

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NEJC ŠPENDAL

**KONCENTRACIJA KORTIZOLA V SLINI KOT
POKAZATELJ STRESA PRI OTROCIH MED
MANJŠIM OPERATIVNIM POSEGOM**

**THE CONCENTRATION OF CORTISOL IN SALIVA AS AN INDICATOR
OF STRESS IN CHILDREN DURING MINOR OPERATIVE INTERVENTION**

LJUBLJANA, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja. Meritve sem opravil v Hormonskem laboratoriju na KIKKB, Ljubljana.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja

Podpis:

Zahvala

Zahvaljujem se prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., da me je sprejel pod svoje mentorstvo, za uspešno vodenje, svetovanje in pomoč pri izdelavi in oblikovanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi mojim staršem, za njihovo potrpežljivost in podporo tekom celotnega študija.

KAZALO VSEBINE

KAZALO.....	4
POVZETEK.....	6
SEZNAM OKRAJŠAV.....	8
1. UVOD.....	9
1.1. FIZIOLOGIJA HORMONOV.....	9
1.1.1. Regulacija izločanja hormonov.....	10
1.1.2. Vloga hipotalamusa in hipofize.....	10
1.1.3. Nadledvična žleza.....	11
1.2. STRES.....	11
1.2.1. Oksidativni stres.....	11
1.3. STRES IN OBVLADOVANJE STRESA.....	12
1.4. VPLIV STRESA NA TELO.....	15
1.4.1. Simpatično-adrenergični system.....	15
1.4.2. Stres in hormoni skorje nadledvične žleze.....	16
1.4.3. Psiho-nevro-imunologija.....	17
1.4.4. Psihonevroimunološki mehanizmi.....	17
1.4.5. Psihološki stres	18
1.4.6. Vpliv stresa na možgane.....	19
1.5. OCENJEVANJE STRESA.....	20
1.5.1. Stresna reakcija.....	20
1.5.2. Hormonske spremembe ob stresu.....	21
1.6. VPLIV ANESTEZIJE NA STRES.....	24
1.6.1. Definicija anestezije.....	24
1.6.2. Splošna anestezija.....	24
1.6.3. Faze splošne anestezije.....	24
1.6.4. Lokalna anestezija.....	25
1.7. SPLOŠNO O KORTIZOLU.....	26

1.7.1. Merjenje nivoja kortizola v slini.....	27
1.7.2. Kortizol-ritmi izločanja.....	28
1.7.3. Biološki vzorci za določanje kortizola.....	29
1.8. TRANSPORT KORTIZOLA.....	31
1.8.1. Prednosti in slabosti vzorčenja sline.....	31
1.9. METODE ZA DOLOČANJE HORMONOV V SLINI.....	33
1.9.1. Imunološke metode.....	33
1.9.2. Kromatografske metode.....	34
1.9.3. Glavne lastnosti imunoanaliz.....	34
1.9.4. Predanalitični postopki.....	36
1.9.5. Odvzem sline	37
2. NAMEN DELA.....	38
3. EKSPERIMENTALNO DELO.....	39
3.1. METODE DELA.....	39
3.2. POSTOPEK ANALIZE.....	40
3.3. MATERIALI, OPREMA, REAGENTI.....	40
3.4. POTEK DELA.....	41
3.5. RAČUNANJE REZULTATOV.....	42
3.6. PRIČAKOVANE NORMALNE VREDNOSTI.....	42
4. REZULTATI.....	45
5. RAZPRAVA.....	47
6. SKLEPI.....	50
7. LITERATURA.....	51

POVZETEK

Kortizol je glavni glukokortikoid, ki ga sintetizira in izloča fascikularna cona skorje nadledvične žleze. Kortizol se v krvi nahaja v prosti obliki ali vezan na beljakovinski nosilec. 90 % ga je vezanega na kortizol vezujoči globulin, okoli 7 % pa na albumin. 1-3 % kortizola je prostega v krvi in ta predstavlja biološko aktivno obliko. Samo nevezni kortizol prosto prehaja v slino s pomočjo pasivne difuzije. Z določanjem nivoja kortizola v slini, lahko sklepamo tudi na prisotnost stresa v organizmu.

Diplomsko delo obsega določanje hormona kortizola v slini, kot pokazatelj stresa pri otrocih med manjšim operativnim posegom v UKC Ljubljana.

V ta namen smo izvajali meritve na skupini 22 otrok, (starih 5-7 let), in sicer nas je zanimala koncentracija kortizola v slini pred in po operativnem posegu.

Metode za določevanje hormonov v slini delimo na imunološke in kromatografske. Koncentracijo kortizola v slini smo določali z ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) imunološko metodo. Ta je osnovana na principu kompetitivne vezave. Endogeni kortizol, ki izhaja iz vzorca pacienta, tekmuje s kortizolom, označenim s konjugatom hrenove peroksidaze, za vezavo z zajčimi protitelesi. Nato izmerimo absorbanco z spektrofotometrom pri 450 nm. Določili smo prosto frakcijo kortizola v slini.

Analize, pri katerih se uporabljajo vzorci sline, ki so dobljeni z neinvazivnimi kvalitativnimi in kvantitativnimi tehnikami, so pri sodobni analitiki postale zelo pomembne. Zaradi lahke dostopnosti zbiranja ima slina številne prednosti v primerjavi s klasičnimi biološkimi vzorci, kot so kri, plazma in urin.

Rezultati naših meritev so pokazali, da se je pri 16 preiskovancih raven kortizola v slini, med operativnim posegom znižala, iz česar lahko povzamemo, da operacija ni predstavljala dodatnega stresa. Pri ostalih 6 otrocih pa se je raven kortizola povečala, kar kaže na povečanje stresa. Na osnovi naše raziskave zaključimo, da je prisotnost stresa na skupini majhnih otrok, med operativnim posegom relativno majhna.

ABSTRACT

Cortisol is the main glucocorticoid, produced and secreted by the adrenal cortex. In blood cortisol is in a free form or bounded on a protein carrier. 90 % it is bounded on a cortisol binding globulin, approximately 7 % is bounded on a albumin and about 1-3 % of cortisol in blood is in a free form. Only free formed cortisol can pass into saliva with a passive diffusion. By setting the level of cortisol in saliva, can be deduced the presence of stress in the body.

The diploma thesis consists determination of a hormone cortisol in saliva, which shows us the level of stress in children, during a small surgical procedure in UKC Ljubljana.

For this purpose, we have performed measurements on a group of 22 children, between age five and seven and we were interested in concentration of cortisol in saliva, before and after the operative procedure.

Methods for hormone determination in saliva are divided to the immunological and chromatographic. We have determined cortisol concentration with ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) immunological method. This method is based on the principle of competitive binding. Endogenous cortisol of a patient sample competes with a cortisol-horseradish peroxidase conjugate for binding to the coated rabbit antibody. We have to determine absorbance of each well at 450 nm with a spectrophotometer. We have determined a free fraction of cortisol in saliva.

In modern analytics the assays in which are used saliva samples, have become very important because of non-invasive qualitative and quantitative techniques. There are many advantages of a saliva sampling compared to classical biological samples, like blood, plasma and urine, mostly because it is easy to collect samples.

The results of our measurements showed, that in the 17 subjects the level of cortisol in saliva, during operative intervention has decreased, which can be summarized, that the operation is not an extra stress. In the remaining 6 children the level of cortisol has increased, which shows us that the stress has increased. The conclusion based on our research can be, that the presence of stress in a group of small children during operative intervention is relatively small.

SEZNAM OKRAJŠAV

A - adrenalin
Ab - protitelo
ACTH – adrenokortikotropni hormon
Ag - antigen
AVP - arginin vazopresin
B - beljakovine
CBG – kortizol vezujoči globulin
CRH – kortikoliberin
DNA – deoksiribonukleinska kislina
DHT – dihidrotestosteron
DHEA – dehidroepiandrosteron
ELISA – (angl. Enzyme-linked-imosorbent assay)
GH – rastni hormon
H - hipotalamus
HHSO – hipotalamo-hipofizno-suprarenalna os
IL – interlevkin
KA - kateholamini
KO - kortizol
KV – koeficient variacije
LIA – kemiluminescenčna metoda
M - maščobe
NA - noradrenalin
OH – ogljikovi hidrati
RIA – radioimunološka metoda
SAS – simpatično-adrenergična os
SD – standardna deviacija
TNF – tumor nekrotizirajoči faktor
UKC – Univerzitetni klinični center
VP - vazopresin
x – aritmetična srednja vrednost vzorca

1.UVOD

1.1 FIZIOLOGIJA HORMONOV

Hormone izločajo endokrine žleze. Te žleze imenujemo tisto skupino organov, v katerih nastajajo določene kemične snovi, ki preidejo v kri, se porazdelijo po vsem organizmu in spremenijo delovanje posebnih občutljivih celic. Za endokrine žleze je značilno notranje izločanje; so brez izvodil, po katerih bi njihovi izločki iztekali, zato se izločajo neposredno v kri. Snovi, ki nastajajo v endokrinih žlezah, so hormoni (1).

Hormoni so pomembni pri rasti, razvoju in razmnoževanju. Glede na kemijsko strukturo delimo hormone v tri skupine:

- STEROIDNI HORMONI,
- PEPTIDI IN PROTEINI,
- DERIVATI AMINOKISLIN (1).

Najpomembnejše endokrine žleze so: nevrohipofiza, adenohipofiza, ščitnica, obščitnica, Langerhansovi otočki trebušne slinavke, želodčni in črevesni epitel, skorja in sredica nadledvične žleze, moda in jajčniki. Seveda pa kot žleze z notranjim izločanjem delujejo tudi druge občasne strukture, npr. posteljica in rumeno telesce jajčnikov (1).

Hormoni učinkujejo na specifične tarčne celice z receptorji, ki vežejo ta hormon. V krvi so hormoni prosto raztopljeni (vodotopni hormoni) ali vezani na transportne beljakovine (steroidni in tiroidni hormoni). Natančno uravnavanje sproščanja hormonov iz žlez z notranjim izločanjem preprečuje premajhno ali čezmerno izločanje hormonov. Izločanje hormonov uravnava živčni dražljaji, spremembe v kemični sestavi plazme ter spremembe v koncentraciji drugih hormonov (1).

1.1.1. REGULACIJA IZLOČANJA HORMONOV

Uravnavanje izločanja hormonov se lahko izvrši preko mehanizma živčne regulacije ali preko mehanizma povratnih zvez. Mehanizem povratne zveze temelji na povratni informaciji nekega elementa fiziološkega odgovora hormonov na endokrino žlezo, ki izloča ta hormon. Rezultat je povečano ali zmanjšano izločanje hormonov. Povratna zveza je lahko pozitivna ali negativna. Večinoma poteka uravnavanje endokrine funkcije preko negativne povratne zveze, delno tudi preko pozitivne (oksidocin pri porodu) (1).

1.1.2. VLOGA HIPOTALAMUSA IN HIPOFIZE

Hipotalamus sodeluje pri uravnavanju mnogih endokrinih funkcij v organizmu, hkrati pa uravnava aktivnost avtonomnega živčevja. Hipotalmične živčne celice vplivajo na endokrini sistem hipofize neposredno preko svojih aksonov ali posredno preko hipofiznega portalnega sistema. Hipotalamus preko hipofize uravnava telesno rast, razvoj, presnovo in homeostazo organizma. Hipofiza ima dva dela: prednji ali anteriorni reženj (adenohipofiza) in zadnji ali posteriorni reženj (nevrohipofiza). Izločanje hormonov iz prednjega režnja hipofize uravnavajo sproščujoči ali zavirajoči hormoni hipotalamusa. Ti hormoni se izločajo v hipofizni portalni sistem ter vstopajo v bogat kapilarni pletež prednjega režnja hipofize. Histološko pa lahko v anteriornem delu hipofize ločimo pet skupin celic, ki izločajo šest peptidnih hormonov:

1. Somatotropne celice izločajo človeški rastni hormon (hGH),
2. Laktotropne celice izločajo prolaktin (PRL),
3. Tirotropne celice izločajo tirotropin (TSH),
4. Gonadotropne celice izločajo folikle stimulirajoči hormon (FSH) in luteinizirajoči hormon (LH),
5. Kortikotropne celice izločajo adrenokortikotropni hormon (ACTH) in melanocite stimulirajoči hormon (MSH); njuno izločanje sproži kortikotropni sproščujoči hormon (CTH); ACTH ob vezavi na celice v skorji nadledvične žleze sproži izločanje glukokortikoidov.

