

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Magdalena Žánová

STANOVENÍ KORTIZOLU VE SLINÁCH

Determination of cortisol in saliva

Bakalářská práce

Konzultant bakalářské práce: Ing. Drahomíra Springer, Ph.D.

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Markéta Martínková, Ph.D.

Praha 2013

Tato bakalářská práce vznikla ve spolupráci s Ústavem lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK na Karlově náměstí v Praze jako součást výzkumného záměru IGA: NT 11 277 - 6, 2010 - 2015, GIGH – 1021 – 00 – 6 - 0203.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 13. srpna 2013.

.....

Abstrakt a klíčová slova

Abstrakt

Práce se zabývá stanovením slinného kortizolu za použití imunochemického chemiluminiscenčního analyzátoru ADVIA: Centaur firmy Siemens. Experimentálního odběru slin se zúčastnilo 141 probandů ve věkovém rozmezí 7 – 76 let. Dobrovolníci byli rozděleni do skupin podle pohlaví: muži, ženy, které užívají hormonální antikoncepci (HAK) a ženy neužívající HAK. U těchto skupin byly stanoveny referenční intervaly hladin ranního a odpoledního slinného kortizolu. U skupiny žen neužívající HAK byl stanoven referenční interval 13,2 – 55,5 nmol/l pro ranní slinný kortizol a pro ženy užívající HAK byl referenční interval 15,5 – 44,2 nmol/l. Referenční interval odpoledního slinného kortizolu u žen neužívající HAK byl 4,0 – 16,6 nmol/l a u skupiny žen užívající HAK byl 7,9 – 22,6 nmol/l. U skupiny mužů byl stanoven referenční interval pro ranní kortizol 15,8 – 47,7 nmol/l a pro odpolední kortizol byl stanoven referenční interval 5,2 – 25,4 nmol/l. Rozdíly mezi stanovenými referenčními intervaly u všech sledovaných skupin jsou nepatrné. Nutné je však zachovat různé referenční intervaly pro ranní a odpolední odběry. Referenční interval pro ranní kortizol ve slinách byl stanoven na 14,3 – 46,2 nmol/l a odpolední referenční interval byl 4,0 – 22,2 nmol/l. U dalších šesti žen a čtyř mužů byl stanoven denní profil slinného kortizolu odběrem vzorků ve čtyřech různých dobách během dne. Průběh hladin slinného kortizolu odpovídal u žen neužívající HAK, u žen užívající HAK a u mužů cirkadiánnímu rytmu, kterému kortizol podléhá. U všech půlnočních vzorků byla koncentrace slinného kortizolu nižší než 9 nmol/l. Tato hodnota je obvykle považována za cut off pro diagnózu Cushingova syndromu (CS). Naměřené hladiny slinného kortizolu stanovené ze dvou různých odběrových systémů Salivette od firmy Sarstedt se od sebe klinicky významně nelišily. Hladiny slinného a sérového kortizolu spolu dobře korelují, byla tedy potvrzena skutečnost, že hladiny slinného kortizolu odráží hladiny kortizolu v séru.

Klíčová slova

Imunoanalýza, diagnostika Cushingova syndromu, cirkadiánní rytmus, kortizol ve slinách, referenční interval, saliveta, sérový kortizol.

Abstract

This thesis deals with salivary cortisol levels measured by the ADVIA: Centaur CP Immunoassay System. Experimental saliva sampling was performed on 141 probands from age 7 to 76. Volunteers were divided to groups according to their sex: males, females using hormonal contraceptives (HC) and females not using HC. Reference intervals of morning and evening salivary cortisol were defined: females not using HC 13,2 – 55,5 nmol/l and females using HC 15,5 – 44,2 nmol/l for morning salivary cortisol. Females not using HC 4,0 – 16,6 nmol/l and females using HC 7,9 – 22,6 nmol/l for afternoon salivary cortisol. Males 15,8 – 47,7 nmol/l for morning salivary cortisol and 5,2 – 25,4 nmol/l for afternoon salivary cortisol. Differences in stated intervals were imperceptible in all monitored groups. However, it is necessary to maintain different reference intervals for both morning and evening sampling. Reference interval for morning sampling was 14,3 – 46,2 nmol/l and reference interval for afternoon sampling was set at 4,0 – 22,2 nmol/l. Daily profiles of salivary cortisol were determined in 6 females and 4 males in four different parts of a day. The course of salivary cortisol levels corresponded in females not using HC, females using HC and males with circadian rhythm, which is subject to cortisol. Salivary cortisol concentration of all midnight samples was lower than 9 nmol/l which is usually considered as a cut off for Cushing's syndrome (CS) diagnosis. Measured levels of salivary cortisol set according to two different sampling systems Salivette made by Sarstedt clinically did not differ significantly. Salivary cortisol and serum cortisol levels correlate well and it has been proved that salivary cortisol levels reflect serum cortisol levels.

Keywords

Immunoanalysis, Cushing's syndrome diagnostics, circadian rhythm, salivary cortisol, reference interval, salivette, serum cortisol.

Poděkování

Ráda bych velice poděkovala Ing. Drahomíře Springer, Ph.D za odbornou pomoc, ochotné poskytování informací, cenných rad, za velkou trpělivost a výbornou pracovní atmosféru. Mé poděkování také patří doc. RNDr. Markétě Martínkové, Ph.D za ochotu, vstřícnost a lidský přístup. Dále bych chtěla poděkovat vedení, pedagogům a studentům Gymnázia a SOŠ Rokycany, kteří se největší měrou podíleli na poskytnutí biologického materiálu a samozřejmě všem ostatním dobrovolníkům. V neposlední řadě za morální a psychickou podporu děkuji své rodině, Davidu Hrbáčkovi a Michalu Kacerovskému.

Obsah

1 Úvod	10
2 Teoretický úvod	11
2.1 Kortizol	11
2.1.1 Biosyntéza kortizolu	12
2.1.2 Kůra nadledvin	13
2.1.3 Sekrece kortikoidů a účinek ACTH	13
2.1.4 Diurnální (cirkadiánní) rytmus	15
2.1.5 Transport kortikosteroidů	15
2.1.6 Metabolismus a exkrece glukokortikoidů	17
2.1.7 Zpětnovazebné působení glukokortikoidů	18
2.2 Sliny	18
2.2.1 Sekrece slin	18
2.2.2 Složení slin	19
2.2.3 Tvorba slin	20
2.2.4 Nervové řízení sekrece slin	20
2.3 Nemoci spojené s produkcí kortizolu	21
2.3.1 Cushingův syndrom	21
2.3.2 Addisonova nemoc	22
2.4 Laboratorní diagnostika	23
2.4.1 Stanovení kortizolu v moči a plazmě či séru	24
2.4.2 Stanovení kortizolu ve slinách	24
2.4.3 Techniky sběru vzorků	24
2.4.4 Imunoanalytické metody	25
3 Experimentální část	28
3.1 Metodika	28
3.1.1 Princip metody	28
3.1.2 Reagencie	28

