljanje stresa pri starših, psihopatologije pri otrocih in mladostnikih, o hudih življenjskih dogodkih in travmatičnih izkušnjah v življenju. Iz tega lahko sklepamo, da so otrokom nekatera vprašanja predstavljala psihosocialni stres. Če podamo konkreten primer, predstavljajmo si otroka, ki je bil v mladosti izpostavljen travmatični izkušnji, npr. izgubi bližnje osebe. V uvodu smo zapisali, da lahko vsaka takšna travmatična izkušnja, konkretno podana se nanaša na odnose z bližnjimi osebami, predstavlja stresor, na katerega se telo odzove s stresnim odzivom in sproščanjem kortizola (6,7,8,9,10,11). Ko so psihologi otroku zastavili vprašanje o travmatičnih izkušnjah, se je otrok spomnil travmatičnega dogodka. Čeprav je šlo za spomin, je vprašanje pri otroku sprožilo stresni odziv, aktivirala se je HPA os in posledično se je začel izločati kortizol. Otroci pri katerih se je koncentracija kortizola po psiholoških testiranjih zvišala, so najverjetneje bili v otroštvu izpostavljeni travmatičnih izkušnjam, hudim življenjskim dogodkom, lahko, da so zaradi slabih izkušenj v otroštvu razvili negotove tipe navezanosti ali pa je zvišanje kortizola zgolj posledica stresa, ki ga je otrokom predstavljalo neznano okolje na katerega se niso tako hitro privadili.

Pri zdravih otrocih in mladostnikih je normalno, da se koncentracija kortizola pod vplivom psihološkega stresa (psihološka testiranja) spremeni, ugotovili smo da se lahko zniža ali zviša. Gre za normalen odziv HPA osi oz. normalen stresni odziv na dano situacijo, zato lahko iz rezultatov sklepamo, da je delovanje HPA osi pri teh otrocih in mladostnikih normalno.

4.6.4 Primerjava koncentracije kortizola ob času 0' in 60' v skupini s SBT1

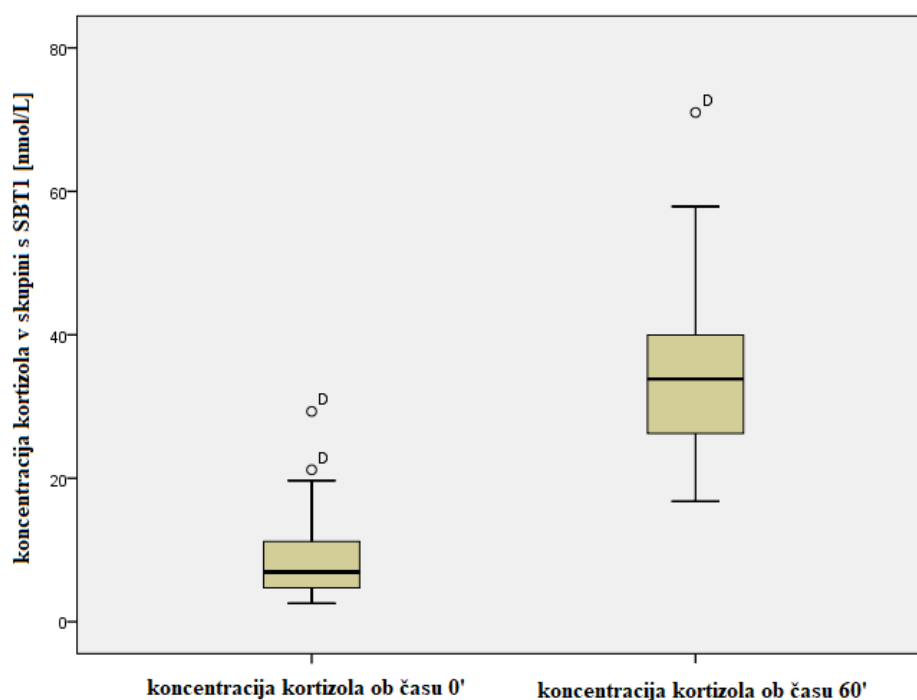
Koncentraciji kortizola ob času 0' in 60' v skupini s SBT1 smo primerjali s t-testom za dva odvisna vzorca, izpis SPSS programa je v prilogi IV.

Zapisali smo hipotezi, ki jih bomo s t-testom za dva odvisna vzorca testirali.

H_0 : Koncentracija kortizola se ob času 0' in 60' v skupini s STB1 ne razlikuje oz. koncentracija kortizola v kontrolni skupini se po sinaktenskem testu ne razlikuje od koncentracije kortizola pred sinaktenskim testom.

H_A : Koncentracija kortizola se ob času 0' in 60' v skupini s STB1 razlikuje oz. koncentracija kortizola v kontrolni skupini se po sinaktenskem testu razlikuje od koncentracije kortizola pred sinaktenskim testom.

V skupini s SBT1 (N=78) je povprečna koncentracija kortizola pred sinaktenskim testom 8,57 nmol/L, po sinaktenskem testu pa 34,2 nmol/L. Naredili smo t-test za dva odvisna vzorca, p vrednost, ki smo jo dobili, je bila manjša od stopnje tveganja α ($p=0,00 < \alpha=0,05$). Razlika v koncentraciji kortizola ob času 0' in 60' v skupini s SBT1 je statistično značilna. Po sinaktenskem testu je koncentracija kortizola v povprečju višja za 25,7 nmol/L. Rezultati so grafično predstavljeni s kvantilnim diagramom na sliki 18.



Slika 18: Kvantilni diagram koncentracij kortizola ob času 0' (pred psihološkim testiranjem) in času 60' (po psihološkem testiranju) v skupini s SBT1.