Zadnji hipofizni reženj izloča dva peptidna hormona: oksidocin in antidiuretični hormon (ADH) (2).

1.1.3. NADLEDVIČNA ŽLEZA

Ta žleza se nahaja ob straneh hrbtenice, v višini prvega ledvenega vretenca na zgornji strani ledvic. Obe nadledvični žlezi sta sestavljeni iz sredice in iz skorje, ki imata različne funkcije. V sredici nastajata dva hormona, to sta adrenalin in noradrenalin. Skorja nadledvične žleze vsebuje tri koncentrične plasti, od celotne žleze ji pripada kar 80 % tkiva in zloča adrenokortikoidne hormone: glukokortikoide, mineralokortikoide in androgene (3).

1.2. STRES

Naše telo je izpostavljeno vplivom različnih oblik stresa, tako fizičnemu, psihičnemu ali kemičnemu, vsem pa je skupno, da lahko zelo negativno vplivajo na naš organizem. Seveda je določena količina stresa vedno prisotna in nekako usmerja, pospešuje ali zavira delovanje človeškega telesa. Žal pa smo danes vsi prepogosto pod hudim in prekomernim stresom, ki uničuje naše notranje ravnovesje. Pri našem delu smo se sicer omejili na telesni stres pri otrocih, pri izvedbi manjšega operativnega posega. Tu se razvijejo hormonski, metabolni, hemodinamski in imunološki odgovori, ki so za pacienta lahko škodljivi. Ob tem ne smemo pozabiti na splošni adaptacijski sindrom.

1.2.1. OKSIDATIVNI STRES

Kot prvo obliko stresa, ki jo je potrebno omeniti, je oksidativni stres. Tej obliki stresa so zaradi pridobivanja energije s pomočjo kisika, izpostavljeni prav vsi aerobni organizmi. Kritično pri oksidativnem stresu je to, da opozori nase šele ob izbruhu določenih bolezni. Škodljiv vpliv radikalov, katerih presežek predstavlja glavni razlog za tovrstni stres danes že zelo dobro poznamo. Poglavitno pri oksidativnem stresu je zaznavanje le-tega in pravočasno ukrepanje oziroma preprečevanje pri izbruhu mnogih bolezni (4).

Dejavnikov, ki pospešujejo oksidativni stres je namreč veliko, mednje pa prav gotovo sodijo način življenja (pitje alkohola, kajenje) oziroma hiter življenski slog, prehrana, onesnaženost okolja (sevanje), zdravila, razvade, seveda moramo ob tem upoštevati, da so

lahko nekateri od teh dejavnikov gensko pogojeni. Povečanje oksidativnega stresa pa lahko sproži tudi intenzivna fizična aktivnost, ki je neposredno povezana z večjim vnosom kisika v telo in posledično povečano tvorbo radikalov. To seveda velja za ljudi z neredno ali pretirano telesno aktivnostjo, na katero telo ni prilagojeno (4).

Pri oksidativnem stresu gre za neravnovesje, ki se v organizmu pojavi zaradi prevelike produkcije radikalov in/ali zmanjšane učinkovitosti antioksidativnih sistemov. Sinteza določenih hormonov (melatonin) prav tako vključuje tvorbo radikalov. Nadalje proizvajajo radikale nekatere vrste levkocitov, kot orožje za uničenje bakterij, kar zagotavlja pomemben obrambni mehanizem pred okužbami. Tako lahko povzamemo da so radikali, stalni spremljevalci celične presnove. Vendar pa v določenih okoliščinah postane proizvodnja teh agensov prevelika, kar za celice pomeni smrtno grožnjo (5).

Oksidativni stres je odgovoren za zgodnje staranje ter za vrsto pomembnih bolezni, kot so ateroskleroza, možganska kap, srčni infarkt, Alzheimerjeva bolezen, sladkorna bolezen, kronični bronhitis, siva mrena, nekatere vrste raka in drugo. Sicer pa sam oksidativni stres ne kaže neke tipične klinične slike oziroma simptomov, ki bi nakazovali navzven njegovo prisotnost v organizmu in prav to je tista največja nevarnost. Zdrav organizem je sposoben preprečiti škodljivo delovanje radikalov. V telesu namreč obstaja naravni obrambni mehanizem, ki ga sestavljajo različni encimski sistemi in ostale snovi pod skupnim imenom antioksidanti (4).

1.3. Stres in obvladovanje stresa

Izraz stres izhaja iz angleščine (angl. stress) in pomeni obremenitev, pritisk ali napetost. Velika večina ljudi, ki se ukvarja s stresom, ga prevaja kot obremenitev in pri tem misli predvsem na psihično obremenitev. Danes je stres opredeljen kot odziv organizma na vsak stresogeni dejavnik. Pri tem je odziv biološki in zajame celo telo, ne samo dušo.

Stres je fiziološki, psihološki in vedenjski odgovor posameznika, ki se skuša prilagoditi in privaditi na notranje in zunanje pritiske (stresorje). Stresor pa je dogodek, situacija, oseba ali predmet, ki ga posameznik doživi kot stresni element in katerega rezultat je stres. Stres in dejavniki stresa niso za vse ljudi enaki in enako težko (ali lahko) rešljivi, pač pa ju določajo posameznikova osebnost, njegove izkušnje, okoliščine, v katerih se pojavita, ter

širše in ožje okolje, v katerem živi oseba. Pomembni so tudi življenjska naravnost posameznika in trdnost, ter kakovost mreže človeških odnosov, ki ga obdajajo. Tako lahko sklenemo, da bo določeni dogodek, za nekoga stresor, za drugega pa dobrodošla spodbuda v življenju. Razmerje med svojimi lastnimi zahtevami in zahtevami okolja ter sposobnostjo reševanja je tisto, ki nam pove, ali bo stres škodljiv in uničevalen, ali pa ga bomo obvladali in nas bo celo spodbudil k dejanjem. Določena količina stresa je nujno potrebna za normalno življenje. Popolno prenehanje stresa pomeni smrt. Humor pa je pomočnik, ki bi ga nikdar ne smeli podcenjevati in zanemariti ob preobremenjenosti in stresnih reakcijah (6).

Nekateri vedenjski znaki stresa:

- tesnoba, nemir, napetost, zaskrbljenost,
- potrtost, občutek nemoči in obupa, depresija,
- nespečnost, razbijanje srca,
- splošna mišična napetost,
- glavobol,
- motnje v spolnosti,
- motnje hranjenja.

Zdi se, da nastane problem tam in takrat, ko je stresnih situacij preveč, so preveč zgoščene, intenzivne ali premočne. Zelo travmatična je akutna stresna reakcija, ki je povezana z kakim izjemno (duševno ali telesno) težkim stresnim dogodkom (6).

Stres je naravno dejstvo in ga moramo v naravnih danostih jemati kot nekaj pozitivnega.

Sile, energije in vplivi iz zunanjega sveta vplivajo na vsako živo bitje, ga silijo v spremembe, na katere se mora organizem telesno, psihično ali vedenjsko prilagoditi.

Majhen stres pomaga, da smo bolj kreativni, motivirani in uspešnejši (7).

Danes je stres dobil negativni predznak in pomeni nekaj slabega, škodljivega. Današnji stres se od tistega pred 100.000 leti bistveno razlikuje, saj je sodobni človek probleme s hrano, z vodo in bivalnim prostorom razrešil- pestijo ga drugačni problemi: ljudje na delovnem mestu, slaba komunikacija, odtujenost, prehitri življenjski ritem, zdravstvene težave, premalo počitka, zabave in spanca. Dejstvo je, da je čezmerni stres škodljiv za zdravje.

Po epidemioloških prognozah bosta leta 2020 najpogostejša vzroka smrti srčno-žilne bolezni na prvem in depresija na drugem mestu. Oboje je povezano s kroničnim stresom. Kronični stres je povezan tudi z epidemijo in pandemijo debelosti, ki je prav tako povezana s številnimi boleznimi, med drugim tudi s srčno-žilnimi boleznimi in z depresijo (7).

Znani pozitivni dejavniki, ki naj bi jih upoštevali za doseg uravnoveženega in zdravega življenja, se ponovijo tudi tu: zdrava in uravnovežena prehrana, redna telesna dejavnost, ki nam je v veselje, sprostitvev, mirno dihanje, poznavanje stresa, stresorjev in njihovega delovanje ter svojih odzivanj na stresno situacijo. Pomemben je odprt in pozitiven odnos do sebe, ljudi in sveta okoli sebe ter pomirjenost s situacijo, ki je ne moremo spremeniti. Pri obvladovanju stresnih situacij je zelo pomembno, da znamo in zmoremo obvladovati svoj čas, ter da se v nekaterih primerih naučimo reči NE, ko česa ne zmoremo ali ne obvladamo. Če se želimo uspešno upreti nadvladi stresa, moramo najprej ugotoviti, na kakšen način lažje obvladujemo težave, kakšen je naš «lastni stil» reševanja težav. Vsak si v življenju najde svoje, povsem individualne načine, ki ustrezajo njegovi osebnosti, temperamentu, količini energije, ki jo premore in ki jo lahko potroši, pa tudi seveda načine, ki so osnovani na dobrih rezultatih reševanja problemov iz preteklosti (6, 7).

Če želimo dobro obvladati stres, moramo ugotoviti vzročno povezavo med stresorjem in stresom, saj šele razumevanje vzroka in posledice omogoči boj proti posledicam. Vsak živi organizem mora za normalno delovanje in preživetje vzdrževati stalno notranje okolje ali homeostazo, ne glede na spremembe v zunanjem okolju. Na nove zunanje okoliščine in stresogene dejavnike se mora telo prilagajati (homeostatski mehanizmi) na molekularni, celični, fiziološki, psihološki in vedenjski ravni. V luči vzdrževanja homeostaze lahko stres opredelimo kot vsako grožnjo, uperjeno v smeri rušenja homeostaze.

Danes vemo, da emocionalni, mentalni, psihološki, socialni in vedenjski dejavniki pomembno vplivajo na naše zdravje.

Obstajajo tudi tehnike z ugodnim učinkom na možgane, duševnost in zdravje. Med te tehnike uvrščamo tehnike relaksacije, yoge, tai chi-ja, avtogeni trening ali meditacija. Meditacija je zavestni mentalni proces, ki v možganih povzroči povečano delovanje dela možganov, ki je povezan s pozitivnim emocionalnim stanjem in z izboljšanjem imunskega sistema. Pomembna je ugotovitev, da ni vse v genih, usodi, slučajnostih, zarotah ali posledica delovanja višjih sil (razne negativne misli, na primer, «življenje me tepe»,

«nimam sreče v življenju,...»). Na bolezen lahko tako aktivno vplivamo že preko pozitivnih misli in verovanja (6).

1.4. VPLIV STRESA NA TELO

Stresni odziv povezuje več možganskih področij (hipotalamus, amigdala in hipokampus). Eferentni nevroendokrinoški odgovor poteka preko dveh med seboj povezanih poti-simpatično-adrenergične osi in njene stimulacije (SAS), ter hipotalamo-hipofizno-suprarenalne osi (HHSO) (7).

1.4.1. Simpatično-adrenergični sistem

V simpatično-adrenergični reakciji sodelujejo frontalni reženj, hipotalamus, medula oblongata, simpatična vlakna avtonomnega živčnega sistema, sredica nadledvične žleze in kateholamini (hormona adrenalin in noradrenalin). Simpatično-adrenergični sistem v ožjem pomenu besede tvorijo simpatični živci in kateholamini.