3.1.3	Přístroj	29
3.2	Materiál	30
3.2.1	Analyzované látky	30
3.2.2	Postup odběru vzorku	30
3.3	Statistické postupy	32
4	Výsledky	33
4.1	Srovnání dvou typů salivet	33
4.2	Stanovení meze stanovitelnosti	34
4.3	Srovnání séra a slin	35
4.4	Stanovení referenčních intervalů	36
4.5	Profily	38
5	Diskuze	40
5.1	Odběr materiálu	40
5.2	Imunoanalytické vyšetřování	41
5.3	Srovnání séra a slin	42
5.4	Stanovení referenčních intervalů	43
5.5	Profily	44
6	Závěr	46

Přehled použitých zkratek

ACTH	Adrenokortikotropní hormon
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CBG	Globulin vázající kortikosteroidy, též označován jako transkortin
CS	Cushingův syndrom
CRH	Kortikotropin uvolňující hormon, též označován jako kortikotropin
ER	Endoplazmatické retikulum
HAK	Hormonální antikoncepce
IS LC/ MS/ MS	Tandemová hmotnostní chromatografie s izotopovou dilucí
POMC	Proopiomelanokortin

1 Úvod

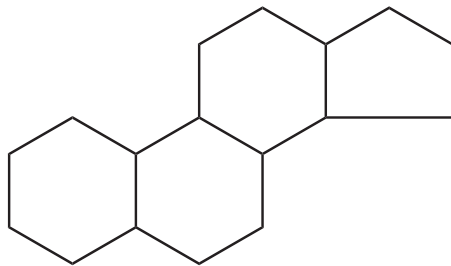
Stanovení slinného kortizolu, které bylo námětem této bakalářské práce, se provádí experimentálně již řadu let. Metody stanovení a tím i výsledky se mohou lišit na základě použité imunoanalýzy. Stanovení kortizolu ve slinách využívají zejména velké nemocnice ve světě. V České republice je k dispozici v laboratořích některých velkých fakultních nemocnic. Je vhodnou součástí diagnostiky a monitorování endokrinologických poruch, zejména Cushingova syndromu (CS), ale jeho systematické rozšíření u nás zatím není velké.

Prvořadým cílem bylo vyzkoušet vhodnost běžně užívané imunoanalytické metody, určené ke stanovení kortizolu v séru, plazmě a moči, k měření hladiny kortizolu ve slinách. Druhým cílem bylo vyšetřit ranní a odpolední hladiny kortizolu u žen a mužů a na základě toho stanovit referenční intervaly pro obě skupiny. Úkolem bylo také stanovit denní profil kortizolu u žen a mužů. Dalším vytyčeným cílem bylo srovnat dva typy systémů Salivette od firmy Sarstedt, dostupných na českém trhu. Posledním zadaným cílem bylo ověřit srovnatelnost hladin slinného a sérového kortizolu.

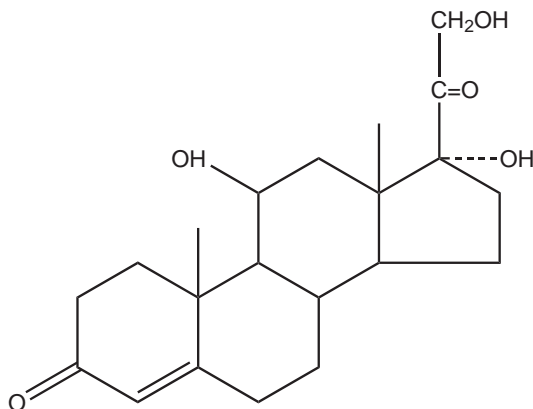
2 Teoretický úvod

2.1 Kortizol

Kortizol, zvaný též hydrokortizon, je jeden z hlavních steroidních hormonů, který reprezentuje skupinu glukokortikoidů. Syntéza kortizolu je lokalizována v kůře nadledvin. Stejně jako ostatní hormony kůry nadledvin je i kortizol derivátem cholesterolu. Základní strukturou tvořící kortizol je cyklopentanoperhydrofenantrenové jádro (Obr. 2.1). Strukturně se řadí mezi C_{21} adrenokortikální steroidy. Kortizol (Obr. 2.2) vzniká hydroxylací progesteronu.



Obrázek 2.1: Cyklopentanoperhydrofenantrenové jádro [1].



Obrázek 2.2: Kortizol [1].

Sekrece kortizolu je regulována adenohipofyzárním adrenokortikotropním hormonem (ACTH) a hypotalamickým kortikotropin uvolňujícím hormonem (CRH) a podléhá cirkadiánnímu rytmu. V tomto případě se jedná o přibližně denní, 24 hodinový rytmus sekrece ACTH, s nejnižším vrcholem v pozdních večerních hodinách

a s největším vrcholem ráno [2]. Dochází také ke stresové sekreci v důsledku nadměrného vylučování ACTH. Denně se sekretuje 16 -20 mg kortizolu [3]. Může docházet ke zpětnovazebnému působení glukokortikoidů, kdy je inhibována sekrece ACTH působením právě nadměrného množství kortizolu.

V krevní plazmě je kortizol přepravován specifickým transportním proteinem transkortinem. Pouze 8 % kortizolu představuje volnou, biologicky aktivní formu [3]. Efekt kortizolu tedy závisí jak na jeho produkci a na receptoru, tak na množství transportní bílkoviny.

Glukokortikoidy ale i samotný kortizol hraje významnou roli v některých fyziologických pochodech [4]. Ovlivňuje tvorbu glukózy, metabolismus tuků, cévní reakce, centrální nervový systém, imunitní systém a inhibuje zánětlivé reakce.

Ze všech základních steroidních hormonů, které kůra nadledvin vylučuje, je pro přežití za různých stresových situací nejdůležitější právě kortizol [5]. Důkazem je například fakt, že u většiny pacientů bez nadledvin, lze na jejich běžnou substituci užívat vhodnou dávku kortizolu.

Glukokortikoidy nabývají významu nejen při stresových situacích, ale také při dlouhodobém hladovění. Pokud je to nutné, může docházet k přesunům energie tak, že hlavním zdrojem energie se stanou tuky a bílkoviny, a glukóza zůstane ušetřena pro metabolismus mozku. Právě díky působení na metabolismus glukózy jsou nazývány glukokortikoidy [5].

2.1.1 Biosyntéza kortizolu

Metabolickým prekurzorem adrenokortikálních steroidních hormonů je cholesterol. Část cholesterolu je tvořena z acetátu, většina je však vychytávána z lipoproteinových částic v krvi, pro které se v kůře nadledvin vyskytuje mnoho receptorů [6].

Transport intracelulárního cholesterolu z vnější do vnitřní mitochondriální membrány je krok potřebný pro zahájení syntézy steroidních hormonů (Obr. 2.3). Přenos je regulován nosičovým proteinem. V mitochondriích se nejprve vytváří progesteron, který je výchozí látkou pro vznik kortizolu. V důsledku tvorby steroidních hormonů se cyklopentanoperhydrofenantrenové jádro cholesterolu na rozdíl od počtu uhlíků nemění [1].