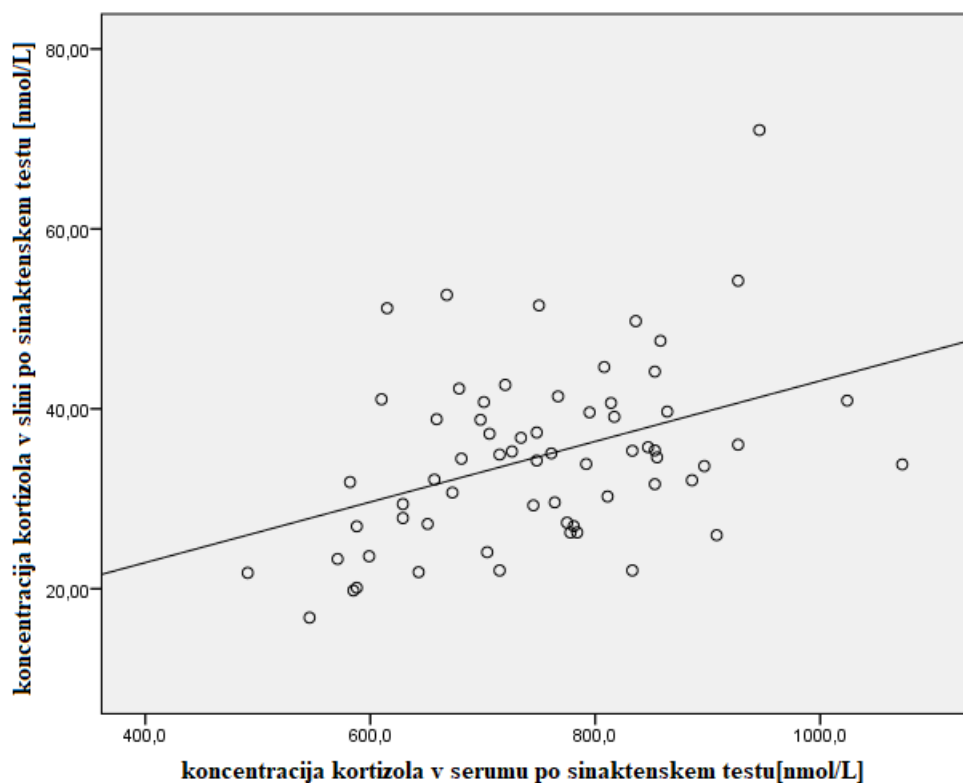
Sinaktenski test se uporablja za testiranje delovanja HPA osi. Kadar je delovanje HPA osi normalno, analog ACTH pri posamezniku sproži maksimalen kortizolski odziv. Če je delovanje HPA osi iz kateregakoli razloga moteno, kar se lahko zgodi pri bolnikih s SBT1, maksimalnega kortizolskega odziva s sinaktenskim testom ne moremo izzvati (28). Iz dobljenega rezultata lahko sklepamo le, da so se vsi otroci in mladostniki s STB1 odzvali na

analog ACTH, saj se je koncentracija kortizola po sinaktenskem testu pri vseh otrocih in mladostnikih značilno zvišala. Trdimo lahko, da HPA os pri teh otrocih in mladostnikih deluje. Ali je delovanje HPA osi normalno, pa ne moremo oceniti. Zato bi morali koncentracije kortizola po sinaktenskem testu primerjati z mejnimi vrednostmi, na podlagi katerih določimo ali HPA os še deluje normalno. Ker se koncentracija kortizola po sinaktenskem testu navadno meri v krvnih vzorcih, so okvirne mejne vrednosti postavljene le za serumske koncentracije kortizola. Za kortizol v slini pa te še niso bile postavljene. *Patel S.R. in sodelavci* (29) ter *Cornes P.M. in sodelavci* (31) so problem rešili s korelacijo med serumskim kortizolom in kortizolom v slini, v zaključku pa poudarili, da morajo laboratoriji določiti lastne mejne vrednosti za kortizol v slini. V sklopu magistrskega dela mejnih vrednosti nismo določali, zato drugih zaključkov iz dobljenih rezultatov ne moremo narediti.

V sklopu raziskave so bili odvzeti tudi vzorci krvi, zato smo naredili korelacijsko analizo med serumskimi koncentracijami kortizola in koncentracijami kortizola v slini (30). S korelacijsko analizo preverimo, ali med dvema spremenljivkama obstaja soodvisnost. Z analizo smo želeli ugotoviti, ali med serumsko koncentracijo kortizola in koncentracijo kortizola v slini obstaja linearna povezanost. Koncentracija kortizola v serumu po sinaktenskem testu je bila izmerjena v 65 vzorcih, koncentracija v slini po sinaktenskem testu pa v 82 vzorcih. Korelacijsko analizo smo tako lahko izvedli le pri 64 preiskovancih, ki so imeli izmerjeno koncentracijo kortizola tako v serumu kot v slini. V preglednici XIII so zbrani podatki o najnižji, najvišji in povprečni koncentraciji kortizola. Korelacija med serumskimi koncentracijami kortizola in koncentracijami kortizola v slini je grafično prikazana na sliki 19. Izpis SPSS programa korelacijske analize je v prilogi V.

Preglednica XIII: Podatki o najnižji (c_{\min}), najvišji (c_{\max}) in povprečni (c_{povpr}) koncentraciji kortizola v krvi in v slini po sinaktenskem testu.

	N	c_{\min}	c_{\max}	c_{povpr}
koncentracija kortizola v slini po sinaktenskem testu [nmol/L]	65	16,8	70,9	33,9
koncentracija kortizola v serumu po sinaktenskem testu [nmol/L]	82	491	1073	749