Aktivacija SAS sistema je prva ključna reakcija v telesu, ki se prične v možganski skorji. Možganska skorja se na izziv (stresogeni dejavnik) odzove z aktivacijo avtonomnega živčnega sistema, kateremu pripada tudi simpatični živčni sistem. Simpatični živčni sistem telo pripravi na takojšno akcijo (odziv spopad-ali-umik), medtem ko simpatična vlakna hkrati vzpodbudijo sredico nadledvične žleze, da izplavi stresna hormona adrenalin in noradrenalin. Simpatična živčna vlakna se na stresogeni dejavnik odzovejo v hipu, medtem ko je za izplavljanje kateholaminov v kri in doseganje učinka na celicah potrebnih nekaj sekund. Hormona povzročita povečanje srčnega utripa, krčljivosti srčne mišice, arterijskega tlaka, minutnega volumna, usmeritev krvi iz prebavil v skeletne mišice za »spopad-ali-umik« in sprostitvev energije (glukoza) (7).

Čezmerna aktivnost simpatično-adrenergičnega sistema se kaže v številnih kvarnih učinkih, predvsem kot akutne srčno-žilne bolezni. Mednje spadajo arterijska hipertenzija, tahikardija, številne nevarne motnje srčnega ritma, kot tudi zelo nevarne motnje srčnega ritma, ki se lahko končajo s smrtnim izidom. Čezmerna akutna SAS se lahko kaže kot čezmerna nagnjenost k strjevanju krvi, povečana poraba kisika in zmanjšano dovajanje kisika srčni mišici zaradi vazospazmov, kot ishemija srčne mišice, akutni koronarni sindrom, dehidracija in v obliki psiholoških sprememb (7).

1.4.2. Stres in hormoni skorje nadledvične žleze

Skorja nadledvične žleze izloča tri razrede steroidnih hormonov: glukokortikoide, mineralokortikoide in androgene. Psihični in telesni stres stimilirata hipotalamo-hipofizno-suprarenalni sistem (HHSO), pri katerem se najprej sprosti kortikotropni sproščujoči hormon (CRH) iz hipotalamusa. CRH povzroči sprostitvev adreno-kortikotropnega hormona (ACTH) iz adenohipofize, ki nato preko hipotalamo-hipofizno-suprarenalne osi stimulira izplavljanje kortizola iz skorje nadledvične žleze. Omenjene hormonske spremembe spremljajo tudi spremembe drugih hormonov, predvsem v smeri mobilizacije energije (glukoze), na primer zvišanje glukagona, ravnega hormona, znižanje insulina, ščitničnih in spolnih hormonov. V akutnem stresnem odgovoru je namreč vsa presnova usmerjena v tvorjenje energije. Odvijajo se samo presnovni procesi, ki pripravljajo telo na spopad ali umik. Določanje adrenalina, noradrenalina in kortizola se pogosto uporablja za objektivno prikazovanje stopnje stresa pri posamezniku (7).

Enostavno povedano, telo se »postavi« v višjo prestavo. Tako kot avto, potrebuje več energije za hitrost, refleksnost, koncentracijo, poskočnost, da se ščiti ali da »teče« kakor hitro more. Ko se to zgodi, hipotalamus, majcena žleza v možganih pošlje ALARM skozi možganske živčne celice v vse organe našega telesa! Kombinacija živčnih in hormonskih signalov povzroči, da se v nadledvični žlezi sprosti cel niz hormonov, od katerih dobro poznamo adrenalin in kortizol.

Adrenalin dvigne srčni utrip, poveča cirkulacijo krvi in s tem omogoči boljši pretok krvi. Kortizol, najpomembnejši stresni hormon, poveča količino sladkorja (glukoze) v krvi in posledično v možganih. Omogoča dostopnost niza snovi za obnovo celic in tkiv (ob stresu nastajajo celične poškodbe in s tem poškodbe tkiv). Kortizol tudi dvigne imunski sistem, pri tem zmanjša delovanje «manj potrebnih» organov, kot so prebavila, razmnoževalni organ in proces rasti. Naše telo vedno deluje zelo racionalno. Ob pomanjkanju energije, racionalno izloči vse tiste funkcije, ki v tistem trenutku niso življenjsko pomembne (6).

Kronična čezmerna aktivacija HHSO se kaže predvsem v stalno zvišanih plazemskih vrednostih in nefiziološkemu ritmu izločanja glukokortikoidov. Posledice kroničnega stresa se kažejo predvsem v presnovnih motnjah, kot so sladkorna bolezen, dislipidemija, debelost, arterijska hipertenzija in v psiholoških spremembah oseb, kot hujša posledica pa se pojavijo razgradnja mišic, zmanjšan vnetni odziv in zavrt imunski sistem. Učinki stalnega zvišanja glukokortikoidov na telo se kažejo v Cushingonovi bolezni, ki sicer ni posledica stresa.

Stalno zvišana raven kortizola pri osebah v kroničnem stresu povzroča motnje v spominu in koncentraciji, vedenjske in emocionalne spremembe, vse do anksioznosti, depresije in samomora. Stalno zvišan kortizol povratno deluje na možgane in vpliva na njihovo delovanje in strukturo. Depresivni ljudje imajo v primerjavi z ljudmi z manj stresa strukturne spremembe na možganih (7).

1.4.3. Psiho-nevro-imunologija

S posledicami stresa na imunski sistem se ukvarja psiho-imunologija. Imunski sistem je zelo zapleten sistem, ki nas ščiti pred telesu tujimi bakterijami, virusi ali rakastimi celicami. Znano je, da stres lahko zmanjša učinkovitost imuskega sistema in njegovo vlogo zaščitnika pred boleznimi. Po stresu odpornost telesa pade, medtem ko se nagnjenost k infektom poveča.

Stres vpliva na delovanje imuskega sistema preko emocionalnih in vedenjskih sprememb (strah, napetost, jeza, žalost, negotovost), biokemijskih (adrenalin, noradrenalin, glukokortikoidni hormoni) in fizioloških sprememb (srčni utrip, arterijski tlak).

Kratkotrajni stres je koristen, medtem ko ponavljajoči ali kronični stres poruši ravnovesje (homeostazo) in povzroči bolezen (8).

1.4.4. Psihonevroimunološki mehanizmi

So tisti mehanizmi, preko katerih centralni živčni sistem systemsko in lokalno nadzoruje vnetje. Avtonomi živčni sistem je preko živčnih vlaken povezan z limfociti, makrofagi v limfnih žlezah, s kostnim mozgom, timusom, z vranico in tudi z limfnim tkivom v mukozi črevesja. Številni nevrotransmiterji v nevronih avtonomnega živčnega sistema ali nevronih črevesnega živčnega sistema (kateholamini, vazoaktivni intestinalni peptidi, angotenzin II, nevrotenzin, somatostatin) lahko delujejo na limfocite, makrofage, nevtrofilne levkocite in druge vnetne celice preko povezave med neuroni in imunskimi celicami. Limfociti in

druge vnetne celice imajo tudi receptorje za hormone in druge neuropeptide. Visoke koncentracije glukokortikoidov, ki jih izplavi skorja nadledvične žleze kot odziv na ACTH, imajo v glavnem imunosupresivno delovanje. Glukokortikoidi okrepijo stresni odgovor organizma na stresogeni dejavnik, vplivajo na rast, proliferacijo in diferenciacijo celic, zavirajo adhezijo celic in citotoksičnost, povečujejo apoptozo in delujejo protivnetno. Povečajo tudi sintezo protivnetnih beljakovin, znižajo tvorbo nekaj vnetnih citokinov in kemokinov, kot so IL-6 in IL-1. Glukokortikoidi pospešujejo apoptozo vnetnih celic T in eozinofilnih levkocitov, po drugi strani pa nizka raven teh hormonov imunski sistem spodbuja. Zdravljenje z nizkimi odmerki glukokortikoidov, na primer, poveča tvorbo IL-6 in tumor nekrotizirajočega faktorja (TNF- α) v makrofagih (7, 8).

1.4.5. Psihološki stres

Učinki psihološkega stresa na sistemski imunski sistem so zelo zapleteni in odvisni od jakosti in trajanja delovanja stresogenih dejavnikov. Psihološki stres lahko opredelimo kot akutni in kronični stres.

Akutni stres v laboratorijskih pogojih

Akutni psihološki stres je v realnem svetu zelo težko raziskovati, saj je stres subjektivna izkušnja, ki jo težko objektivno opredelimo, po drugi strani pa ni etično izpostavljanje oseb hujšemu akutnemu stresu v laboratorijskih pogojih. Obstajajo izdelani poskusni modeli izzivanja blažjega akutnega stresa v laboratorijskih pogojih, ki lahko povzročijo neuroendokrinološki in simpatično-adrenergični odziv, na primer, stresni test s snemanjem javnega govora pred kritično javnostjo. Posledica akutnega stresa je zvišanje adrenalina in noradrenalina ter neuroendokrinološka stimulacija z zvišanjem kortizola, kar sicer traja nekaj ur in povzroči okrepitev imunskega sistema. Kot drugi primer so lahko študentje pred izpitom. Ti imajo zvišane levkocite, redistribucijo limfocitov, povišane vrednosti IL-6, TNF- α , interferona γ , zvišanje odstotka citotoksičnih celic T in celic ubijalk oziroma povečano citolitično aktivnost. Z akutnim stresom je povezana tudi aktiviranost trombocitov, agregacija trombocitov, tvorba vnetnih mediatorjev trombocitov in tvorba trombina, ki je odvisna od trombocitov. Povečana aktiviranost trombocitov je povezana tudi s povečano nagnjenostjo k strjevanju krvi, z mikroinfarkti in mikrovaskularno ishemijo.

Kronični psihološki stres

Za kronični stres kot so žalovanje, depresija, ločitev, je značilno povečanje plazemskega kortizola skozi nekaj dni. Imunosupresivno delovanje kortizola se kaže kot znižanje števila limfocitov, celic ubijalk in makrofagov v krvi (7).

1.4.6. Vpliv stresa na možgane

Vnetje ali poškodba tkiva kjerkoli v telesu ni proces, omejen samo na mesto izbruha. Poškodba povzroči imunski odgovor, ki na samo mesto dogajanja pritegne številne imunske celice z različnimi funkcijami. Dogajanje na periferiji ne ostane dolgo prikrito osrednjemu nadzornemu organu, možganom, ki poveljujejo vsem dogajanjem v telesu. Možgani so o dogajanju obveščeni preko krvi oz. v njej raztopljenih citokinov ali senzornih živcev. Možgani se na ta signal odzovejo z »bolezenskimi simptomi«, kot so, utrujenost, izguba želje po gibanju, izguba apetita, pomankanje želje po družbi, seksu, športu;

Namen takega odziva je najverjetneje ohranjanje energije za borbo proti bolezni. Poškodba v telesu ali bolezen izzove akutno stresno situacijo in odziv v možganih preko osi HHSO. Kortizol s svojim protivnetnim delovanjem omili imunski odgovor. V optimalnih pogojih, ko delovanje imuskih celic ni več potrebno, se kaskada HHSO inaktivira. Dolgotrajna zavrta imunskega sistema pri osebah z kroničnim stresom, za katerega so značilne stalno povišane vrednosti kortizola v krvi (podnevi, ponoči, dnevi, meseci), povzroči večjo nagnjenost k prehladam, vnetjem, h karcinomu in upočasnjem celjenju ran. Učinke kortizola izkoriščamo tudi pri bolnikih po presaditvi organov z namenom, da prejemnik ne zavrže presajenega organa druge osebe (tujka) (7, 8).

1.5. Ocenjevanje stresa

Stres je individualna reakcija posameznika, ki je zaznal in se odzval na stres, kateremu je bil izpostavljen. Obstajajo objektivne laboratorijske meritve, ki potrjujejo telesne reakcije, na primer določanje adrenalina, noradrenalina, dopamina, neuropeptida v krvi ali kortizola v slini ali krvi. Raven kortizola niha čez dan, gre za cirkadialni ritem kortizola. Povišane

vrednosti kortizola čez dan oziroma stalno zvišan kortizol čez dan ali ponoči kažejo na to, da je oseba pod stresom. Drugi endokrinološki parametri so nizka vrednost testosterona pri moških in estrogena pri ženskah, oboje pa je povezano z znižano regenerativno aktivnosjo telesa in s povečanim tveganjem za srčno-žilne bolezni. Med druge zelo uporabne kazatelje stresa spadata srčni utrip in arterijski tlak. V nekaterih raziskavah pa so stopnjo kroničnega stresa, določali s holesterolom v krvi (zvišan) in časom strjevanja krvi (skrajšan). V forenzični medicini pa se za ocenjevanje stresa, daleč najbolj uporablja t.i. detektor laži. Ta meri stresno reakcijo, ki se nato kaže kot povišan srčni utrip, povišan arterijski tlak, z napetostjo mišic ali kot povečana vlažnost kože (7).