Z cholesterolu se za odštěpení šesti uhlíků postranního řetězce a za oxidace na uhlíku 20 stává pregnenolon [7]. Tuto reakci katalyzuje cholesteroldezmoláza, enzym z rodiny cytochromů. Přesněji P450_{scc}, enzym odštěpující postranní řetězce [6],

[1]. Pregnenolon je v endoplazmatickém retikulu (ER) dehydrogenován na progesteron za současné katalýzy 3β -hydroxysteroiddehydrogenázou. Tento enzym vystupuje i při přeměně 17α -hydroxypregnenolonu na 17α -hydroxyprogesteron. Tyto dva hormony jsou tvořeny z progesteronu za současné katalýzy 17α -hydroxylázy nebo-li P450c17. Přísně regulované hydroxylace progesteronu vedou ke vzniku kortizolu. Působením 21β -hydroxylázy, P450c21 se do daných poloh progesteronu postupně zavádí OH-skupiny. Nejprve dochází k hydroxylaci progesteronu na 17α -hydroxyprogesteron a následně k jeho hydroxylaci na 11-deoxykortisol. Ten putuje zpět do mitochondrií, kde dochází k jeho hydroxylaci na uhlíku 11 a vzniká kortizol.

2.1.2 Kůra nadledvin

Nadledviny jsou párový orgán, který zasahuje syntézou a sekrecí řady hormonů do základních životních procesů.

Nadledviny se skládají ze dvou částí. Z vnější kůry a vnitřní dřeně, které se liší embryologicky, anatomicky i funkčně. Kůra nadledvin je tvořena třemi zónami, které tvoří přibližně 90 % hmotnosti nadledvinek [6]. Každá zóna je příznačná specifickou sekrecí hormonů. Pod povrchem kůry se nachází zona glomerulosa, která je zdrojem mineralokortikoidů. Zona fasciculata produkuje především glukokortikoidy a zona reticularis, nejnvnitřnější část kůry, pohlavní hormony.

2.1.3 Sekrece kortikoidů a účinek ACTH

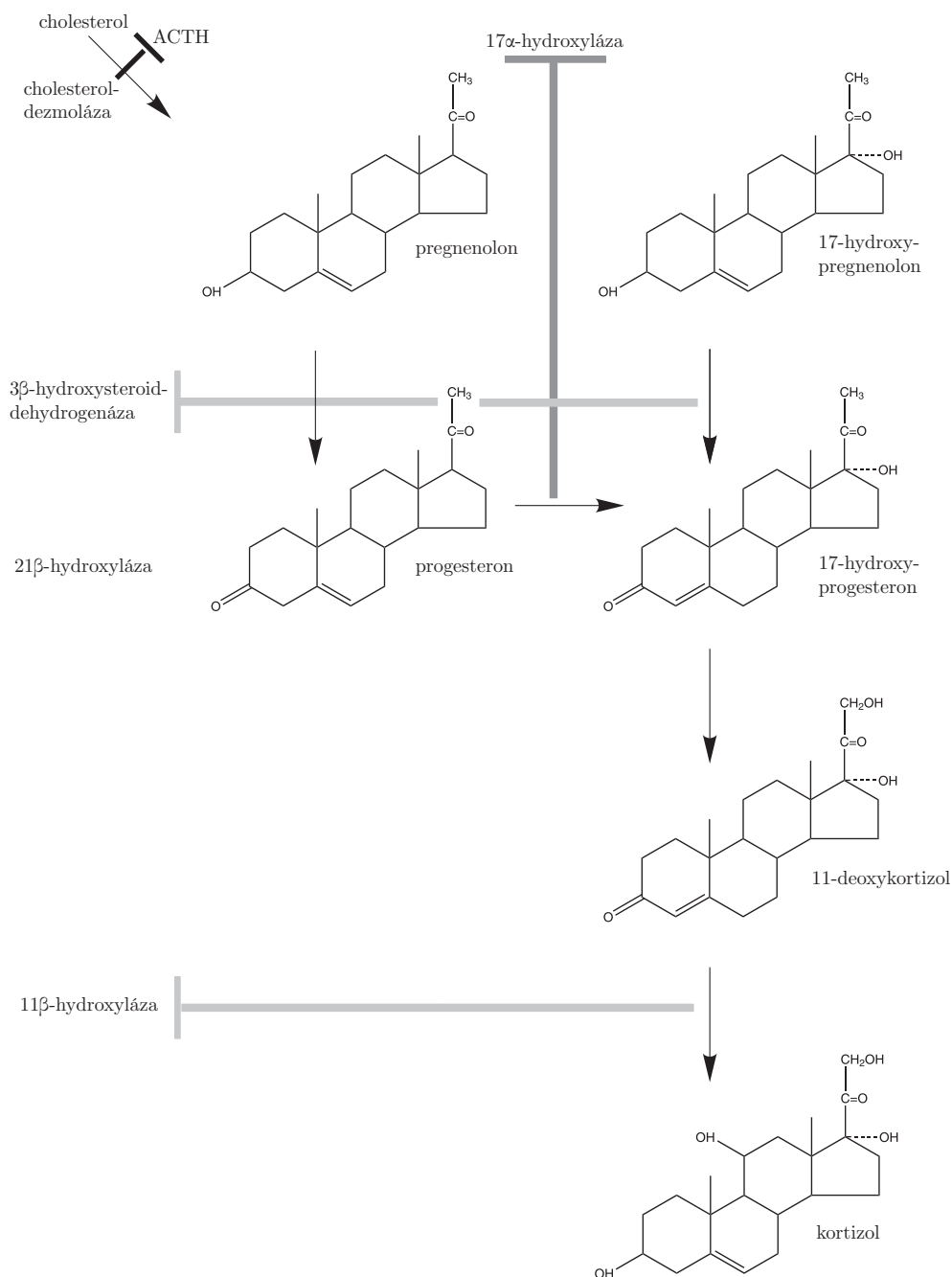
Produkce glukokortikoidu kortizolu je řízena osou hypotalamus-hypofýza-kůra nadledvin, která má pozitivní odezvu jak na fyziologické, tak na psychické stresové podněty [8].

Tato osa podléhá zpětnovazebné inhibici glukokortikoidu kortizolu [9].

Endokrinní činnost kůry nadledvin reguluje z hypotalamu nejprve kortikoliberin, který reguluje sekreci ACTH z předního laloku hypofýzy [6].

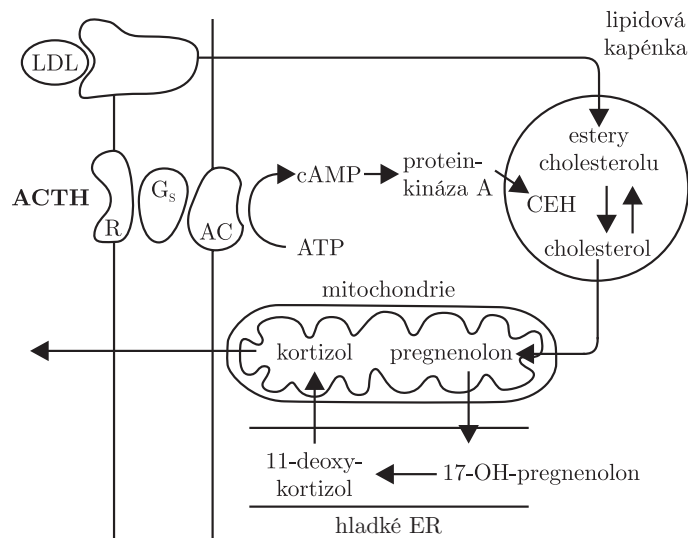
Hypotalamus uvolňuje CRH a arginin-vasopresin. Ty v důsledku reakce na stresové podněty spouští syntézu pro-hormonu proopiomelanokortinu (POMC) v kortikotropních buňkách přední hypofýzy [8]. Z POMC je poté tvořen ACTH a uvolňován do krevního oběhu.