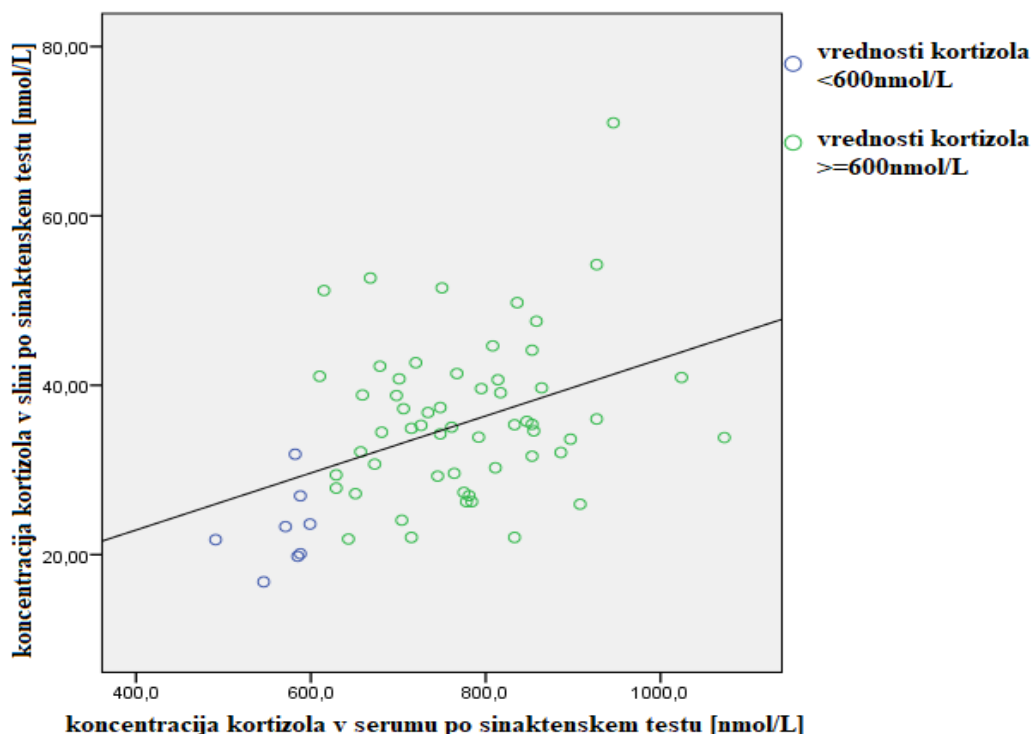


Slika 19: Korelacija koncentracije kortizola v serumu in slini po sinaktenskem testu.

Ugotovili smo, da med serumskimi koncentracijami kortizola in koncentracijami kortizola v slini obstaja linearna povezanost in, da je ta statistično značilna ($p=0,01 < \alpha=0,05$). Linearno povezanost dveh spremenljivk opišemo s Pearsonovim koeficientom korelacije, ki lahko zaseda vrednosti med -1 in 1. Močnejša kot je linearna povezanost med spremenljivkama, bližje je vrednost Pearsonovega koeficienta korelacije -1 oz. 1. Vrednost Pearsonovega koeficienta korelacije, ki smo jo dobili, znaša 0,407. Iz tega lahko sklepamo, da med koncentracijo kortizola v serumu in slini obstaja zmerna linearna povezanost. Koncentracije kortizola v slini torej dokaj dobro odražajo koncentracije kortizola v krvi, le da so te v slini bistveno nižje.

V sklopu magistrske naloge nismo določali mejnih vrednosti kortizola v slini, smo pa želeli ugotoviti, kakšna je povprečna koncentracija kortizola, kadar je delovanje HPA osi normalno. Določili smo, da normalno delujočo HPA os predstavljajo vrednosti kortizola v serumu, ki so ≥ 600 nmol/L (32,33,34). Tako smo otroke in mladostnike razdelili v dve skupini, kar je grafično predstavljeno na sliki 20. Prvo skupino predstavljajo otroci in mladostniki s koncentracijami kortizola v serumu < 600 nmol/L in tem vrednostim

pripadajoče koncentracije kortizola v slini (N=8). Drugo skupino predstavljajo otroci in mladostniki s koncentracijami kortizola v serumu ≥ 600 nmol/L in tem vrednostim pripadajoče koncentracije kortizola v slini (N=56).



Slika 20: Koncentracija kortizola v serumu po sinaktenskem testu <600 nmol/L in pripadajoče koncentracije kortizola v slini (modri krogi) in koncentracija kortizola v serumu po sinaktenskem testu ≥ 600 nmol/L in pripadajoče koncentracije kortizola v slini (zeleni krogi).

Otroci in mladostniki, ki so imeli vrednosti kortizola v serumu < 600 nmol/L, so imeli povprečno koncentracijo kortizola v slini 23,0 nmol/L. Otroci in mladostniki, ki so imeli vrednosti kortizola v serumu ≥ 600 nmol/L, pa so imeli povprečno koncentracijo kortizola v slini 36,4 nmol/L. Iz tega razberemo, da so imeli otroci, katerih delovanje HPA osi je bilo okvarjeno (serumska koncentracija kortizola <600 nmol/L), nižjo povprečno koncentracijo kortizola v slini kot otroci, katerih HPA os je bila normalno delujoča (serumska koncentracija kortizola ≥ 600 nmol/L).

S primerjavo koncentracij kortizola v slini pred in po sinaktenskem testu v skupini s SBT1 smo ugotovili, da se je HPA os odzvala na ACTH analog. Koncentracije kortizola v slini po sinaktenskem testu smo primerjali s koncentracijami kortizola v serumu in ugotovili, da med koncentracijama obstaja zmerna linearna povezanost. Iz koncentracij kortizola v serumu, smo na podlagi mejne vrednosti 600 nmol/L ugotovili, da je pri 8 otrocih delovanje HPA osi zavrto. Povprečna vrednost kortizola v slini teh 8 otrok je bila nižja kot povprečna vrednost

otrok, ki so imeli normalno delujočo HPA os oz. serumske koncentracije ≥ 600 nmol/L. Zaključimo lahko, da je koncentracija kortizola v slini pogojena z delovanjem HPA osi in, da vrednosti dobro korelirajo s serumskimi koncentracijami. Če bi želeli o delovanju HPA osi sklepati le iz koncentracij kortizola v slini, bi morali postaviti lastne mejne vrednosti. Za postavitev teh pa bi potrebovali večjo populacijo in primerjavo s kontrolno skupino zdravih oseb, ki bi bile prav tako izpostavljene sinaktenskem testu.

5 SKLEP

V sklopu magistrskega dela smo z metodo tandemske masne spektrometrije določili koncentracijo kortizola v slini zdravih otrok in mladostnikov ter v slini otrok in mladostnikov s sladkorno boleznijo tipa 1 (SBT1). Iz koncentracije kortizola smo želeli opredeliti stresni odziv pri zdravih otrocih in mladostnikih in stresni odziv pri otrocih in mladostnikih s SBT1.