1.5.1. Stresna reakcija

Stres je predvsem zapletena povezanost med osrednjim živčevjem, endokrinim in imunskim sistemom. Možganska skorja aktivira simpatični živčni sistem in pripravi telo na takojšnje delovanje (t.i. faza alarma). Simpatično-adrenergični sistem igra tukaj ključno vlogo. Hormonski odziv na akutni stres je zelo dobro poznan in uravnava proizvodnjo in porabo energije v začetni, katabolični fazi stresa.

Nadledvična žleza izplavlja stresne hormone, najpomembnejša med njimi sta adrenalin in noradrenalin, ki omogočajo hitro razmišljanje, presojo, predvidevanje, odločanje in tudi intenzivno in trajajnje stresne reakcije. Simpatično-adrenergični sistem povzroči preko povišanega srčnega utripa in povečane krčljivosti srčne mišice povečanje minutnega volumna, povišan arterijski tlak, preusmeritev krvi iz visceralnih k življenjsko pomembnim organom (srce, možgani) in skeletnim mišicam. Kateholamini po drugi strani povečajo moč in hitrost skeletnih mišic in predvsem mobilizacijo energije. Pri stresni reakciji se izplavlja seveda tudi kortizol, ki prav tako sodeluje pri mobilizaciji energije (glukoza), deluje pa tudi protivnetno. Stresni hormoni delujejo tudi proti krvavitvam, saj povečajo nagnjenost k strjevanju krvi (protrombično delovanje) za primer poškodbe ali krvavitve in povzročijo tudi vazokonstrikcijo žil v koži. Mnoge živčne povezave pa sodelujejo v vedenjskem odzivu. Ta poveča budnost, pozornost, zavre apetit in prebavo, zavre spolni nagon, zmanjša občutljivost za bolečino in preusmeri vedenje (7, 8).

1.5.2. Hormonske spremembe ob stresu

Ob stresu se povišajo kortikosteroidi, CRH in KA, prav tako pa se poviša tudi β -endorfin in drugi opiodi. Naloga opiatov je olajšati bolečino med stresno reakcijo. Opiati so velika skupina peptidov izolirani iz možgan in hipofize in imajo antinociceptivno in analgetično delovanje. Obstajajo tri skupine:

- endorfini, β -endorfin, ki se sintetizirajo z aktivnostjo propio-melanokortinskega gena v hipofizi,
- met-enkefalin in leu-enkefalin sta pentapeptida in sta v glavnem v možganih in sredici nadledvične žleze,
- dinorfini v hipotalamusnih jedrih, ki izločajo CRH in AVP (9).

Poviša se tudi sekrecija AVP, ki deluje sinergistično s CRH. CRH inducira sproščanje TSH in dopamina iz hipotalamusa. V primeru splošnega adaptacijskega sindroma se zmanjša aktivnost ravnega, reproduktivnega, tireoidnega in imunskega sistema. Količina ravnega hormona (GH) se ob napadu stresa poviša, ravno tako količina prolaktina. Njuno povišanje ublaži imunosupresivni učinek stresa. V poznejšem obdobju oba upadeta, ravno tako pri ponavljajočem in kroničnem stresu (9).

Za akutni stres je značilno zvišanje hormonov, ki omogočijo sprostitev in uporabo visoko energetskega goriva (glukoze) in hkrati zavrejo hormone, ki vrednost glukoze znižujejo. Med tiste hormone, ki zvišajo raven glukoze spadata predvsem adrenalin in noradrenalin, pa tudi kortizol in rastni hormon. Med hormone, katerih izločanje ali učinkovitost se med akutno stresno situacijo zmanjšata, spada predvsem insulin. To je hormon, ki ga izloča trebušna slinavka in uravnava nivo glukoze v krvi. Aktivacija stresnega sistema zavre tudi ščitnično os in sproščanje spolnih hormonov (8).

V presnovi je za akutno fazo stresne situacije značilen katabolizem (razgradnja) z namenom tvorbe glukoze. Katabolizem se nanaša na razgradnjo glikogena, beljakovin in maščob. V tej fazi ni gradnje niti obnavljanja energetskih zalog, celic ali tkiv. Iz tega sledi spoznanje, da za zdravje ni dobro, če tako stanje traja predolgo, ali se pogosto ponavlja. Vpliv akutnega stresa na zvišanje vrednosti glukoze v krvi mora poznati vsak bolnik s

sladkorno boleznijo in tudi zdravniki, saj sladkorna bolezen lahko v stresnih situacijah iztiri in je potrebno dajati insulin v višjih odmerkih, da se uredi nivo glukoze v krvi (7).

Hormonsko – metabolno stresni odgovor pri novorojencih, ki imajo srčno operacijo

Medicinska šola Harvard in Otroška bolnišnica v Bostonu, sta naredili raziskavo z naslovom Vpliv stresa-srčne operacije na hormonski in metabolni odgovor novorojencev. V raziskavo so vključili 15 otrok, ki so imeli kongenitalno srčno okvaro. Izvedli so standardni protokol anestezije in analizirali krvno plazmo pred, med in 24 ur po operaciji. Določili so A, NA, KO, glikagon in β -endorfin. Po analizi rezultatov so ugotovili sledeče:

- A, NA, KO, glikagon in β -endorfin porastejo pri vseh pacientih,
- vpliv stresa je pri novorojencu bolj viden kot pri odraslem človeku,
- metabolni in hormonski odgovor sta ekstremna, kar povezujejo z visoko smrtnostjo,
- predpostavili so, da močnejši kot je stres, večja je možnost, da pride do komplikacij in da so te hujše,
- stres in postoperativni rezultat sta še bolj povezana pri novorojencih z metabolnimi motnjami,
- pri novorojenčkih se metabolna nestabilnost lahko razvije zaradi:
 - ✓ adaptacije na zunajmaternično okolje in drugo prehrano,
 - ✓ omejenih endogenih rezerv OH, B in M,
 - ✓ metabolnih sprememb, ki so posledica rasti,
 - ✓ omejenih funkcijskih sposobnosti še nezrelih organov (10).

Hormonski odgovor na kirurški stres pri otrocih

To raziskavo so opravili na pediatričnem oddelku bolnišnice v Bostonu. Želeli so preveriti hipotezo, za katero velja, da je pri otrocih od starosti odvisen odziv na operacijski stres. Da bi preverili to hipotezo so v analizo zajeli 98 otrok, starih od 3 do 20 let, ki so imeli različne operativne posege in so bili pod splošno anestezijo. Pred operacijo in po operaciji so odvzeli krvne vzorce, iz katerih so nato izmerili koncentracijo hormonov prolaktina in kortizola. Podatki pacientov so bili razvrščeni po starosti otrok in dolžini operacije. Vsi pacienti so imeli značilno zvišane vrednosti kortizola in prolaktina v krvi po operaciji (1 ura) v primerjavi z vrednostmi pred operacijo. Vendar pa ni bilo nobenih bistvenih razlik, med vrednostmi kortizola in prolaktina, kot odziv na operacijo, glede na starost pacienta, načinu anestezije in na dolžino operacije. Ugotovili so tudi, da imajo ženske po operaciji rahlo višje vrednosti prolaktina v serumu, kot moški. Iz te analize so lahko podali 2 zaključka:

- Otroci imajo med potekom operacije in pod anestezijo značilno povišane vrednosti serumskega prolaktina in kortizola, vendar pa na te zvišane vrednosti nimajo bistvenega vpliva, starost pacienta, način anestezije in dolžina operacije.
- Ženske imajo večji prolaktinski odgovor na operacijo in anestezijo kot moški (11).

Vrednosti kortizola v slini pri otrocih pred in po aplikaciji injekcije

To analizo pa so opravili prav tako v Ameriki, natančneje na Univerzi v Iowi. Zanimalo jih je kakšne so vrednosti kortizola v slini pred injiciranjem in kakšne so po tem. Poleg tega so želeli tudi razumeti psihološki odziv otroka na stresno in bolečo situacijo. Vzorce slin so odvzeli 384 otrokom v starosti 4-10 let. Vzorce so odvzeli pred prihodom na kliniko in 20 minut po prejetju injekcije. Rezultati so pokazali, da je cirkadiani ritem kortizola pri otrocih zelo podoben tistemu pri odraslih, vendar pa so se vrednosti kortizola malo pred intavenskim postopkom zmerno povišale. Pri teh ugotovitvah so podali, da sta bila za to ključna čas in sama lokacija injiciranja. Kot zaključek analize so ugotovili, da je meritev kortizola v slini lahko zelo dober pokazatelj stresa, s katerim lahko ocenijo učinkovitost posega (11).

1.6. VPLIV ANESTEZIJE NA STRES

1.6.1. Definicija anestezije

Kirurška anestezija je stanje, v katerem bolnik ne reagira na bolečinske dražljaje in se lahko doseže na dva načina:

- z izvajanjem splošne anestezije, pri kateri je pacient v globoki nezavesti in za katero so značilne analgezija, arefleksija in atonija skeletnih mišic,
- z izvajanjem lokalne anestezije, v kateri se doseže neobčutljivost na bolečine samo v predelu telesa, kjer pride do kirurškega posega, pacient pa je ob tem pri zavesti (12).

1.6.2. Splošna anestezija

Poznamo dve vrsti splošne anestezije:

- inhalacijska anestezija, ki jo dosežemo z vdihavanjem anestetičnih plinov in par. Za splošno anestezijo se največkrat uporabijo dušikov oksid, halotan, enfluran, izofluran in metoksifluran. Redkeje se uporabljajo etri, ciklopropan, kloroform in trikloroetilen.
- anestezija, kjer anestetik vbrizgamo intravensko. Za tovrstno anestezijo se uporabljajo tiopenton-natrij, ketamin, pentobarbiton-natrij in etomidat. Ta anestezija se uporablja kot uvodna (bazalna) anestezija, ki se nato pogloblja s halotanom ter dušikovim oksidom. Lahko pa se uporablja tudi kot kratkotrajna splošna anestezija, pri kateri se izvedejo manjši kirurški posegi in diagnostični postopki (12).

1.6.3. Faze splošne anestezije

Faze splošne anestezije:

- PRVI stadij (analgezija) – Pacient je pri zavesti in ima ohranjen občutek dotika.
- DRUGI stadij (eksitacija, delirijum) – stadij se začne z izgubo zavesti in se konča, ko pride do ugasnitve refleksa konjunktive. Znaki tega stadija so: velika vzdražnost, nepravilno dihanje, povečan tonus skeletnih mišic, bruhanje. Ob uporabi premedikacije lahko ta stadij skrajšamo ali pa se mu popolnoma izognemo.
- TRETJI stadij (kirurška anestezija) – v tej fazi so doseženi pogoji za izvedbo kirurškega posega. Značilnosti tega stadija so: dihanje postane enakomerno in

- ČETRTI stadij (medularna paraliza) – nastane samo v primeru predoziranja anestetika, zato je to nezaželeni stadij. Njegov začetek se kaže s paralizo dihanja (12).

1.6.4. Lokalna anestezija

Lokalni anestetiki so zdravila, ki povzročajo neobčutljivost določenega dela telesa pri popolnoma obdržani zavesti. Delujejo tako, da preprečijo nastanek in prevajanje živčnih impulzov in to reverzibilno. Lokalni anestetiki blokirajo senzorična, motorična in avtonomna živčna vlakna.

Lokalni anestetiki najprej blokirajo majhna nemielinška vlakna, šele nato mielinška vlakna. Posledica tega je, da se učinki lokalnih anestetikov kažejo po naslednjem redu izgube funkcij:

- bolečina,
- toplota,
- dotik, propriocepcija,
- tonus skeletnih mišic (12).