Funkční struktura, proliferace buněk i dostatečné množství cholesterolu koordinuje ACTH. V plazmatické membráně se vysokou afinitou váže na receptory buněk kůry nadledvin [1]. Tím se aktivuje systém adenylátcykláza/cyklický adenosinmo-



Obrázek 2.3: Biosyntéza kortizolu [1].

nofosfát (cAMP). Zvýšená koncentrace cAMP aktivuje proteinkinázu A, která fosforyluje cholesterolsterhydrolázu. Dochází tak ke zvýšení přeměny esterů cholesterolu na volný cholesterol, čímž je zvýšena tvorba pregnenonu a jeho derivátů, tím pádem kortizolu (Obr. 2.4). Rychlé vyplavení ACTH je způsobeno stresem. Při chronické stimulaci ACTH kůra hypertrofuje. Množství kortizolu také kolísá v závislosti na diurnálním rytmu, kterému ACTH podléhá.



Obrázek 2.4: Účinek ACTH na buňky produkující kortizol [1].

2.1.4 Diurnální (cirkadiánní) rytmus

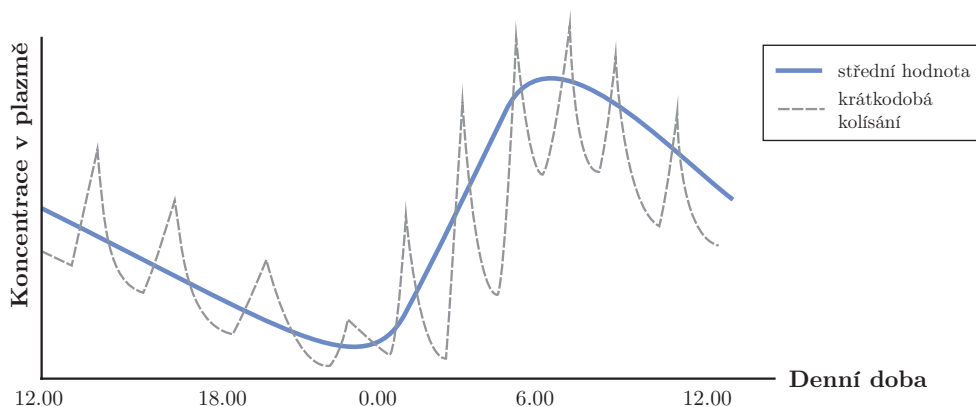
Sekrece CRH, ACTH a tím tedy i kortizolu je řízena nepravidelnými pulzy, ke kterým dochází v průběhu dne [4]. Během 24 hodin nastane zhruba 10 – 15 pulzů, po kterých se kortizolémie zvyšuje a mezi pulzy klesá. Maximální koncentrace glukokortikoidů je pozorována v ranních hodinách, v době probuzení (4.00 – 10.00), kdy jsou pulzy nejčastější. Zatímco nejnižší sekrece je pozorována v noci v důsledku menšího počtu pulzů (Obr. 2.5).

Biologické hodiny cirkadiánního rytmu ACTH leží v suprachiasmatických jádrech hypotalamu [10]. Stejně tak jako suprachiasmatické jádro hypotalamu stimuluje maximální aktivitu hypotalamu, může jeho aktivitu inhibovat v průběhu spánku.

Změna cirkadiánního rytmu je důsledkem změny aktivity, věku, nedostatku spánku a depresí [6].

2.1.5 Transport kortikosteroidů

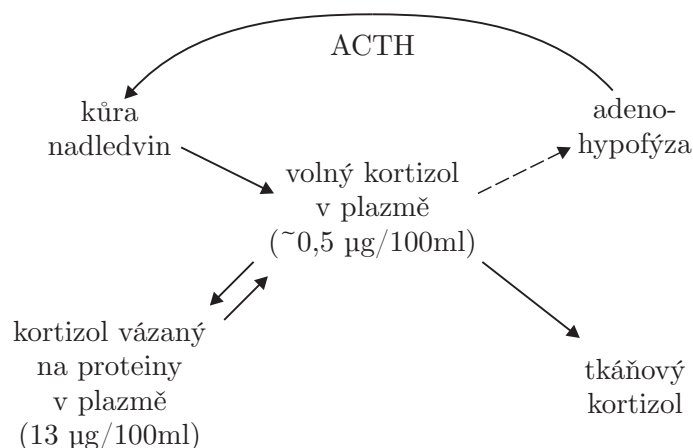
Hydrokortizon je v krevním oběhu vázán na specifickou bílkovinu globulin L, zvanou transkortin. Kromě globulinu vázajícího kortikosteroidy (CBG) je také albumin transportérem kortizolu v krvi [5]. Vázaný kortizol představuje přibližně 92 % celkového kortizolu, zbytek představuje volný kortizol. Pouze volně cirkulující kortizol je biologicky aktivní [6]. Vztah mezi volným a aktivním kortizolem je vidět na Obr. 2.6. Kortizol vázaný na proteiny v plazmě přebírá funkci krevní zásobárny hormonu. Vывázáním kortizolu z vazby na protein je zajištěna zásoba tkání volným



Obrázek 2.5: Cirkadiánní rytmus kortizolu [11].

kortizolem. Pokud je hladina celkového plazmatického kortizolu v normě, vyskytuje se v plazmě velmi malé množství volného kortizolu. Pokud celkový plazmatický kortizol dosáhne vyšší hladiny než je $20 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, tak se vazebná místa transkortinu saturují. Další zvýšení celkového kortizolu v plazmě způsobí, že se do určité míry zvýší vazba na albumin. K hlavnímu vzestupu však dochází ve frakci nevázané na proteiny.

Tvorba CBG probíhá v játrech [6]. Hladina CBG se zvyšuje působením estrogenů. Zvýšení je také pozorováno v těhotenství. Naopak při cirhóze jater nebo při nefróze, amyloidóze je hladina transkortinu nízká. I když je hladina CBG vysoká, nemusí se zvýšená hladina kortizolu projevit příznaky hyperkortizolizmu. Je to zapříčiněno tím, že množství volného kortizolu se nemění, zvýšená je jen vázaná část.