Glede na zastavljene specifične cilje in hipoteze smo ugotovili sledeče:

- ∞ Metoda je linearna v širokem koncentracijskem območju do 55,2 nmol/L. Natančnost smo preverili s pripravo raztopin standarda v zlivku sline. Metoda je natančna pri višjih koncentracijah, kjer vrednost relativne napake ni preseгла 15 %. Pri nižjih koncentracijah pa je relativna napaka preseгла 20 %. Vzrok za določen odstotek nenatančnosti pri nižjih koncentracijah so lahko napake pri pripravi standardnih raztopin. Te smo pripravili sami, saj nismo imeli na voljo certificiranih standardnih materialov za ugotavljanje točnosti. Ponovljivost med dnevi in znotraj dneva pa je ustrezala postavljenemu kriteriju 15 %. Iz razmerja signal/šum smo določili mejo kvantifikacije pri 1 nmol/L, z oceno matriksa vzorca pa smo ugotovili, da spojine iz vzorca ne vplivajo na odziv analitskega inštrumenta. Postopek verifikacije je bil zahteven, saj smo vzorce za verifikacijo metode pripravljali v slini, ki vsebuje endogeni kortizol. Ker smo imeli na voljo le manjšo količino zlivka sline, nismo mogli izvesti več ponovitev meritev zlivka sline, s čimer bi lahko ocenili vpliv endogenega kortizola na pripravljen material za oceno točnosti in natančnosti. Postopek verifikacije je bil otežen tudi zaradi pomanjkanja standardnih certificiranih materialov. Posledično smo morali pripraviti lastne, kar je zagotovo vplivalo na rezultate točnosti in natančnosti. Metoda je primerna za določanje koncentracije kortizola v vzorcih sline, vendar bi za rutinsko uporabo morali metodo še optimizirati in izvesti celoten proces validacije s standardnimi certificiranimi materiali.
- ∞ Po verifikaciji metode smo izmerili vzorce sline otrok in mladostnikov. Kortizol smo izmerili v slini 140 preiskovancev, od tega je bilo 86 otrok in mladostnikov s SBT1 in 54 zdravih otrok in mladostnikov. Zaradi različnih testnih pogojev, v skupini s SBT1 je bil narejen sinaktenski test, v kontrolni skupini pa psihološko testiranje, skupin med seboj nismo mogli primerjati. Primerjave smo lahko naredili le znotraj posameznih skupin. Ugotovili smo, da imajo bolniki s SBT1 višje bazalne vrednosti

kortizola kot zdravi otroci in mladostniki, kar po literaturnih podatkih nakazuje na nepravilno delovanje HPA osi. Da je nepravilno delovanje HPA osi zaradi kroničnega stresa pri teh otrocih vzrok za razvoj SBT1, pa ne moremo trditi.

- ∞ S t-testom za odvisna vzorca smo ugotovili, da imajo zdravi otroci in mladostniki po psihološkem testiranju nižje vrednosti kortizola kot pred testiranjem. Pričakovali smo ravno obratno, da se bo po psiholoških testiranjih koncentracija kortizola zvišala, tako smo zapisali tudi hipotezo. Otroci so psihološko testiranje pričakovali, zato jim je, ko so se situacije navadili, kortizol začel padati in se tekom psihološkega testiranja znižal. Le pri 5 otrocih, se je kortizol po psiholoških testiranjih značilno zvišal. Ker nismo imeli vpogleda v psihološka testiranja, ne moremo trditi, kateri dejavnik je bil tisti, ki je pri teh preiskovancih povzročil aktivacijo HPA osi. Zagotovo pa lahko trdimo, da je pri zdravih otrocih in mladostnikih normalno, da se koncentracija kortizola pod vplivom psihološkega testiranja spremeni, lahko se zviša ali zniža. S temi ugotovitvami smo ovrgli zastavljeno hipotezo. Ugotovili smo, da je stresni odziv, ki se kaže z znižanjem ali zvišanjem kortizola, na dano situacijo normalen in, da je delovanje HPA osi pri zdravih otrocih in mladostnikih normalno.
- ∞ Primerjali smo tudi koncentracije kortizola po sinaktenskem testu s koncentracijami kortizola pred sinaktenskim testom v skupini s SBT1. S sinaktenskim testom dosežemo maksimalen kortizolski odziv v telesu, ki je pogojen z normalnim delovanjem HPA osi. Kortizol se je pri vseh preiskovancih po sinaktenskem testu zvišal, gre za normalen odziv telesa na intramuskularno vbrizgan analog ACTH, ki smo ga pričakovali.
- ∞ Ker v slini še niso bile določene referenčne meje, na podlagi katerih lahko sklepamo o normalnosti delovanja HPA osi, slednjega nismo mogli ovrednotiti. Za serumske koncentracije so te meje jasno postavljene, zato smo naredili korelacijo s serumskimi koncentracijami kortizola. Ugotovili smo, da koncentracije kortizola v slini dobro korelirajo s serumskimi koncentracijami kortizola. Prav tako smo ugotovili, da so imeli preiskovanci s serumskimi koncentracijami nižjimi od 600 nmol/L, kar nakazuje na nepravilno delovanje HPA osi, v povprečju nižjo tudi koncentracijo kortizola v slini.

Dobljeni rezultati meritev kortizola v slini, skupaj z meritvami kortizola v serumu, genetskimi testi in rezultati psihološkega testiranja, bodo zagotovo pripomogli pri oceni

vpliva stresa na pojav SBT1 pri otrocih in mladostnikih. Edina pomanjkljivost je neprimerljivost kontrolne skupine s skupino s SBT1, saj so bili testni pogoji različni. Menimo, da bi bilo smiselno narediti psihološko testiranje brez sinaktenskega testa tudi v skupini otrok in mladostnikov SBT1 in nato narediti primerjavo kortizola po psihološkem testiranju med skupinama. Za postavitev referenčnih mej kortizola v slini, s katerimi bi lahko opredelili normalnost delovanja HPA osi, pa bi morali sinaktenskemu testu izpostaviti tudi skupino zdravih otrok in mladostnikov. Z opisanimi primerjavami bi dobili še dodaten vpogled v delovanje HPA osi in lažje ocenili vpliv psihološkega stresa na pojavnost sladkorne bolezni tipa 1.