Toliko na splošno o anesteziji. Anestezija ni pomembna samo za to, ker omogoča neboleč kirurški poseg, temveč vpliva tudi na stres, ki ga pacienti doživijo ob različnih vrstah operacij.

Opravljenih je bilo že več raziskav, kakšen vpliv predstavlja anestetik pri stresni situaciji, kot je operacija. Naj navedem nekaj ugotovitev teh raziskav:

- neodvisno od izbire anestetika obstaja povezava: višji kot je nivo KA, večja je verjetnost postoperativnih komplikacij,
- pacienti ki so pod globoko anestezijo imajo manjše število seps, metabolne acidoze, razširjene intravaskularne koagulacije in manjše število smrtnih primerov po operaciji,

- aplikacija globoke opioidne anestezije bolnim novorojenim pacientom, ki so bili operirani na srcu, lahko zmanjša odgovor na stres in morda izboljša klinične rezultate,
- globlji nivoji anestezije povzročajo od doze odvisno inhibicijo odgovora na stres (10).

1.7. SPLOŠNO O KORTIZOLU

Hormon lahko potuje po krvi prost ali vezan na beljakovinski nosilec: albumine, globuline. Pri tem pa je beljakovinski nosilec lahko večji kot je sam hormon. Sprememba koncentracije beljakovin vpliva tudi na spremembo koncentracije hormonov v krvi. Vez med hormonom in drugo beljakovino je labilna.

Kortizol se v periferni cirkulaciji nahaja v treh oblikah. Večina kortizola (90 %) je vezanega na specifični transportni protein, ki se imenuje kortizol vezujoči globulin (CBG). Majhen delež kortizola (7 %) je vezanega na albumin, medtem ko je ostali delež (1-3 %) prisoten v krvi v prosti oblik. CBG veže kortizol z visoko afiniteto in nizko kapaciteto, medtem ko albumin nasprotno, z nizko afiniteto in visoko kapaciteto. Močan vpliv na koncentracijo CBG v krvi imajo tudi estrogeni (oralna kontracepcija in nosečnost) in antiepileptiki. V slini se kortizol nahaja večinoma v prosti obliki (13).

Ta hormon je za življenje bistven hormon in sodi med najpomembnejše igralce v stresni situaciji. Izločanje kortizola je pod kontrolo višjih centrov. Stresna reakcija prične v frontalnem režnju možganov in stimulira hipotalamus, le-ta pa preko kortikotropnega hormona (CRH) stimulira izločanje hormona ACTH iz adenohipofize. Adenohipofiza sprosti hormon ACTH, ki v skorji nadledvične žleze povzroči sprostitve kortizola. Koncentracija kortizola preko povratnega mehanizma vpliva na kortikotropni hormon v adenohipofizi. Kortizol je steroidni hormon, ki ga izloča skorja nadledvične žleze. Med njegove najpomembnejše funkcije v telesu uvrščamo zviševanje nivoja glukoze v krvi, saj v jetrih spodbuja tvorbo glukoze iz beljakovin (glukoneogeneza), spodbuja prerazporeditev maščevja, razgradnjo beljakovin, ima tudi šibke mineralokortikoidne lastnosti (zadrževanje

soli in vode), uravnavanje krvnega tlaka in srčno-žilne funkcije, kot tudi uravnavanje potrebe organizma po proteinih, ogljikovih hidratih in maščobah.

Izločanje kortizola narašča, kot odgovor na vsak stres za telo, tako fizični (bolezen, poškodba, operacija), kot psihološki. Ko se ta hormon izloči, povzroči razgradnjo mišičnih beljakovin, kar vodi do sproščanja aminokislin v krvni obtok. Te aminokisliline se nato v jetrih uporabijo za sintezo glukoze kot vir energije v procesu glukoneogeneze, ki dvigne nivo krvnega sladkorja, da zagotovi več energije za možgane. Hormon prav tako vodi do sproščanja maščobnih kislin, kot vir energije maščobnih celic, ki služijo za delovanje mišic. Vsi ti energetsko usmerjeni procesi pripravijo telo posameznika, da se »spopade« z stresorji in zagotovijo možganom dovolj energije (7).

Učinke odmerkov kortizola ali njegovih derivatov danes uporabljamo za zdravljenje mnogih bolezni s čezmerno aktivnim imunskim sistemom, kot so astma, vnetne bolezni prebavil in proti zavrnitveni reakciji po transplantaciji organov (13).

1.7.1. Merjenje nivoja kortizola v slini

Salivarni test za merjenje kortizola se ponavadi izvaja v dveh primerih, in sicer, če obstaja sum Cushingovega sindroma ali Addisonove bolezni. Namreč obe bolezni sta hudi motnji v delovanju nadledvične žleze. Pri diagnosticiranju teh bolezni si ponavadi pomagamo s testiranjem urinskega vzorca kot tudi z vzorcem sline, kjer spremljamo nivo kortizola (14).

V primeru Cushingove bolezni govorimo o povečanem izločanju glukokortikoidov.

Simptomi Cushingovega sindroma, ki ponazarjajo, da je potrebno spremljati nivo kortizola v slini:

- nenadno povečanje telesne mase (centralna debelost),
- izgubljanje mišične mase,
- mišična oslabelost,
- okrogel obraz.

Simptomi Addisonove bolezni (zmanjša se sinteza vseh adrenokortikoidov), ki ponazarjajo, da je potrebno spremljati nivo kortizola v slini:

- splošna oslabelost,

- močna utrujenost,
- povečana pigmentacija telesa,
- zmanjšanje telesne teže (14).

Za ljudi z normalnim ritmom izločanja kortizola, je nivo kortizola v slini najvišji zjutraj in nizek ponoči. Vendar pa za ljudi, ki delajo ponoči in za ljudi obbolele za Cushingovim sindromom to »pravilo« ne velja. Povečan nivo kortizola zjutraj, ki se preko dneva ne znižuje, tudi nakazuje na prekomerno produkcijo kortizola. Če se to preseženo izločanje kortizola zaustavi ozirima ustali pod vplivom terapije, kaže to na povečano proizvodnjo adeno-kortiko-tropnega hormona. Če pa se stanje kljub terapiji ne umiri, gre lahko za:

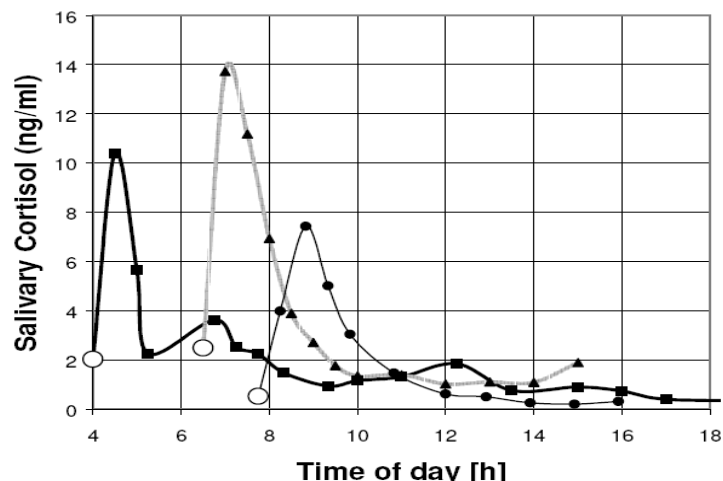
- težave z nadledvično žlezo
- tumor, nekje v telesu
- neustrezna zdravila

Če pa je zaradi okvare nadledvične žleze nivo kortizola znižan, obstaja možnost da je preiskovanec, oziroma pacient, zbolel za Addisonovo boleznijo (14).

1.7.2. Kortizol-ritmi izločanja

Normalna koncentracija kortizola v slini preko dneva zelo niha, saj ni časovno odvisna, prav tako pa ni odvisna od dnevne svetlobe, pač pa je pomemben čas zbujanja vsakega posameznika posebej.

Slika 1: Na naslednji sliki so prikazani profili treh posameznikov, z tipičnim vrhom kortizola v zgodnjem jutru. Najvišje vrednosti kortizola so izmerjene od 30 do 90 minut po povprečnem času zbujanja (15).



Slika 1: Dnevni ritem kortizola v slini, z različnimi časi zbujanja

1.7.3. Biološki vzorci za določanje kortizola

Analize, pri katerih se uporabljajo vzorci sline, ki so dobljeni z neinvazivnimi kvalitativnimi in kvantitativnimi tehnikami, so pri sodobni analitiki postale zelo pomembne. Zaradi lahke dostopnosti zbiranja ima slina številne prednosti v primerjavi s klasičnimi biološkimi vzorci, kot so kri, plazma in urin (16).

Slina se izloča preko žlez slinavk (1 L/dan), ki se nahajajo pod jezikom (sublingvalna) nato pa sta še obušesna žleza (parotidna) in podčeljustna (submandibularna). Vsaka od teh je parna žleza, ki izloča slino skozi žlezno izvodilo v usta. Žleze slinavke so dobro prekrvavljene, krvni tok se ob stimulaciji proizvodnje sline še poveča. Odrasel človek proizvede dnevno od 500-1500 mL sline. Funkcije sline so: začetek prebave lipidov in škroba z encimi v slini, razredčevanje in pufranje zaužite hrane ter lubrikacija zaužite hrane z mukusom za lažji prehod skozi požiralnik (3).

Slina je sestavljena iz kompleksne mešanice mucinov, encimov, protiteles, elektrolitov in hormonov in vode. Organske snovi v plazmi, kot so hormoni, protitelesa, encimi, DNA in virusi, slabo prehajajo v slino. Prav vsaka sestavina sline, igra pomembno vlogo v procesu prebave in zaščiti ustne sluznice. V primerjavi s plazmo je slina hipotonična, ima pa višjo koncentracijo K^+ in bikarbonata ter nižjo koncentracijo Na^+ in Cl^- (3).

pH sline je odvisen od koncentracije bikarbonata in se giblje med 6.2 - 7.4.

Ob naraščanju koncentracije bikarbonata se dviga tudi pH sline. Ker je v krvi dostopnih zelo malo prostih oziroma ne-veznih steroidov, predstavlja slina najboljši vzorec za določanje hormonov, saj za razliko od krvi vsebuje veliko prostih steroidov. Že mnoga leta se slina uporablja kot biološka tekočina za določanje različnih biomarkerjev, kot so elektroliti, hormoni, zdravila in protitelesa. Jemanje vzorcev predstavlja ne- invazivno, ne bolečo in zelo priročno metodo, še posebno za paciente. Vzorce sline se lahko odvzame kadarkoli, podnevi ali ponoči, poleg tega se lahko odvzame vzorce sline v pogojih, ko je neprimerno oz. težko odvzeti krvni vzorec (15). Trenutno se pri testiranju sline lahko določi nivo hormonov, estradiola, estriola, estrona, progesterona, testosterona, dihidrotestosterona (DHT), dehidroepiandrosterona (DHEA), melatonina in kortizola. Zelo je priporočljivo, da se naredi salivarni test, kot začetni test pred vsako hormonsko terapijo, nato pa naj bi se te testi ponovili po 2-3 mesecih. Tako se zelo lahko oceni če je nadomestna hormonska terapija delovala.