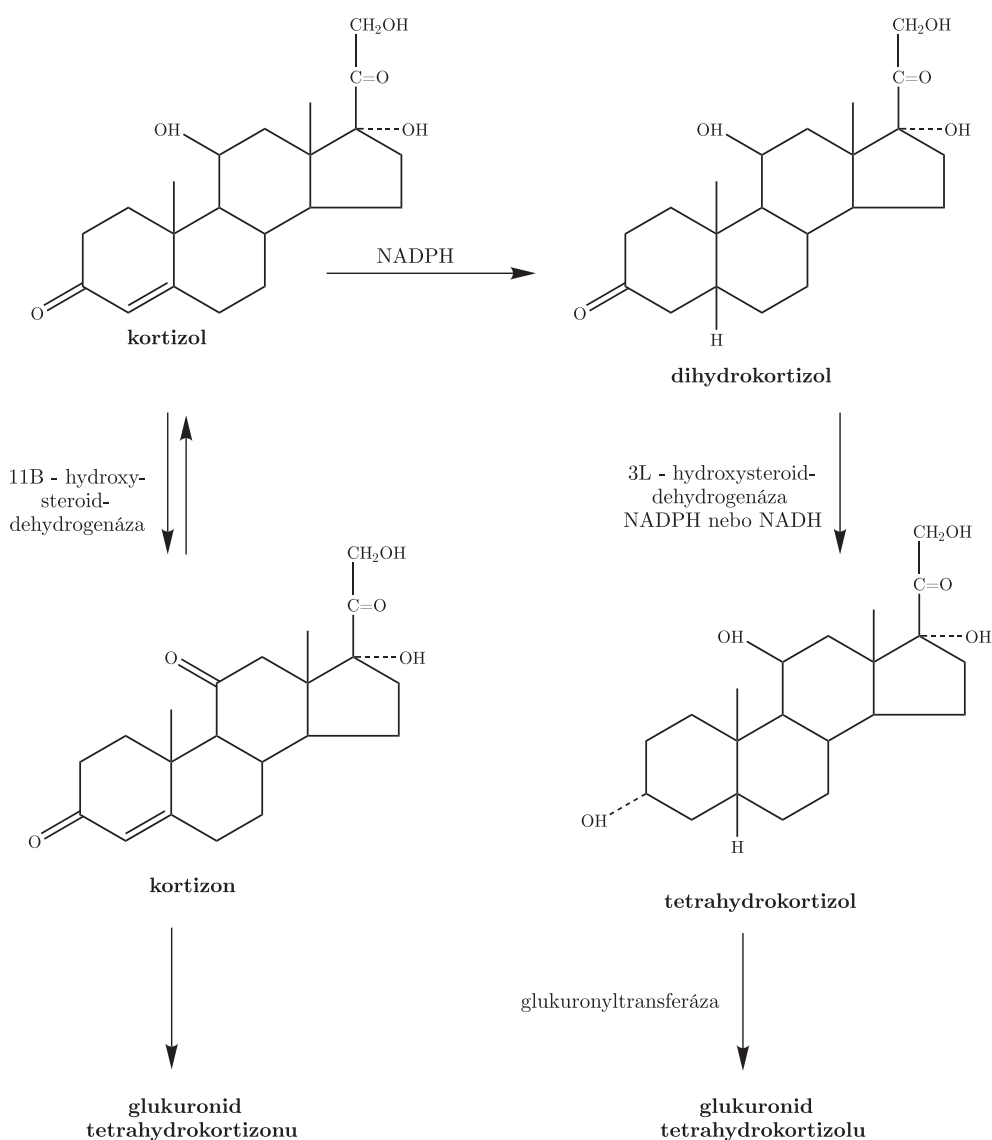


Obrázek 2.6: Vztah volného a vázaného kortizolu [1].

2.1.6 Metabolismus a exkrece glukokortikoidů

Poločas cirkulace kortizolu je 70 – 120 minut [6]. Jeho metabolismus a inaktivace probíhá v játrech. Vytváří se zde redukované formy kortizolu (Obr. 2.7).

Hlavním krokem je přeměna kortizolu na kortizon, který má na uhlíku 11 vazbu =O místo vazby – OH [12]. Výsledný kortizon má aktivitu téměř shodnou s kortizolem. Velkou roli zde hrají dva odlišné izoenzymy 11 β -hydroxysteroiddehydrogenázy. Typ I je zodpovědný za vzájemnou přeměnu kortizolu na kortizon. Typ II tohoto izoenzymu katalyzuje přeměnu kortizolu na kortizon. V tomto případě se jedná pouze o jednosměrnou konverzi.



Obrázek 2.7: Metabolismus kortizolu [1].

Takto vytvořený kortizon je secernován játry do krve. Poté dochází k rychlé redukci a konjugaci na tetrahydrokortizon glukuronid. Tetrahydroglukuronidové konjugáty kortizolu a kortizonu vstupují do krve, kde se váží na vazebné proteiny, glukuronovou kyselinu a poté jsou vylučovány močí.

2.1.7 Zpětnovazebné působení glukokortikoidů

Pokud je hladina kortizolu vyšší, působí inhibičně na sekreci ACTH a CRH [1]. Naopak nižší hladiny kortizolu vedou ke zvýšené produkci ACTH. Sekrece ACTH je však ovlivňována i shora. Přesně jde o nervové podněty, které se sbíhají z hypotalamu a zvyšují hladinu ACTH. Například stres, trauma.

V praktické medicíně jsou kortikoidy užívány k léčbě šoku a mnoha autoimunitních, alergických i nádorových onemocnění. Při maximálně tří denním užívání kortikoidů je možné jejich celkové vysazení. Pokud jsou podávány déle, je nutné vysazovat kortikoidy postupně. Při dlouhodobé léčbě nadledviny neprodukuje glukokortikoidy, neboť jejich hladina v krvi byla zajištěna léčebně. Stejně tak hypofýza neprodukuje ACTH. Až po několik týdnů nebo měsíců dochází ke zvýšení hladiny ACTH, které vede k produkci vlastních glukokortikoidů. Zpětná vazba poté opět vede ke snížení hladiny ACTH.

2.2 Sliny

Významnou roli v této práci hraje fyziologie a produkt tří párů velkých slinných žláz a žlázek ve sliznici dutiny ústní – sliny. Saliva jsou bezbarvá, čirá nebo lehce zakalená, poněkud vazká a pěnicí tekutina. Vlastnosti slin jsou ovlivněny glykoproteiny a ionty, ze kterých se sliny také skládají. Díky nim mají mnoho rozmanitých funkcí, které by bez jejich přítomnosti nemohly být vykonány [13]. Jsou důležité pro funkčnost dutiny ústní, jícnu a žaludku [2]. Díky svému komplexnímu složení a dobrým fyzikálním vlastnostem usnadňují zpracování soust v ústech, pohyby při žvýkání, artikulaci. Také mají antibakteriální účinky. Sliny mají mnoho významných úloh ať už fyziologických nebo také praktických. Na základě jejich vyšetření lze sledovat zdravotní stav pacienta a diagnostikovat nejruznější onemocnění.

2.2.1 Sekrece slin

Tvorba slin je nepřetržitý proces a často je stimulován chutí nebo žvýkáním [13]. Sekrece může být bazální nebo vyvolaná [2]. Bazální sekrece nebo také stálá

sekrece je výsledkem nízké úrovně autonomní stimulace vyššími centry [13]. Dochází k sekreci 0,5 ml slin za minutu. Ve spánku jsou vstupy z vyšších center redukovány a tím dochází i ke snížení tvorby slin přibližně na 0,1 ml slin za minutu. To je také důvodem, proč jsou v této době zuby náchylné k napadení mikroorganismy, stále se vyskytujícími v ústech.