6 LITERATURA

- (1) Nygren M. (2015). Stress in childhood and the risk of type 1 diabetes. Doctoral thesis, Linköping: Linköping University Electronic Press.
- (2) Do Yup L., Eosu K., Man Ho C. Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. *BMB Reports*, 2015; 45(4): 209-216
- (3) Tsigos C., Chrousos P.G. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*, 2002; 53: 865-871
- (4) Bajrovič F.F. Temelji patofiziologije s fiziologijo za študente zdravstvenih ved. 1. izdaja. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 2015
- (5) Smith S.M., Vale W.W. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in clinical neuroscience*, 2006; 8(4): 383-395
- (6) Matthews G.S. Early programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends in Endocrinology&Metabolism*, 2002; 13 (9): 373-380
- (7) Psychological Stress and the Risk of Diabetes-Related Autoimmunity: A Review article. *Neuroimmunomodulation*, 2006; 13 (5-6): 301-308
- (8) Gunnar M, Quevedo K. The Neurobiology of stress and Development. *Annu. Rev. Psychol.*, 2007; 58: 14-173
- (9) Essex M.J., Klein M.H., Cho E., Kalin N.H. Maternal Stress Beginning in Infancy May Sensitize Children to Later Stress Exposure: Effects on Cortisol and Behavior. *Biol Psychiatry*, 2002; 52 (8): 776-784
- (10) Simonič B. Antropološko-psihološke in teološke osnove prenašanja vrednost: zgodnja navezanost na starše in temelji religioznosti. *Bogoslovni vestnik*, 2006; 66 (1): 123-136
- (11) Ainsworth M.D.S. Patterns of infant-mother attachments: antecedents and effects on development. *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 1985; 61(9): 771-791
- (12) Nygren M., Ludvigsson J., Carstensen J., Sepa F.A. Family psychological stress early in life and development of type 1 diabetes: The ABIS prospective study. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2013; 100 (2): 257-264
- (13) Could Parenting Stress and Lack of Support/Confidence Function as Mediating Mechanisms between Certain Environmental Factors and the Development of

- Autoimmunity in Children? A study within ABIS. *Ann N Y Acad. Sci.*, 2002; 958: 431-435
- (14) Ludvigsson J. Why Diabetes Incidence Increases – A Unifying Theory. *Ann N Y Acad. Sci.*, 2006; 1079: 374-382
- (15) Greenbaum J.C. Insulin resistance in type 1 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 2002; 18 (3): 192-200
- (16) Yuen K.C.J., Chong L.E., Riddle M.C. Influence of glucocorticoids and growth hormone on insulin sensitivity in humans. *Diabetic Medicine*, 2013; 30 (6): 651-663
- (17) Carlsson E., Frostell A., Ludvigsson J., Faresjö M. Psychological Stress in Children May Alter the Immune Response. *The Journal of Immunology*, 2014; 192 (5): 2071-2081
- (18) Lupien J.S. How to measure stress in humans. Centre for Studies on human stress (CSHS).http://www.humanstress.ca/documents/pdf/SalivaLab/HOW%20TO%20MEASURE%20STRESS_CSHS.pdf. Dostopno: 11-7-2017
- (19) Kirschbaum C. Hellhammer D.H. Salivary Cortisol in Psychobiological Research: An Overview. *Neuropsychobiology*, 1989; 22: 150-169
- (20) Jessop D.S., Turner-Cobb J.M. Measurement and meaning of salivary cortisol: A focus on health and disease in children. *Stress*, 2008; 11(1): 1-14
- (21) Gunnar M.R. Donzella B. Social regulation of the cortisol levels in early human development. *Psychoneuroendocrinology*, 2002; 27: 199-220
- (22) National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID = 5754.<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5754#section=Metabolite-Description>. Dostopno: 13-7-2017
- (23) Hansen M.A., Garde H.A., Persson R. Sources of biological and methodological variation in salivary cortisol and measurement among healthy adults: A review. *The Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 2008; 68 (6): 448-458
- (24) Luecken L.J., Gallo L.C. *Handbook of Physiological research methods in health psychology*. 1. izdaja. SAGE, California, 2008: 37-73
- (25) Jones A., Godfrey M.K., Wood P., Osmond C., Goulden P., Phillips D.I.W. Fetal Growth and the Adrenocortical Response to Psychological Stress. *The Journal of Clinical Endocrinology&Metabolism*, 2006; 91(5): 1868-1871
- (26) Mezzulo M., Fanelli F., Fazzini A., Fambineri A., Vicennati V., Di Dalmazi G., Pelusi C., Mazza R., Pagotto U. in Pasquali R. Validation of an LC-MS/MS salivary

- assay for glucocorticoid status assessment: Evaluation of the diurnal fluctuation of cortisol and cortisone and of their association within and between serum and saliva. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 2016; 163: 103-112
- (27) Inder J.W., Dimeski G., Russell A. Measurement of salivary cortisol in 2012 – laboratory techniques and clinical indications. *Clinical Endocrinology*, 2012; 77: 645-651
- (28) Duškova M., Šimunkova K., Vitku J. in sod. A Comparison of Salivary Steroid Levels during Diagnostic Tests for Adrenal Insufficiency. *Prague Medical Report*, 2016; 117: 18-33
- (29) Patel S.R. Shaw R.S. McIntyre E.H. McGarry W.G. Wallace M.A. Morning salivary cortisol versus short Synachten test as a test of adrenal suppression. *Ann Clin Biochem*, 2004; 41: 408-410
- (30) Perogamvros I., Owen J.L., Keevilt G.B., Brabant G., Trainer J.P. Measurement of salivary cortisol with liquid chromatography tandem mass spectrometry in patients undergoing dynamic endocrine testing. *Clinical Endocrinology*, 2010; 72: 17-21
- (31) Cornes P.M., Ashby H.L., Khalid Y., Buch N.H., Ford C., Gama R. Salivary cortisol and cortisone responses to tetracosactrin (synachten). *Annals of Clinical Biochemistry*, 2015; 52(5): 606-610
- (32) Abdu T.A.M., Elhadd T.A., Neary R., Clayton R.N. Comparison of the Low Dose Short Synachten Test (1 μ g), the Conventional Dose Short Synachten Test (250 μ g), and the Insulin Tolerance Test for Assessment of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis in Patients with Pituitary Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology&Metabolism*, 1999; 84(3): 838-843
- (33) Ferrante E., Morelli V., Giavoli C., Mantovani G., Verrua E. in sodelavci. Is the 250 μ g ACTH test a useful tool for the diagnosis of central hypoadrenalism in adult patients with pituitary disorders? *Hormones*, 2012; 11(4):428-435
- (34) Hurel S.J., Thompson C.J., Watson M.J., Harris M.M., Baylis P.H., Kendall-Taylor P. The short Synachten and insulin stress test in the assessment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Clinical Endocrinology*, 1996; 44:141-146
- (35) Miller R., Plessow F., Rauh M., Gröschl M., Kirschbaum C. Comparison of salivary cortisol as measured by different immunoassays and tandem mass spectrometry. *Psychoneuroendocrinology*, 2013; 38: 50-57