Preglednica 1: Parametri sline v korelaciji s plazmo

ANALITI	MEŠANA SLINA	PLAZMA	ENOTA
Voda	97 - 99.5	90 - 93	%
pH	6.4 - 7.4	7.4	
Albumin	246 - 344	34.000 - 48.000	mg/L
Proteini	1.1 - 1.8	66 - 87	g/L
Alfa-amilaza	11.900 - 305.000	<220	U/L
Lizocim	6 - 12	3 - 9	mg/L
Kalcij	0.88 - 2.05	2.20 - 2.55	mmol/L
Klorid	5 - 40	96 - 108	mmol/L
Magnezij	0.08 - 0.56	0.70 - 1.05	mmol/L
Fosfat	1.4 - 13.2	0.87 - 1.45	mmol/L
Kalij	6.4 - 37	3.3 - 5.1	mmol/L
Natrij	2 - 21	133 - 145	mmol/L
IgA	42 - 174	850 - 4.000	mg/L
CBG-moški	38 +/- 18	39.700 +/- 6.300	mikrogram/L
CBG-ženska	72 +/- 71	42.200 +/- 5.600	mikrogram/L

1.8. TRANSPORT KORTIZOLA

Slina je odličen medij za merjenje koncentracije steroidov, ker predstavlja ultra filtrat krvi in ker steroidi ki niso vezani na prenašalne proteine prosto prehajajo iz krvi v slino. Od vseh steroidov raztopljenih v krvi, jih je le od 1 do 10 odstotkov v prosti oz. nevezni obliki in le v tej obliki lahko steroidi prehajajo (difundirajo) v ciljna tkiva v telesu. Večina steroidnih hormonov (90 - 99 odstotkov) je vezanih na prenašalne proteine (kortizol vezujoči globulin - CBG, spolni hormon, vezni globulin, albumin) in ti niso zmožni prehajati v tkiva (15).

Sicer obstaja več mehanizmov prehajanja krvnih komponent skozi membrano v žleze slinavke, in sicer:

1. Prvi mehanizem je prehajanje skozi medceličnino acilarnih celic, vendar prehajajo lahko le celice z majhno molekulsko maso.
2. Drugi mehanizem prehajanja je ultrafiltracija skozi pore celičnih membran, tudi tukaj lahko prehajajo le molekule z nizko molekulsko maso.
3. Tretji mehanizem je lahko transport skozi celično membrano:
 - pasivna difuzija lipofilnih molekul (npr., steroidi),
 - aktivni transport skozi kanale proteinov (npr., peptidi),
 - pinocitoza: Prehajanje v celico kapljično.

Proces pasivne difuzije prostih steroidnih hormonov iz krvi v slino je omogočen zaradi nizke molekulske mase in nepolarnosti molekul. Vezni steroidi pa imajo preveliko molekulsko maso, da bi lahko prosto prehajali skozi celice (16).

1.8.1 PREDNOSTI IN SLABOSTI VZORČENJA SLINE

Obstajajo številne prednosti vzorčenja sline v primerjavi z krvnim serumom ali plazmo. Vendar, obstajajo tudi slabosti, in sicer:

Prednosti

-Vzorčenje sline je zelo preprosto, ker se lahko vzorči kadarkoli in to lahko opravi kdorkoli. Vzorčenje krvi pa ima časovne omejitve in tudi nadzorovano mora biti preko zdravnika.

-Slina vsebuje izredno stabilne steroidne hormone, kar je zelo priročno za vzorčenje, poleg tega se vzorci lahko prenašajo pri sobnih temperaturah in ne predstavljajo večjih finančnih izdatkov. Krvni serum po drugi strani, zahteva kvalificirano osebje, posebne postopke in opremo (centrifuge,...), prav tako pa posebne pogoje za prenos vzorcev (led, oziroma hladilna torba) in hitro dostavo.

Slabosti

-Zbiranje vzorcev sline je tehnično bolj zahtevno kot to velja za kri, kar omejuje že samo število laboratorijev, ki so sposobni izvajati te teste. Nivo steroidnih hormonov v serumu je v povprečju od deset do sto-krat višji kot to velja za steroidne hormone v slini. Zato je potrebno da so laboratoriji, ki opravljajo salivarične teste dovolj tehnično razviti da, ali razvijejo svoje lastne teste, ali pa te vrednosti komercialni testov ustrezno prilagodijo, oziroma pretvorijo.

-Naslednja izmed slabosti vzorčenja sline pa je ta, da lahko komponente sline reagirajo z testerji. Hrana, kava, žvečilni gumiji, zdravila, ki so zaužita tik pred jemanjem vzorca, lahko motijo določanje oziroma spremenijo nivo hormonov (17).

1.9. METODE ZA DOLOČANJE HORMONOV V SLINI

Rezultati analiz v slini so odvisni od uporabe analitičnih postopkov, vzorcev in njihovega shranjevanja. V primeru kortizola je ugotovljeno, da se ga izgubi več kot 90 % pri shranjevanju 16 tednov na sobni temperaturi. Kortizol je stabilen v prisotnosti citronske kisline. Najpogosteje se vzorci zamrznejo na -20 °C. Centrifugiranje se izvaja pred ali po zamrzovanju vzorca. Metode za določevanje hormonov v slini delimo na imunološke in kromatografske (16).

1.9.1. IMUNOLOŠKE METODE

Imunološke metode se uporabljajo zaradi preprostosti, uporabe dolgih množičnih analiz in občutljivosti.

Slabost te metode je slaba selektivnost. Imunološke metode delimo na:

1. RIA (radioimmunoassay): radioimunološka metoda je najpogostejša metoda za določevanje hormonov v slini;
2. EMIT (enzyme multiplied immunoassay technique): alternativna metoda, ki je osnovana na kompetitivni vezavi na proteine, kjer se uporablja encim kot marker in protitelo kot specifični protein. Encimska aktivnost je v odnosu s količino analizirane substance v vzorcu in se meri spektrofotometrično;
4. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay): osnovana na principu kompetitivne vezave.
5. FPIA (fluorescence polarization immunoassay): fluorescentna-polarizacijska imunološka metoda.
6. LIA (luminescence immunoassay): kemiluminiscenčna metoda. Kemiluminiscenca je specifičen izraz, ki opisuje energijo, sproščeno v obliki svetlobe med samo reakcijo. Ta analiza je približno desetkrat bolj občutljiva kot je encimska-immuno analiza. Za veliko analiz z slino se uporablja žarkovno luminescenca mikrotiterskega formata. Ta tehnologija namreč omogoča natančne meritve pod območjem pikograma. Inštrumenti za merjenje

žarkovne luminiscence so tudi relativno poceni, v primerjavi z blisk (flash) luminiscenco, ker niso potrebni nobeni injektorji (16).

1.9.2. KROMATOGRAFSKE METODE

Kromatografske metode so skupen izraz za vrsto fizikalnih separacijskih tehnik. Delimo jih:

1. TLC (thin layer chromatography): tankoplastna kromatografija je preprosta metoda za istočasno določitev različnih vzorcev;
2. HPTLC (high performance TLC): tankoplastna kromatografija visoke ločljivost;
3. GC (gas chromatography): plinska kromatografija;
4. HPLC (high performance liquid chromatography): tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (16).

1.9.3. Glavne lastnosti imunoloških analiz:

Osnovna reakcija vsem imunokemijskim reakcijam kjer je protitelo (Ab) v primerjavi z antigenom (Ag) v prebitku = $\text{Ag} + \text{Ab} \rightarrow [\text{Ag} - \text{Ab}] \rightarrow \text{detekcija} \rightarrow \text{Ag} + \text{Ab}^* \rightarrow [\text{Ag} - \text{Ab}^*]$

Za to reakcijo pa velja sledeče:

1. Nevezana protitelesa odstranimo, označevalec (*) je lahko fluorofor, encim, ^3H , luminol;
2. Pri tej reakciji imamo prebitne Ag in omejeno št vezavnih mest;
3. Uporabimo označene in neoznačene Ag (kortizolu dodamo označeno Ag in oba se vežeta na isto Ab in oba imata enako afiniteto). Pomembna je koncentracija označen / neoznačen Ag, ki določi vezavo;
4. Po koncu reakcije ni več prostega Ag, zato ostane le $\text{Ag} - \text{Ab}^*$ (14).

Za oceno splošne kakovosti in uporabnosti laboratorijske imuno analize, ima naslednji kriterij pomembno vlogo:

Območje linearnosti: koncentracije analitov v fizioloških, patoloških in s časoma terapevtskih pogojih naj bi bile znotraj lineranega območja standardne krivulje analize.

Navzkrižna reaktivnost protiteles do hormonov podobnih analitu. V nekaterih analizah z steroidi v slini je zelo nizka navzkrižna reaktivnost pomembna, da lahko ločimo ciljni analit od drugih hormonov, ki so pogosto v slini v visokih koncentracijah.

Meritve v serumu: Večino analiz opravljenih z slino, lahko prav tako opravimo tudi z serumom, pri tem je treba vzorce razredčiti v razmerju od 1:20 do 1:50 s pufrom (15).

Prednosti imunoanaliz:

- Uporabne so za vzorce sline, kot tudi seruma,
- So visoko občutljive,
- Utrezna natančnost pri nizkih koncentracijah,
- Imajo podaljšano območje linearnosti,
- Nizka navzkrižna reaktivnost z ustreznimi metaboliti,
- Potrebujemo majhno količino vzorca (20-50 μ l),
- Enostaven postopek izvedbe,
- Dva kompleta kontrolnih vzorcev,
- Dolgo trajajoč in stabilen signal,

Analiza je primerna tudi za avtomatizacijo (15).

1.9.4. PREDANALITIČNI POSTOPKI

Pripravek za vzorčenje sline

Izrednega pomena je, da uporabljamo pripravek, ki med postopkom ne reagira z analiti v slini. V primerjavi z serumom ali plazmo imamo v slini zelo nizko raven analitov, zato so interakcije med pripravkom in analiti bolj pogoste. Preiskovani analiti v slini so majhne, nepolarne molekule in take molekule kažejo nagnjenost, da se pritrdijo na plastični material. Merilna naprava ne sme biti iz stekla, ker je krhka in se lahko razbije, pač pa je najbolje, da je narejena iz plastike, točneje polipropilena, čeprav so njegove absorpcijske lastnosti odvisne od čistosti materiala (15).

Validacija testnih analizatorjev

Za kar najboljše kvantitativne lastnosti pripravkov, je priporočljivo, da se izvede določene adsorpcijske teste. Za ta namen se v celotni odvzeti slini lahko uporabi označen progesteron v fizioloških koncentracijah. Označen progesteron je shranjen v steklenem testnem pripravku, kot tudi v preiskovanem plastičnem pripravku. Po inkubaciji preko noči na laboratorijskem stresalniku, se izmerijo alikvoti iz obeh naprav z pomočjo beta števca. Adsorbcijo se lahko potem oceni kot razliko pridobljenih vrednosti med referenčno (stekleno) in našim plastičnim testnim pripravkom (15).

Vpliv kontaminacije sline s krvjo

Izrednega pomena je, da se preprečimo kakršnokoli kontaminacijo sline s krvjo, ker je lahko v krvi vrednost steroidnih hormonov kar do 100 krat večja kot v slini. Vsak pacient mora vedeti, da je potrebno zavreči prav vsak vzorec sline, ki ima primešano kri. Če se to zgodi, je potrebno testno napravo dvakrat očistiti z navadno vodo, počakati deset minut in nato še enkrat vzeti vzorec. V laboratoriju se nato ustrezne vzorce globoko zamrzne za vsaj 3 ure ali kar preko noči. Po tem času se vzorce odmzne, potem pa se jih da v centrifugirko, da se dobro premešajo in da se dobi supernatant brez primesi. Če so primesi še vedno prisotne, se ves postopek ponavlja toliko časa, dokler supernatant ni popolnoma čist. Nato je potrebno supernatant vizualno pregledati pred belim ozadjem, in če je slučajno še vedno vidna rahla rdeča barva, je potrebno take vzorce zavreči (15).

1.9.5. ODVZEM SLINE

- Vzorce sline lahko zberemo s pomočjo uporabe specifičnega pripravka Salivette® brez dodatkov ali z direktnim pluvanjem v stekleno posodo.
- Vzorca sline ne smemo odvzeti, če ni minilo več kot 15 minut odkar si je preiskovanec čistil zobe oz. uporabljal zobno nitko.
- Prav tako ne smemo odvzeti vzorca v času 30 minut po jedi oz. žvečenja žvečilnega gumija.
- Pred odvzemom sčistimo ustno votlino z mineralno vodo, v primeru da ne vemo, ali je preiskovanec prej jedel ali pil.
- Če vsebuje vzorec sledi krvi, tak vzorec takoj zavržemo in odvezamemo slino tam kjer ni krvavitve v ustni votlini.
- Priporočljivo je odvzeti 5 vzorcev sline v razmaku 2-3 ur pred jedjo.
- Volumen posameznega odvzetega vzorca sline naj bo vsaj 0,5 mL.
- Vzorce sline hranimo: 7 dni pri sobni temperaturi oz. 4 tedne pri temperaturi 2-8 °C, za daljše obdobje pa vzorce zamrzemo pri temperaturi manjši od -20 °C (15).