Vyvolanou sekrecí dochází k produkci 4 – 7 ml slin za minutu [2]. Celkové množství vytvořených slin je dáno podnětem, který salivaci vyvolá a také tím, jak je organismus hydratovaný. Pouhý smyslový vjem dobrého jídla, ať už čichový, zrakový nebo chuťový, dokonce i představa dobrého jídla vede k salivaci. Množství sekretovaných slin závisí také na suchosti potravy. Vyměšuje se jich tím více, čím je potrava sušší. Nepříjemné silné slinění zažíváme při žaludeční nevolnosti předcházející zvracení. V opačném případě dochází ke xerostomii. Například ve stresových situacích vyšší nervová centra omezují sekreci slinných žláz, což způsobuje sucho v ústech [13]. Při vysychání sliznice úst a hltanu spojené s pocitem žízně, tedy při dehydrataci, také klesá tvorba a produkce slin.

2.2.2 Složení slin

Za 24 hodin vyměšuje dospělý člověk asi 1,5 – 2 l slin. Sliny jsou pH neutrální až slabě alkalické, ale to jen v průběhu sekrece. Jsou hypotonické. Oproti plazmě vykazují nižší osmotický tlak.

Kromě vody, která je zastoupena z 99 %, se na tvorbě slin podílí také ionty (HCO_3^- , I^- , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , fosfáty) a organické látky.

Ze slinných žláz jsou uvolňovány zymogeny. Tato sekreční granula jsou zdrojem slinných enzymů [1]. Z acinárních buněk slinných žláz putují sekreční granula s enzymy až do vývodů.

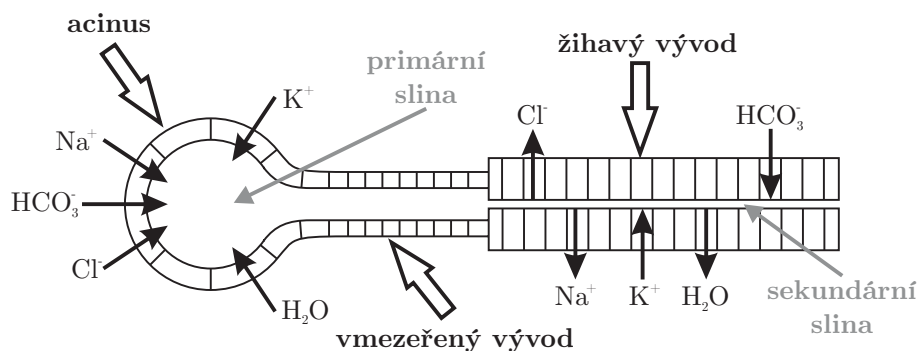
Zymogeny produkují dva hlavní trávicí enzymy. Jedním z nich je α -amyláza. Jde o jeden z nejhojněji se vyskytujících proteinů slin. Je zodpovědná za trávení cukrů, které je zahájeno v dutině ústní. Přeměňuje mnoho nerozpustných polysacharidů, štěpí například α -1-4-glykosidové vazby škrobu v menší rozpustné jednotky. Jednou z výhod této funkce α -amylázy je, že nedochází k tvorbě substrátu sloužícího pro růst mikroorganismů [13]. Slinná amyláza též zvaná ptyalin má nejsilnější účinek až v žaludku, kde je schopna ze sousta rozštěpit až polovinu škrobů [14]. Poté se na štěpení škrobu podílí pankreatická amyláza působící převážně v tenkém střevě. Další organickou komponentou produkovanou zymogeny je jazyková lipáza. Až 30 % triacylglycerolů přijatých z potravy, je rozštěpeno na mastné kyseliny

a 1,2-diacylglyceroly touto lipázou [2]. Glykoprotein zvaný mucin dodává potravě kluzký charakter a chrání ústní sliznici. Významnou funkci mají IgA, které jsou hlavními protilátkami ve slinách. Dalšími organickými látkami s ochranným účinkem jsou lysozym, laktoferin a proteiny obsahující prolin.

2.2.3 Tvorba slin

Primární slina se tvoří v acinárních buňkách slinných žláz, vývody je upravována a vylučována do dutiny ústní jako slina sekundární (Obr. 2.8).

Obecně je slina, která je vylučovaná acinárními buňkami, izotonická [1]. Obsahuje Na^+ , K^+ , Cl^- a HCO_3^- ionty, jejichž koncentrace přibližně odpovídá jejich koncentraci v plazmě. Vmezeřené buňky ústící do acinů složení slin mění. Dochází k extrakci Na^+ a Cl^- a k přidavku K^+ a HCO_3^- iontů. Neboť jsou tight junction téměř nepropustné pro vodu, stávají se sekundární sliny hypotonické [14]. Za běžných podmínek jsou sliny v dutině ústní hypotonické a alkalické, bohaté na K^+ a relativně chudé na Na^+ a Cl^- [1]. V případě zvýšené rychlosti toku slin nedochází ve vývodech ke změně jejich složení. Například u Addisonovy choroby je poměr Na^+/K^+ iontů zvýšen.



Obrázek 2.8: Tvorba slin [2].

2.2.4 Nervové řízení sekrece slin

Sekrece slin je řízena nervovým systémem [2]. K salivaci dochází na základě podmíněných a nepodmíněných reflexů. Její centrum se nachází v prodloužené míše. Stimulační účinek na slinné žlázy vykazuje jak parasympatikus, tak sympatikus. V důsledku působení parasympatiku dochází k profúzní sekreci slin, které jsou vodnaté a mají relativně nízký obsah organických látek [1]. Zároveň dochází k vazodilataci ve žlázách, jež je závislá na místním uvolňování vazoaktivního intes-

tinálního peptidu. Poškození parasymptiku může vést k atrofii slinných žláz. Stimulace symptiku vyvolává vazokonstrikci slinných žláz a sekreci menšího množství slin, které jsou bohaté na organické složky. Při porušení sympatického nervu nedochází k žádným významným změnám jako při poškození parasymptiku.

Reflexní sekreci slin vyvolává potrava v ústech. Podmíněné reflexy salivace lze snadno vyvolat smyslovými vjemy, jak již bylo uvedeno výše.

2.3 Nemoci spojené s produkcí kortizolu

Glukokortikoidy jsou jedny z hlavních steroidních hormonů, nezbytných pro život. Nadbytek nebo naopak nedostatek těchto hormonů způsobuje závažné poruchy zdraví. Mezi ně patří Cushingův syndrom a Addisonova choroba.