- (36) Grebe K.G.S., Singh J.R. LC-MS/MS in the Clinical Laboratory – Where to From Here? Clin Biochem Rev, 2011; 32: 5-31
- (37) Kulle A.E., Welzel M., Holterhus P.-M., Riepe F.G. Principles and clinical applications of liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of adrenal and gonadal steroid hormones. J. Endocrinol. Invest., 2011; 34: 702-708
- (38) Skoog A.D., West D.M., Holler J.F., Crouch R.S. Fundamentals of Analytical Chemistry. 9. izdaja. ZDA, Belmont: Brooks/Cole, 2014
- (39) Katalog Agilent Technologies. Basics of LC/MS. Primer. ZDA, 2001.
- (40) <https://www.sarstedt.com/en/products/diagnostic/salivasputum/product/51.1534.500/>. Dostopno: 25-8-2017
- (41) Casetta B. Development of a Simple and Fast Method for the Measurement by LC-MS/MS of Salivary Cortisol, Androstenedione and Testosterone. AB SCIEX, Monza, MB, Italy
- (42) Owen L.J., Haslam S., Adaway J.E., Wood P., Glenn C., Kevil B.G. A simplified liquid chromatography tandem mass spectrometry assay, using on-line solid-phase extraction, for the quantification of cortisol in saliva and comparison with a routine DELFIA method. Annals of Clinical Biochemistry, 2010; 47: 131-136
- (43) Turpeinen U., Välimäki M.J., Hämäläinen E. Determination of salivary cortisol by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Scandinavian Journal of Clinical&Laboratory Investigation, 2009; 69: 592-597
- (44) Perogamvros I., Owen L.J., Newell-Price J., Ray W.D., Trainer P.J., Keevil B.G. Simultaneous measurement of cortisol and cortisone in human saliva using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application in basal and stimulated conditions. Journal of Chromatography B, 2009; 877: 3771-3775
- (45) Prezelj M. Priporočila za overjanje (verifikacijo) merilnega postopka in instrumenta v kliničnem laboratoriju. Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (SZKKLM), 2017.
- (46) Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine. Rockville, MD, 2001.
- (47) Miller J. N., Miller J. C. Statistics and Chemometrics for analytical Chemistry. Sixth edition. England: Pearson, 2010.

- (48) Owen L.J., Adaway E.J., Davies S. in sod. Development of rapid assay for the analysis of serum cortisol and its implementation into a routine service laboratory. *Annals of Clinical Biochemistry*, 2013; 50(4): 345-352
- (49) Modhave Y. Matrix effect in bioanalysis: AN Overview. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, 2012; 1(6): 403-405
- (50) Jönsson A.G., Malmberg B., Amilon A., Garde H.A., Orbaek P. Determination of cortisol in human saliva using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2003; 784: 63-68
- (51) Gao W., Stalder T., Kirschbaum C. Quantitative analysis of estradiol and six other steroid hormones in human saliva using a high throughput liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay. *Talanta*, 2015; 143: 353-358

7 PRILOGE

PRILOGA I

V prilogi I so zbrani podatki o spolu in starosti preiskovancev, času odvzema vzorcev slin in izmerjene koncentracije kortizola v slini.

Priloga I: Preglednica prikazuje podatke o spolu, starosti, času odvzema vzorcev slin, skupini in koncentraciji kortizola ob času 0' (pred psihološkim testom/sinaktenskim testom) in času 60' (po psihološkem testiranju/sinaktenskem testu); M- moški, Ž-ženske, D – skupina s SBT1, K- kontrolna skupina, $c_{cort\ 0'}$ - koncentracija kortizola ob času 0', $c_{cort\ 60'}$ – koncentracija kortizola ob času 60'.

oseba	spol [M=0/Ž=1]	starost [leta]	čas odvzema 0' [h:min]	čas odvzema 60' [h:min]	D/K	$c_{cort\ 0'}$ [nmol/L]	$c_{cort\ 60'}$ [nmol/L]
1	1	10	08:45	09:54	D	3,73	16,8
2	0	15	09:06	10:06	D	14,0	40,0
3	1	9	08:40	09:40	D	3,61	22,7
4	1	8	08:30	09:30	D	3,92	26,0
5	0	13	08:45	09:45	D	6,13	44,1
6	1	11	dopoldan	dopoldan	D	19,7	36,8
7	1	13	dopoldan	dopoldan	D	5,88	47,6
8	1	14	08:40	09:40	D	6,62	49,8
9	1	13	08:45	09:45	D	4,00	35,3
10	0	15	08:45	09:45	D	3,12	38,8
11	0	12	08:30	09:30	D	4,59	27,0
12	1	12	dopoldan	dopoldan	D	2,79	35,7
13	0	14	08:03	09:03	D	8,47	39,7
14	1	14	08:20	09:20	D	9,94	51,5
15	1	15	dopoldan	dopoldan	D	13,5	33,8
16	1	14	dopoldan	dopoldan	D	5,88	35,4
17	1	12	08:29	09:30	D	5,74	40,9
18	0	12	08:45	09:45	D	4,49	29,3
19	1	9	07:48	08:48	D	18,9	42,7
20	0	10	dopoldan	dopoldan	D	2,89	39,1
21	0	14	08:37	09:37	D	6,89	22,0
22	1	8	dopoldan	dopoldan	D	7,15	22,0
23	0	13	08:20	09:20	D	11,4	34,6
24	1	10	dopoldan	dopoldan	D	3,69	26,3
25	1		08:02	09:02	D	4,72	33,6
26	0	10	07:47	08:47	D	3,30	44,6
27	0	11	08:25	09:25	D	2,58	21,8