2.NAMEN DELA

Namen tega raziskovalnega dela je ugotoviti, kakšna je diagnostična vrednost določitve kortizola v slini v stresni situaciji, kot je čakanje na manjši operativni poseg pri otrocih. Sama operacija je lahko namreč velik stresni dejavnik, ki nam jasno pokaže stopnjo stresa pri otrocih. V ta namen bomo odvzeli slino pred in po operativnem posegu.

Meritve bomo opravljali na skupini otrok (22), starih 5-7 let, ki so bili naročeni na manjši operativni poseg na Kliniki za otroško kirurgijo v UKC Ljubljana.

Želimo predstaviti tudi imunološko metodo ELISA s katero bomo določali hormon kortizol v slini.

Namen tega dela pa je tudi opozoriti na slino kot biološki vzorec za določitev steroidnih hormonov, predstaviti predvsem njene prednosti pred ostalimi biološkimi vzorci, kot sta serum in urin.

3.EKSPERIMENTALNO DELO

Vpreiskavi je sodelovalo 22 otrok, starih od 5 do 7 let, moškega in ženskega spola, ki so bili sprejeti na manjši operativni poseg na Kliniki za otroško kirurgijo v UKC Ljubljana. Nas pa zanima kakšna stopnja stresa je prisotna, oziroma če je stres sploh prisoten. Zato smo odvzeli vzorce sline pred in po operativnem posegu in določili koncentracije kortizola.

Pacienti so pred odvzemom sline usta očistili z vodo, nato pa izpljunili vzorec sline. Kot že omenjeno se moramo izogibati vzorcem ki imajo primešano kri. Izločanje sline lahko stimuliramo z žvečenjem parafilma ®. Priporočljivo je tudi, da vzorce zamrznemo za nekaj časa. Po odtaljevanju in pred uporabo jih centrifugiramo, da odstranimo trdne delce.

Vzorce sline uporabimo v testih po shranjevanju manj kot 5 dni pri sobni temperaturi ali manj kot 10 dni pri temperaturi 2-8°C. Za dalj časa hranimo vzorce sline pri temperaturi -20°C. Izogibamo se ponavljajočemu zamrzovanju in odtaljevanju vzorca.

Pred uporabo reagentov jih damo iz hladilnika, da dosežejo sobno temperaturo. Nato vzorce centrifugiramo za 5-10 minut. Tako bo namreč čist brezbarven supernatant lažje pipetirati. Posebna predhodna obdelava sline pa ni potrebna. V primeru, da pričakujemo višje koncentracije kortizola, kot je koncentracija najvišjega standarda, vzorec pred testiranjem redčimo.

3.1 METODE DELA

Določali smo kortizol v slini z ELISA metodo. Ta je osnovana na principu kompetitivne vezave. Mikrotiterska plošča je prevlečena s poliklonalnimi zajčimi protitelesi, ki so usmerjeni proti antigenskemu delu molekule kortizola. Endogeni kortizol, ki izhaja iz vzorca pacienta, tekmuje s kortizolom, označenim s konjugatom hrenove peroksidaze, za vezavo z zajčimi protitelesi. Po končani inkubaciji se nevezani konjugati sperejo z mikrotiterske plošče. Količina vezanega konjugata peroksidaze je obratno sorazmerna

koncentraciji kortizola v vzorcu. Po dodatku raztopine substrata je intenziteta barve, ki se ob tem razvije, obratno sorazmerna koncentraciji kortizola v pacientovem vzorcu.

3.2. POSTOPEK ANALIZE

Vsi reagenti in vzorci morajo biti pred analizo ogreti na sobno temperaturo. Prav tako morajo biti vsi reagenti zmešani brez penjenja. Ko začnemo z analizo morajo biti vsi koraki analize opravljeni brez premora. Za vsak standard, kontrolo in vzorec se mora uporabiti novo plastično pipeto z namenom, da se izognemo kontaminaciji. Kot glavno pravilo je potrebno tudi upoštevati, da je encimska reakcija linearno sorazmerna z časom in temperaturo.

3.3. MATERIALI, OPREMA, REAGENTI

Potrebni reagenti za ELISA metodo:

- Mikrotiterske ploščice s 96 vdolbinicami, dimenzije 12x8. Vdolbinice so prevlečene z anti-kortizolnimi protitelesi (poliklonalnimi).
- Standardi od 0 do 6, standardi so v 7 stekleničkah, vsak ima volumen 1 mL in so primerni za uporabo brez redčenja.
- Kontrolni vzorec, 2 steklenički, ki imata volumen po 1 mL in sta primerni za uporabo.
- Konjugat encima (konjugat hrenove peroksidaze), 1 steklenička z volumnom 26 mL
- Raztopina substrata (Tetrametilbenzidin), 1 steklenička z volumnom 25 mL.
- Raztopina ki ustavi reakcijo (STOP), 1 steklenička z volumnom 14 mL, vsebuje kislino, zato se je potrebno izogniti stiku z kožo, ker lahko povzroči draženje kože in razjede.
- Pufer za spiranje, koncentrat, 1 steklenička z volumnom 30 mL. Potrebno je redčiti z deionizirano vodo 1:40. Razredčeni pufer za spiranje je stabilen pri sobni temperaturi 2 tedna.

Potrebni materiali za ELISA metodo:

- Mikrotiterska plošča, s katere lahko določimo absorbanco (450 nm),
- Natančno umerjene mikropipete (100 μ l, 200 μ l),
- Absorbentni papir,
- Destilirana oz. deionizirana voda,
- Števec,
- Semilogaritemska skala za risanje grafa;

3.4. POTEK DELA

-Zaščitimo željeno število prevlečenih trakov v nosilcu,

-Odmerimo po 100 μ l standarda, kontrole in vzorca v primerne vdolbinice na plošči,

-Odmerimo po 200 μ l encimskega konjugata v vsako vdolbinico. Nato narahlo stresamo ploščo približno 10 sekund, da se vse dobro premeša,

-Inkubiramo pri sobni temperaturi 60 minut. Priporoča se inkubacija na stresalniku pri 300 rpm,

-Hitro izpraznemo vsebino vdolbinic in jih speremo petkrat s spiralno raztopino. Mikrotitersko ploščo stresamo na adsorbentni papir da odstranimo vse ostanke iz vdolbinic. Občutljivost in natančnost te analize sta odvisni od spiranja plošče,

-Nato dodamo 200 μ l raztopine substrata v vsako vdolbinico,

-Zopet inkubiramo za 30 minut pri sobni temperaturi,

-Ustavimo encimsko reakcijo, s tem da dodamo 100 μ l Stop raztopine v vsako vdolbinico,

-Izmerimo absorbanco pri 450 nm;

3.5. RAČUNANJE REZULTATOV

1. Računanje povprečja absorbance je pomembno pri vsakem setu standardov, kontrole ali vzorcev.
2. Potrebno je izdelati standardno krivuljo z vrisavanjem absorbance, ki jo dobimo iz razmerja standard : koncentracija (standarda), z vrednostjo absorbance na Y osi in koncentracijo na X osi.
3. Koncentracijo vzorcev se lahko bere direktno iz krivulje. Vzorce, ki imajo koncentracijo višjo kot koncentracija največjega standarda, je potrebno razredčiti. In nato je pri računanju koncentracije potrebno upoštevati faktor redčenja.

3.6 PRIČAKOVANE NORMALNE VREDNOSTI

Za določitev normalnih vrednosti kortizola z ELISA metodo pri moških in ženskah, ki naj bi bili sicer zdravi, vzorec pa je odvzet in analiziran zgodaj zjutraj, veljajo naslednje mejne vrednosti: 1.2-14.7 $\mu\text{g/L}$

Vendar pa samo na podlagi teh vrednosti še ni razloga za samo terapijo. Poleg tega rezultata moramo upoštevati tudi druge klinične znake in diagnostične teste.

Karakteristike testa

1. Analitična občutljivost

Občutljivost analize je 0,012 $\mu\text{g/L}$

2.Specifičnost

Metoda kaže naslednjo navzkrižno reaktivnost:

Preglednica 2: Navzkrižna reaktivnost

Kortizol	100%
17 α -Hidroksiprogesteron	0.69%
Progesteron	0.04%
Kortikosteron	1.25%
Aldosteron	<0.001%
Testosteron	<0.001%
Estradiol-17 α	<0.001%
Estriol	<0.001%

3.Natančnost

Preglednica 3: Ponovljivost v seriji

VZOREC	n	SREDNJA VREDNOST(μ g/L)	STANDARDNA DEVIACIJA (μ g/L)	KOEFICIENT VARIACIJE (%)
1	20	2.56	0.07	2.62
2	20	4.61	0.17	3.70
3	20	10.45	3.70	4.07

Preglednica 4: Ponovljivost med serijami

VZOREC	n	SREDNJA VREDNOST (μ g/L)	STANDARDNA DEVIACIJA (μ g/L)	KOEFICIENT VARIACIJE (%)
1	12	5.08	0.18	3.46

2	12	7.25	0.36	4.94
3	12	9.11	0.19	2.04

4. Meritveno območje

ELISA metoda dovoljuje merjenje koncentracij med 0 in 30 µg/L.

5. Zanesljivost rezultatov

Test mora biti opravljen natanko po proizvajalčevih navodilih. V samo analizo je zelo pomembno vključiti zadostno število kontrol, da zagotovimo točnost in natančnost metode. Rezultati metode so veljavni samo, če so kontrole znotraj specifičnega območja, prav tako pa morajo biti tudi drugi parametri znotraj podanih specifikacij.



Slika 2: Aparatura za ELISA metodo pri določanju kortizola.

4. REZULTATI

Preglednica 5: Koncentracija kortizola v slini pred in po operaciji v $\mu\text{g/L}$, pri otrocih moškega in ženskega spola, starih od 5 do 7 let.

ŠTEVILKA VZORCA	PACIENT	Kortizol-pred operacijo ($\mu\text{g/L}$)	Kortizol- po operaciji ($\mu\text{g/L}$)
1	B.R	4,21	0,84
2	B.T	2,04	2,33
3	Č.K	2,68	0,68
4	G.G	2,92	1,21
5	H.N	1,32	1,25
6	J.A	1,59	1,12
7	J.V	4,52	2,04
8	K.K	5,45	1,21
9	K.B	1,73	0,95
10	M.M	3,22	3,59
11	M.V	1,52	4,91
12	M.B	3,67	0,01
13	O.P	1,46	0,01
14	P.M	3,47	1,31
15	P.M	1,48	1,55
16	P.T	2,84	0,39
17	R.M	1,83	0,01
18	S.F	0,01	8,01
19	S.A	4,00	1,65
20	U.R	6,73	2,98
21	Z.A	1,54	2,03
22	Ž.R	2,21	1,23

Normalne referenčne vrednosti kortizola v slini so:

SLINA **1.2-14.7 µg/L**

Preglednica 6: Odstopanje dobljenih rezultatov od referenčnih vrednosti

ŠTEVILKA VZORCA	BOLNIK	Kortizol pred operacijo (µg/L)	Kortizol po operaciji (µg/L)	ODSTOPANJE glede na referentne vrednosti	ODSTOPANJE glede na operativni poseg
1	B.R	4,21	0,84	znižano	Pada
2	B.T	2,04	2,33	V intervalu	Raste
3	Č.K	2,68	0,68	znižano	Pada
4	G.G	2,92	1,21	V intervalu	Pada
5	H.N	1,32	1,25	V intervalu	Pada
6	J.A	1,59	1,12	znižano	Pada
7	J.V	4,52	2,04	V intervalu	Pada
8	K.K	5,45	1,21	V intervalu	Pada
9	K.B	1,73	0,95	znižano	Pada
10	M.M	3,22	3,59	V intervalu	Raste
11	M.V	1,52	4,91	V intervalu	Raste
12	M.B	3,67	0,01	znižano	Pada
13	O.P	1,46	0,01	znižano	Pada
14	P.M	3,47	1,31	V intervalu	Pada
15	P.M	1,48	1,55	V intervalu	Raste
16	P.T	2,84	0,39	znižano	Pada
17	R.M	1,83	0,01	znižano	Pada
18	S.F	0,01	8,01	znižano	Raste
19	S.A	4,00	1,65	V intervalu	Pada
20	U.R	6,73	2,98	V intervalu	Pada
21	Z.A	1,54	2,03	V intervalu	Raste
22	Ž.R	2,21	1,23	V intervalu	Pada

5. RAZPRAVA

V analizo smo zajeli dvaindvajset pacientov, katerim smo želeli določiti nivo hormona kortizola v slini, pred in po opravljenem manjšem kirurškem posegu. To smo opravili z namenom, da bi lahko ocenili stopnjo stresa, ki je bil prisoten/odsoten. Koncentracijo kortizola v slini smo določali z ELISA metodo.