2.3.1 Cushingův syndrom

Patří k onemocněním způsobených dlouhodobou a nadměrnou sekrecí kortizolu [15]. Jedná se o poměrně vzácné onemocnění [16]. Ukazatelem může být těžko korigovatelná arteriální hypertenze a známky metabolického syndromu, zejména pokud jsou navíc přítomny některé typické znaky, jako je vzestup hmotnosti s centrálním ukládáním tuku. Ten se může také ukládat v oblasti obličeje, tím vzniká dojem buclatého měsícovitého obličeje. Oproti tomu mizí podkožní tuk na končetinách a dochází k atrofii svalů končetin. Četné jsou také kožní změny. Kůže může být ztenčená, náchylná k vytváření hematomů, příznačné jsou také strie purpurové barvy. Objevují se na stehnech, břiše a na prsou. Častým příznakem je také plethora obličeje, akné, zhoršené hojení ran. Ženy mívají poruchy menstruačního cyklu, amenoreu, anovulaci až infertilitu, dále pak alopecii a známky hirsutizmu vlivem androgenů. Málo častým, ale vyskytujícím se, příznakem CS jsou psychické změny, jako jsou emoční labilita, výpadky paměti a depresivní stavy.

Pokud se jedná o těžké formy CS s rychlým průběhem při velmi vysokých koncentracích kortizolu, mohou být příznaky značně odlišné. Pacienti ubývají na váze, vznikají u nich patologické fraktury z řídnutí kostí a obratlů.

Původ CS může být exogenní či endogenní. Exogenní nebo také iatrogenní CS je způsobený podáváním suprafyziologických dávek glukokortikoidů [4]. Iatrogenní CS se vyskytuje častěji než CS endogenního původu.

Endogenní CS se vyskytuje jen zřídka [15],[16]. Můžeme jej rozdělit na ACTH-dependentní a ACTH-independentní.

V případě ACTH dependentní formy je produkce kortizolu stimulována nadpro-

dukci ACTH v předním laloku podvěsku mozkového. CS může být nazýván Cushingova choroba. V takovém případě je nadprodukce ACTH způsobena tumorem hypofýzy. Ve většině případů se jedná o hypofyzární adenom. Hyperplázie kortikotropních buněk či karcinomy hypofýzy jsou ojedinělé. Dále může docházet k ektopické produkci ACTH, kdy je nadprodukce způsobena jiným vysoce maligním nádorem, například malobuněčným karcinomem plic. Z nejmenší části je endogenní hyperkortizolismus způsobený primárními karcinoidy kůry nadledvin.

Mezi ACTH – independentní formy řadíme tumory kůry nadledvin. Autonomní nadprodukce kortizolu je způsobena unilaterálními tumory nadledvin, nejčastěji adenomy. Dále je nadměrná produkce kortizolu způsobena ektopickými receptory v kůře nadledvin. Ty jsou stimulovány hormony gastrointestinálního traktu. Jde o nadprodukcí kortizolu v závislosti na jídle.

ACTH – independentní hyperkortizolismus může být také navozený graviditou. Tato forma vzniku nadprodukce je však velmi vzácná a odeznívá bezprostředně po porodu.

2.3.2 Addisonova nemoc

Jedná se o vzácnou endokrinní poruchu, která je charakterizována jako nedostatečnost kůry nadledvin se sníženou produkcí jejích hormonů. Postihuje přibližně 1 ze 100 000 lidí a může se vyskytovat u všech věkových kategorií, u mužů a žen stejně [17]. Průběh Addisonovy choroby je ve většině případů chronický a její neléčení může vést k adrenokortikální krizi nebo-li Addisonské krizi. Příznaky hypokortikolizmu se začínají projevovat až tehdy, když je zničeno přibližně 90 % tkáně kůry nadledvin.

Addisonova choroba může být podle příčin vzniku rozdělena na dvě skupiny, primární a sekundární Addisonovu chorobu. Primární adrenální insuficience je často způsobena autoimunitním onemocněním či odstraněním nadledvin kvůli přítomnosti nádoru, porušením nadledvin traumatem a krvácením nebo vysazením trvale užívaných glukokortikoidů jako léčiv [18], [15]. Primární druh choroby má spíše chronický průběh. Hlavními příznaky tohoto typu onemocnění je snížení krevního tlaku a dehydratace, hyperkalémie ohrožující stav srdce, snížená hladina sodíku a cukru, která se projevuje především u dětí. Onemocnění je také spojeno s hyperpigmentací a změnou barvy pokožky, ke které dochází při zvýšené hladině ACTH, který není vychytáván z důvodu poškození kůry nadledvin. Pigment je zvýšený v místech, která jsou více vystavována slunečnímu záření, jako je obličej, ale také v místech jako jsou genitálie, řitní otvor nebo oblast prsních dvorců. Také se vyskytují výrazně

zabarvené pigmentové skvrny na sliznici úst.

Sekundární nedostatečnost nadledvin je způsobena porušením hypofýzy. Dochází ke snížení produkce a vylučování ACTH, který nedostatečně stimuluje vylučování glukokortikoidů a vůbec funkci nadledvin. Tato forma Addisonovy nemoci není doprovázena hypotenzí ani zvýšenou pigmentací, jako je tomu u primární insuficience.

Symptomy se vyvíjejí a projevují velmi pomalu. Často jsou proto přehlíženy nebo podceňovány a zaměňovány s mnoha méně závažnými onemocněními [19]. Zvyšuje se chronická únava, dochází ke ztrátě chuti k jídlu, bolestem hlavy, snížení krevního tlaku, zvýšené horečce a snižuje se srdeční rytmus. Nemocní si často stěžují na gastrointestinální problémy spojené s nechutenstvím.

Častým způsobem první manifestace nedostatečnosti kůry nadledvin je addisonská adrenokortikální krize [5], [15]. Jedná se o akutní hypofunkci kůry nadledvin. Dochází k ní při snížené hladině všech tří skupin kortikoidů, tedy glukokortikoidů, mineralokortikoidů a androgenů. Zároveň se zpětnou vazbou zvyšuje koncentrace ACTH. Hlavním důvodem vzniku akutní adrenokortikální krize je nepoměr mezi potřebou a zásobením glukokortikoidy a rychlý nitkovitý tep [17]. Jedná se o život ohrožující krizi, mezi jejíž hlavní klinické symptomy patří bolesti břicha a dolní části zad, snížený tlak, zvracení a průjem se známkami dehydratace.

2.4 Laboratorní diagnostika

V diagnostice se používají laboratorní metody určené ke zjištění hladiny kortizolu z různých biologických materiálů. Kortizol lze stanovit v séru, heparinizované plazmě, moči a ve slinách. Kortizol se v krvi vyskytuje ve formě biologicky neaktivní, tedy vázané z 92 % na transkortin. Pouze 8 % kortizolu je v krvi přítomno volně ve formě biologicky aktivní [3]. V důsledku cirkadiálního rytmu, kterému kortizol podléhá, je maximální koncentrace celkového kortizolu v krvi dosaženo kolem osmé hodiny ranní [4]. Večerní koncentrace je poloviční oproti ranní. Naopak minimální koncentrace je dosaženo kolem půlnoci. Je tedy nutné znát dobu, kdy byl biologický materiál, ve kterém chceme kortizol stanovovat, odebrán.

Stanovení celkového kortizolu se v diferenciální diagnostice využívá ke zjištění hyperkortizolizmu a hypokortizolizmu, poruch funkce kůry nadledvin či funkčnosti osy hypotalamus – hypofýza – kůra nadledvin.

Volný kortizol se stanovuje v případě podezření na CS [20], [21], [22]. Tedy u pacientů obézních, těhotných žen, žen léčených estrogeny či užívajících HAK. U lidí, kteří trpí hypotyreózou či mentální anorexií.