28	0	13	dopoldan	dopoldan	D	-	32,1
29	1	13	dopoldan	dopoldan	D	6,05	37,2
30	1	11	dopoldan	dopoldan	D	6,97	38,8
31	1	13	08:10	09:10	D	2,60	42,3
32	1	15	08:57	09:57	D	7,13	52,7
33	0	12	08:50	09:50	D	10,3	51,2
34	0	12	dopoldan	dopoldan	D	11,5	20,1
35	0	13	07:37	08:40	D	21,2	36,0
36	1	13	08:30	09:30	D	5,33	31,9
37	0	13	08:40	09:40	D	8,24	26,9
38	0	9	08:10	09:10	D	5,29	23,3
39	0	-	dopoldan	dopoldan	D	10,1	30,7
40	1	-	dopoldan	dopoldan	D	11,1	22,1
41	1	-	dopoldan	dopoldan	D	12,3	21,9
42	1	-	dopoldan	dopoldan	D	15,8	29,4
43	0	-	dopoldan	dopoldan	D	18,1	40,7
44	1	14	08:40	09:40	D	8,49	-
45	0	-	dopoldan	dopoldan	D	17,5	40,8
46	0	-	dopoldan	dopoldan	D	16,1	27,2
47	0	-	dopoldan	dopoldan	D	5,90	31,6
48	0	-	dopoldan	dopoldan	D	29,3	54,2
49	1	-	dopoldan	dopoldan	D	18,6	71,0
50	1	-	dopoldan	dopoldan	D	10,2	24,1
51	0	-	dopoldan	dopoldan	D	12,0	35,3
52	1	14	dopoldan	dopoldan	D	8,61	41,1
53	0	-	dopoldan	dopoldan	D	6,58	30,3
54	0	-	dopoldan	dopoldan	D	6,54	27,9
55	0	9	07:59	08:59	D	6,19	32,2
56	1	9	dopoldan	dopoldan	D	10,1	29,2
57	0	10	08:07	09:07	D	9,55	25,0
58	1	14	07:11	08:11	D	8,20	31,0
59	0	12	08:06	09:07	D	8,55	35,1
60	1	15	08:19	09:23	D	2,97	32,1
61	1	11	08:58	10:02	D	9,18	29,6
62	1	14	08:46	09:46	D	3,96	37,4
63	0	10	07:20	08:30	D	5,80	26,2
64	0	9	08:33	09:33	D	11,2	39,6
65	0	10	dopoldan	dopoldan	D	14,3	49,3

66	0	11	07:51	08:51	D	5,35	20,0
67	0	12	08:57	10:00	D	2,73	19,8
68	0	8	08:13	09:20	D	4,92	33,9
69	1	14	08:28	09:35	D	3,24	41,4
70	1	12	08:19	09:25	D	3,79	34,9
71	0	15	08:37	09:39	D	5,99	27,3
72	0	13	07:57	09:00	D	2,95	23,6
73	1	11	dopoldan	09:23	D	8,22	34,5
74	1	8	08:02	09:05	D	6,03	34,3
75	0	9	07:32	08:30	D	9,68	-
76	1	14	dopoldan	dopoldan	D	14,9	57,9
77	1	12	07:19	08:19	D	13,8	57,0
78	1	11	dopoldan	dopoldan	D	5,19	-
79	0	9	07:23	08:23	D	4,86	28,3
80	1	12	07:57	08:57	D	-	31,6
81	1	11	07:46	08:46	D	8,34	25,5
82	0	10	07:14	08:14	D	9,78	18,1
83	1	11	07:40	08:40	D	-	27,9
84	1	15	dopoldan	dopoldan	D	9,31	-
85	1	11	07:27	08:27	D	-	21,9
86	1	10	07:34	08:34	D	12,6	21,6
87	1	13	09:03	10:03	K	8,49	8,12
88	-	-	07:35	08:16	K	2,99	2,67
89	-	-	08:22	09:20	K	3,20	2,24
90	-	9	07:02	08:02	K	5,37	3,34
91	1	9	07:42	08:25	K	9,16	5,43
92	-	10	07:40	08:42	K	5,15	2,89
93	-	-	07:36	08:12	K	12,5	6,09
94	1	13	08:15	08:35	K	6,17	5,78
95	1	13	08:25	09:15	K	2,69	7,40
96	1	10	07:48	08:46	K	10,4	8,65
97	1	12	09:00	09:40	K	9,98	6,19
98	0	13	07:40	08:30	K	10,7	6,58
99	0	15	dopoldan	dopoldan	K	3,20	30,3
100	0	12	08:38	09:24	K	4,49	3,57
101	0	10	07:37	08:26	K	9,02	7,44
102	-	9	07:38	08:25	K	5,76	4,06
103	-	12	08:57	09:57	K	5,78	9,31

104	1	9	08:53	09:30	K	6,05	6,36
105	0	-	08:19	09:02	K	3,90	2,93
106	1	12	08:55	09:35	K	2,71	2,52
107	-	13	08:08	08:54	K	10,3	8,71
108	0	10	07:53	08:56	K	4,16	2,05
109	1	10	07:47	08:43	K	2,34	1,48
110	1	10	07:42	09:13	K	4,78	1,95
111	0	9	07:50	08:45	K	6,17	8,75
112	1	14	07:34	08:40	K	8,22	2,99
113	1	-	07:40	09:40	K	8,30	1,60
114	1	15	07:37	08:27	K	10,0	12,0
115	0	-	07:35	08:33	K	9,25	4,49
116	0	9	07:49	08:35	K	11,2	3,96
117	-	-	07:55	08:55	K	6,29	3,55
118	1	15	07:48	08:48	K	8,30	3,85
119	0	10	07:45	08:57	K	2,87	2,42
120	1	9	07:48	09:02	K	8,18	2,42
121	1	9	07:51	09:06	K	2,89	1,87
122	-	-	08:55	09:45	K	6,72	1,66
123	-	11	07:50	08:47	K	6,74	2,75
124	-	-	07:50	08:50	K	3,98	2,32
125	0	-	08:15	09:05	K	5,80	2,75
126	-	9	08:06	08:51	K	8,84	4,16
127	-	-	08:13	09:15	K	1,68	1,31
128	-	-	07:33	08:33	K	4,49	2,38
129	-	-	07:35	08:15	K	4,80	2,79
130	1	11	07:37	08:34	K	12,8	6,13
131	0	11	07:40	08:38	K	10,2	3,63
132	0	-	07:38	08:30	K	10,7	4,88
133	0	10	07:35	08:33	K	4,76	1,70
134	-	-	07:34	08:34	K	5,37	2,60
135	1	11	08:08	dopoldan	K	4,22	2,28
136	-	-	07:34	08:39	K	2,99	3,18
137	-	-	07:39	08:49	K	5,39	2,54
138	1	8	07:50	08:41	K	2,50	2,79
139	-	-	07:35	08:20	K	6,89	3,01
140	0	8	07:37	08:50	K	17,5	4,63

PRILOGA II

V prilogi II je prikazan izpis t-testa dveh neodvisnih vzorcev iz programa SPSS. S t-testom za dva neodvisna vzorca smo primerjali koncentracijo kortizola ob času 0' med kontrolno skupino in skupino s SBT1.