Kortizol, ki je nekonjugiran steroid, zaradi lipofilnosti prehaja s prosto difuzijo skozi acinarne celice žlez slinavk. Koncentracija kortizola v slini je neodvisna od hitrosti izločanja sline. Prednosti sline za ugotavljanje koncentracije prostega kortizola je več. Največja prednost je preprosto zbiranje vzorca, ki je neinvazivno in neboleče za pacienta. Vzorci se lahko zbirajo tudi doma in se po pošti pošljejo v analizni laboratorij. Zaradi stabilnosti kortizola je možen celo transport pri sobni temperaturi. Zbiranje sline pomeni prednost v ekstremnih pogojih, ko je otežen prevoz do laboratorija ali zamrzovanje vzorca. Vzorec sline je zelo uporaben tudi, ko potrebujemo več vzorcev zaporedoma. Stresne situacije povzročijo zvišanje koncentracije kortizola tudi v krvi, vendar pa je zbiranje vzorcev krvi s punkcijo vene, za bolnika veliko bolj stresno, kar pa kot končni rezultat lahko prikaže tudi lažno zvišane vrednosti kortizola. Kot že omenjeno zbiranje sline ni stresno, še posebno v primeru ko pacienti niso hospitalizirani, pač pa se vzorci zbirajo doma. Ta ugotovitev je pomembna predvsem pri analizi steroidov v slini otrok (3, 13, 16).

Čas zbiranja vzorca sline mora biti točno določen, ker koncentracija steroidov v slini čez dan zaradi cirkadialnega ritma niha. Izločanje kortizola je pulzirajoče in doseže svoj vrh devetdeset minut po tem, ko se zbudimo. Če želimo določiti individualni profil koncentracije kortizola v slini bolnika, je potrebno zbrati več vzorcev čez celi dan. Zadnji vzorec vzamemo pred spanjem (3).

Metode s katerimi določamo hormone v slini morajo biti zelo občutljive, ker se nahajajo analiti v njej v zelo nizkih koncentracijah. Poleg kromatografskih postopkov se pri analizah uporabljajo različne imunološke metode, kot so ELISA, RIA, LIA. Razlike so v uporabi radioaktivnega ali neradioaktivnega materiala, občutljivosti, ter seveda opremi ki je za analizo potrebna. V tej nalogi smo prikazali in razložili pomembnosti in prednosti sline kot biološkega vzorca ter uporabnost ELISA metode (16).

V preglednici 6 vidimo rezultate vzorcev otrok starih od 5-7 let. Zanimalo nas je, kakšna stopnja stresa je prisotna pri otrocih pred in po manjšem operativnem posegu. Vzorce smo zbirali pri 22 preiskovancih in prva stvar ki nas je zanimala je bila, koliko vzorcev je izven orientacijskih vrednosti za kortizol v slini. Kot je razvidno iz preglednice, je od vseh preiskovancev kar 59% takih, kjer rezultati ne odstopajo od referentnih vrednosti, kar pomeni da operacija za njih ni predstavljala prevelikega stresa. Seveda pa samo na osnovi teh rezultatov tega ne moremo 100 % zagotoviti. Od 22 vzorcev je 9 takih, kjer je vrednost kortizola v slini nižja glede na referentne vrednosti. Iz rezultatov ugotovimo, da nobeden od otrok, ki so bili naročeni na operativni poseg ni imel zvišane koncentracije kortizola v slini, kar lahko pomeni, da otroci niso bili pod stresom, oziroma so bili dobro pripravljani na operativni poseg.

Naslednje kar nas je zanimalo, je kako vrednosti kortizola padajo oziroma naraščajo glede na operativni poseg. Bolj natančneje lahko opazimo, da se je pri 16 preiskovancih raven kortizola v slini, med operativnim posegom znižala, iz česar lahko domnevamo da potek operacije ni povzročil dodatnega stresa oziroma je bila anestezija ustrezna.

Pri 6 preiskovancih pa opazimo da se je med operacijskim posegom raven kortizola povečala. Od teh 6 preiskovancev je pri 4 preiskovancih zmeren porast koncentracije. Pri 2 vzorcih pa je koncentracija po operaciji izrazito višja kot pred operacijo, vendar tega porasta zaradi premajhnega števila vzorcev, ne moremo statistično dokazati. Iz tega lahko zaključimo da pri vseh tistih preiskovancih kjer so vrednosti, ki so bile sicer pred operacijo nizke oziroma v mejah normale, po operaciji pa je ta vrednost narasla, je operacija za te otroke predstavljala nek določen stres. Tukaj je izrednega pomena že sama priprava otroka na operacijo, čas operacije, zahtevnost, okolje, anestezija, strah; Pri otrocih, kjer vrednosti padajo lahko zaključimo, da za njih ni bilo nobenega bistvenega dejavnika, ki bi med samim posegom povzročal stres.

Za tiste pri katerih pa vrednosti kortizola v slini pred in po posegu ostajajo nespremenjene, pa zelo težko interpretiramo ali je za te otroke poseg predstavljal nek določen stres ali ne.

Če primerjamo naše ugotovitve z ugotovitvami drugih študij, ki so podane v tem diplomskem delu, lahko ugotovimo da so naši rezultati primerljivi z ostalimi raziskavami. Opazimo lahko, da pri analizi, ki so jo opravili na pediatričnem oddelku bolnišnice v Bostonu v kateri so merili vrednost kortizola v serumu pred in po operaciji zelo natančno

ovrednotijo dejansko stanje izločenega kortizola v kri in s tem stopnjo stresa, vendar pa je slina kljub temu da so koncentracije kortizola tudi do 100-krat manjše, zelo verodostojen pokazatelj stresa in zelo uporaben biološki vzorec za hitro in natančno diagnostiko.

Ugotovimo lahko tudi, da se stres pred in po raznih posegih v telo, pojavlja različno glede na posameznika in s tem ni vezan samo na izražanje pri neki določeni skupini, glede na leta, dolžino posega, način anestezije. Pri naslednji analizi, ki so jo opravili na Univerzi v Iowi, kjer so želeli ugotoviti kakšne so vrednosti kortizola v slini otrok (4-10 let), pred in po aplikaciji injekcije. Tudi tam so ugotovili podobno in sicer, da je cirkadialni ritem kortizola pri otrocih zelo podoben tistemu pri odraslih in da se tudi pri postopku kot je intravenska aplikacija, podobno kot v našem primeru, vrednosti kortizola v slini zmerno povišajo.

Kot razliko z drugimi študijami lahko podamo, da so vse druge raziskave opravljene po drugem principu kot je naša, poleg tega tudi ne vemo po kakšni metodi so določali kortizol in lahko zaradi tega ugotovitve odstopajo od naših, vendar zagotovo razlike niso velike (11).

6. SKLEP

Z našim delom smo želeli kot prvo predstaviti kako stres vpliva na naše življenje, tako pozitivne kot negativne strani stresa smo opisali, kot vidimo je stres vedno vsaj malo prisoten v našem življenju. Ugotovili smo da je določena količina stresa nujno potrebna za normalno življenje. Kot rešitev kako obvladamo prekomerni stres smo raziskali in podali številne sprostivne tehnike.

Pri tej diplomski nalogi smo želeli ugotoviti, kakšna stopnja stresa je prisotna pri otrocih pri kirurškem posegu oz. kako vrednosti kortizola v slini naraščajo ali padajo. Bolj natančneje lahko opazimo, da se je pri 16 preiskovancih raven kortizola v slini, med operativnim posegom znižala. Pri 6 preiskovancih pa opazimo da se je med operacijskim posegom raven kortizola povečala. Iz tega lahko zaključimo da pri vseh tistih preiskovancih kjer so vrednosti ki so bile sicer pred operacijo nizke oziroma v mejah normale, po operaciji pa je ta vrednost narasla, je operacija za te otroke predstavljala nek določen stres. Ugotovili smo, kako dober in natančen pokazatelj stresa je kortizol v slini, spoznali pa smo tudi morebitne dejavnike stresa pri operativnem posegu.

Poleg tega smo prikazali prednosti sline kot biološki vzorec in njeno uporabnost pri samem določanju hormonov.

Predstavili smo tudi lastnosti in specifičnost ELISA metode, s katero smo dokazovali kortizol v slini.

7.LITERATURA

1. Ovejero,A.F., Negri,M.:Fiziologija človeka,Zbirka Naravoslovni atlasi, 1.ponatis,Založba Mladinska knjiga, Ljubljana,1995:77-85
2. . Bresjanec, M., Ribarič, S., Rupnik, M.: Patofiziologija s temelji fiziologije, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana,1999: 137-141, 169-171.
3. Costanco, L.S.: Physiology, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1998: 302-310, 335-391.
4. Eugenio Luigi Iorio, MD, PhD.; FRAS 4 and global assessment of oxidative stress; Presentation of FRAS 4 system, Grosseto , Italy, 2003.
5. . McArdle A, Jackson MJ: Exercise, oxidative stress and ageing. Department of Medicine, University of Liverpool, UK, J, Anat.2000; 197: 539-541.
6. Lock S., Smith A.: Družinski zdravstveni leksikon, Mladinska knjiga, Ljubljana, 1981: 85-97.
7. Starc, Radovan: Stres in bolezni: od stresa do debelost, zvišanih maščob, arterijske hipertenzije, depresije, srčnega infarkta, kapi in prezgodnje smrti, Ljubljana, 2007: 10-72.
8. Chrousos, George P.: Stress:Basic mehanisms and clinical implications, Annals of the New York Academy of Sciences, 1995, vol: 771: 1-7, 13-30.
9. Black PH. Minireviews: Central Nerveous system-Immune System Interactions: Psychoneuroendocrinology of stress and its immune consequences, 1994; 38: 1-6
10. Anand KJS, Phil D, Kickey PR, Hansen DD. Hormonal-Metabolic stress responses in neonates undergoing cardiac surgery. Anesthesiology 1990; 73: 661-700
- 11.Khilnani P., Munoz R., Salem M., Gelb C., Todres ID., Chernow B; Hormonal responses to surgical stress in children, Journal of pediatric surgery, 1993; 1:1-4.
11. McCarthy AM., Hanrahan K., Kleiber C., Zimmerman MB., Lutgendorf S., Tsalikian E; Normative salivary cortisol values and responsivity in children, Applied nursing research, 2009; 1: 54-62.
12. Varagič V., Milošević M.: Farmakologija, Medicinska knjiga, Beograd-Zagreb, 1988: 82-265.
13. IBL-Hamburg:Cortisol Saliva LIA;Instructions for Use,verzija 2001, 1-21:
[http:// www.IBL-hamburg.com](http://www.IBL-hamburg.com).
14. <http://www.salivahormonetesting.com>

15. IBL-Hamburg: Measurement of Steroids in Saliva, 2002, 12-19: [http:// www.IBL-hamburg.com](http://www.IBL-hamburg.com).
16. Hold, K.M., De Boer, D., Zuidema, j.,Maes, R.: Saliva as an analyttical tool in Toxicology International Journal of Drug Testing,2000:1-35.
17. Malamud, D., Tabak, L.: Saliva as a diagnostic fluid, Annals of the New York Academy of Sciences, 1993: 694: 130-145.