Priloga II: Izpis programa SPSS - rezultati t-testa dveh neodvisnih vzorcev. Primerjali smo starost in koncentracijo ob času 0' med kontrolno skupino (K) in skupino s SBT1 (D).

Opisna statistika

	K/D	N	\bar{x}	SD	SE
starost (leta)	D	71	11,8	2,06	0,245
	K	36	10,9	2,02	0,337
kortizol 0' (nmol/L)	D	82	8,55	5,12	0,566
	K	54	6,62	3,28	0,447

T-test dveh neodvisnih vzorcev

		Levenov test enakosti varianc		t-test enakosti varianc	
		F	p-vrednost	t	df
starost (leta)	Enakost varianc velja	0,059	0,808	2,12	105
	Enakost varianc ne velja			2,13	71,7
kortizol 0' (nmol/L)	Enakost varianc velja	6,48	0,012	2,46	134
	Enakost varianc ne velja			2,68	133

		t-test dveh neodvisnih vzorcev		
		p-vrednost (2-stranska)	povprečna razlika	SE
starost (leta)	Enakost varianc velja	0,037	0,886	0,419
	Enakost varianc ne velja	0,037	0,886	0,416
kortizol 0' (nmol/L)	Enakost varianc velja	0,015	1,93	0,786
	Enakost varianc ne velja	0,008	1,93	0,721

		t-test dveh neodvisnih vzorcev	
		95% interval zaupanja	
		spodnja meja	zgornja meja
starost (leta)	Enakost varianc velja	0,056	1,72
	Enakost varianc ne velja	0,057	1,72
kortizol 0' (nmol/L)	Enakost varianc velja	0,375	3,49
	Enakost varianc ne velja	0,504	3,36

PRILOGA III

V prilogi III je prikazan izpis t-testa dveh odvisnih vzorcev iz programa SPSS. S t-testom za dva odvisna vzorca smo primerjali koncentracije kortizola ob času 0' in 60' v kontrolni skupini.

Priloga III: Izpis programa SPSS – rezultati t-testa dveh odvisnih vzorcev (parni t-test). Primerjali smo koncentracijo kortizola ob času 0' in času 60' v kontrolni skupini.

Opisna statistika

	\bar{x}	N	SD	SE
kortizol 60' (nmol/L)	4,66	54	4,30	0,586
kortizol 0' (nmol/L)	6,62	54	3,28	0,447

T-test dveh odvisnih vzorcev

	N	korelacija	p-vrednost
kortizol 60'&kortizol 0' (nmol/L)	54	0,154	0,266

	t-test dveh odvisnih vzorcev			
	povprečna razlika	SD	SE	95% interval zaupanja
				spodnja meja
kortizol 60'&kortizol 0' (nmol/L)	-1,96	4,99	0,679	-3,33

	t-test dveh odvisnih vzorcev	t	df	p-vrednost (2-stranska)
	95% interval zaupanja			
	zgornja meja			
kortizol 60'&kortizol 0' (nmol/L)	-0,599	-2,89	53	0,006

PRILOGA IV

V prilogi IV je prikazan izpis t-testa dveh odvisnih vzorcev iz programa SPSS. S t-testom za dva odvisna vzorca smo primerjali koncentracije kortizola ob času 0' in 60' v skupini s SBT1.

Priloga IV: Izpis programa SPSS – rezultati t-testa dveh odvisnih vzorcev (parni t-test). Primerjali smo koncentracijo kortizola ob času 0' in času 60' v skupini s SBT1.

Opisna statistika

	\bar{x}	N	SD	SE
kortizol 60' (nmol/L)	34,2	78	10,5	1,19
kortizol 0' (nmol/L)	8,57	78	5,24	0,593

T-test dveh odvisnih vzorcev

	N	korelacija	p-vrednost
kortizol 60'&kortizol 0' (nmol/L)	78	0,361	0,001

	t-test dveh odvisnih vzorcev			
	povprečna razlika	SD	SE	95% interval zaupanja
				spodnja meja
kortizol 60'&kortizol 0' (nmol/L)	25,7	9,91	1,12	23,4

	t-test dveh odvisnih vzorcev	t	p-vrednost (2-stranska)
	95% interval zaupanja		
	zgornja meja		
kortizol 60'&kortizol 0' (nmol/L)	27,9	22,9	0,000

PRILOGA V

V prilogi V je prikazan izpis korelacijske analize iz programa SPSS. S korelacijsko analizo smo preverili ali med koncentracijo kortizola v krvi in slini po sinaktenskem testu v skupini s SBT1 obstaja linearna povezava.

Priloga V: Izpis programa SPSS – rezultati korelacijske analize. Primerjali smo koncentracije kortizola v krvi in slini po sinaktenskem testu v skupini s SBT1.

Opisna statistika

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
kortizol 60' slina (nmol/L)	82	16,8	70,9	33,9	10,4
kortizol 60' serum (nmol/L)	65	491	1073	749	118

Korelacijska analiza

		kortizol 60' slina (nmol/L)	kortizol 60' serum (nmol/L)
kortizol 60' slina (nmol/L)	Pearsonov koeficient korelacije	1	0,407
	p-vrednost (2-stranska)		0,001
	N	82	64
kortizol 60' serum (nmol/L)	Pearsonov koeficient korelacije	0,407	1
	p-vrednost (2-stranska)	0,001	
	N	64	65