2.4.1 Stanovení kortizolu v moči a plazmě či séru

Stanovení kortizolu v moči se provádí z 24 hodinového sběru moči [15]. V takovémto vzorku je odbourán vliv cirkadiánního rytmu kortizolu. Ten se v moči vyskytuje jednak ve volné — biologicky aktivní formě, jednak ve formě metabolitů a konjugátů. Volný kortizol je tedy nutné vytřepat do dichlormethanu a následně odpařit. Odparek je následně rozpuštěn v pufru. Tato forma stanovení je vždy spojena s předúpravou vzorku, ve kterém lze pak chromatograficky či imunochemicky, protilátkami stanovit volný kortizol.

Další metodou je stanovení kortizolu v séru či plazmě. Stanovení kortizolu se i přes časovou a finanční náročnost provádí z 99 % v těchto biologických materiálech.

2.4.2 Stanovení kortizolu ve slinách

Kortizol se ve slinách vyskytuje pouze v biologicky aktivní, tedy volné, formě. Pro hladinu volného kortizolu ve slinách je typická korelace s hladinou volného kortizolu v krvi a dále nezávislost na velikosti slinotoku [23]. Koncentraci volného kortizolu ve slinách neovlivňují změny koncentrace transkortinu v krvi. S ohledem na to, že se kortizol ve slinách vyskytuje pouze volný, odpadá tak fáze předúpravy vzorku.

Zvýšená koncentrace slinného kortizolu stanovená v pozdních nočních hodinách jednoznačně diagnostikuje CS. Naopak koncentrace naměřené v ranních hodinách jsou v normě a během dne se již výrazně nemění. Stanovení kortizolu ze vzorků slin odebraných o půlnoci jsou velmi citlivým ukazatelem pro diagnostiku CS [20]. Mnoho studií ukázalo, že citlivost měření hladiny nočního kortizolu ve slinách je větší než 90 % v porovnání s ostatními screeningovými testy sloužícími k diagnostice CS, jako je stanovení kortizolu z moči sebrané za 24 hodin nebo dexamethasonový supresní test. Stanovení kortizolu ve slinách se také začíná více používat k diagnostice adrenální insuficience v souvislosti s nízkou hladinou slinného kortizolu a také při monitoraci léčby glukokortikoidy.

2.4.3 Techniky sběru vzorků

Jednou z možných, dnes již však méně používaných alternativ sběru slin, je plivání a slintání přímo do plastového sběrného kelímku [20],[21]. Aktivním pliváním je možné získat až 1 ml vzorku za minutu. Tento přímý sběr má však několik nevýhod. Jednou z nich je například společenská bariéra. Samotné zpracování takových vzorků je pak také poměrně nepříjemným úkolem. Z praktického hlediska je

pak sběr slin v tomto případě komplikován náhlou suchostí v ústech. K odstranění tohoto problému se na jazyk aplikovala kyselina citrónová, která zvýšila slinotok na 5 – 10 ml za minutu. Užívání kyseliny citrónové však může ovlivnit imunoanalytické stanovení snížením pH vzorku.

V současné době se více využívají komerčně dodávané sběrné sety [21]. Ty byly vyvinuty tak, aby usnadnily sběr slin a jejich následnou analýzu, ke které postačí malé množství vzorku. Zároveň zamezují snížení koncentrace analytu při sběru a jeho náhodné modifikaci.

Nejběžnějším a nejvyužívanějším způsobem získávání slin je systém salivet (Obr. 3.3). Jedná se o speciální nádoby s tamponem. Dříve dostupné tampony z polyethylenu či polyesteru byly v roce 2003 nahrazeny bavlnou. Použití je efektivní a snadné. Tampon, který je součástí zkumavky se vyjme a vloží do úst. Po dobu minimálně jedné minuty se žvýká tak, aby nasákl slinami. Alternativou je vložit tampon pod jazyk a ponechat jej v ústech delší dobu než při žvýkání. Tampon se poté vloží zpět do zkumavky, která se uzavře. Saliveta s takto odebraným vzorkem je připravena k okamžité centrifugaci či ke zmrazení. Stabilita vzorku je pět dní v rozmezí dvou až osmi stupňů Celsia nebo tři měsíce při mínus dvaceti stupních Celsia. I z tohoto důvodu je nutné uvádět čas odběru vzorku. Při centrifugaci se získá pouze čirá kapalina, muciny, které způsobují vazkost slin, zůstávají zachycené v tampónu.

Odběr je nutné provádět vždy před vyčištěním zubů [20]. Minimálně 30 minut před odběrem je zakázáno jíst a pít s výjimkou vody. Zakázáno je také kouření, neboť kuřáci mají vyšší hladinu kortizolu ve slinách než nekuřáci.

2.4.4 Imunoanalytické metody

Pro stanovení kortizolu v biologických materiálech je typické využití imunochemických metod. Jsou založeny na vysoce specifické vazbě mezi antigenem a protilátkou. Využívají se k měření nízkých hladin hormonů, vitaminů, nádorových markerů, léků nebo drog. Ke stanovení stačí malá množství biologických vzorků ať už krve, plazmy, moči nebo slin [25].

Imunochemie nabízí jednoduché, rychlé a velice citlivé, ve většině případů snadno automatizovatelné metody použitelné pro běžné analýzy. Imunochemické metody obvykle nevyžadují náročné předúpravy vzorků nebo drahé přístrojové vybavení [25].



Obrázek 2.9: Saliveta [24].

Imunoanalytické metody mohou být rozděleny na kompetitivní a nekompetitivní [26]. Kompetitivní metody jsou založeny na soutěžení antigenu ze vzorku se značeným antigenem ze soupravy o vazebná místa na protilátkách, kterých je omezené množství. Nekompetitivní, zvané též sendvičové jsou založeny na vychytávání antigenu ze vzorku mezi dvě protilátky v reakční směsi. Původní množství antigenu je přímo úměrné detekovanému signálu.

Jako první se začala používat imunometoda s radioaktivně značenými sloučeninami, RIA (Radio ImmunoAssay) [25]. Nejběžněji používanou značkou je ^{125}I méně pak ^{57}Co a ^3H . RIA je běžně využívána jak v kompetitivním uspořádání, tak v nekompetitivním. K separaci komplexu antigen – protilátka se používá srážení polyethylenglykolem a odsávání přebytečné kapaliny, ve které zůstávají nezreagované značené protilátky (IRMA (ImmunoRadioMetric Assay) – nekompetitivní systém) nebo antigeny (RIA – kompetitivní systém).

Další využívanou metodou je EIA (Enzyme ImmunoAssay) [25]. Molekuly enzymu konjugují s protilátkami, které se váží na primární komplex antigen-protilátka. Po přidání vhodného substrátu do reakce enzym katalyzuje produkci barevného konečného produktu, který může být kvantifikován. Jako enzymová značka slouží obvykle peroxidáza nebo alkalická fosfatáza. Většina komerčně dostupných EIA systémů vyžaduje separaci specifických antigenů z nespecifických komplexů. Příkladem takového systému je ELISA (Enzyme – Linked ImmunoSorbent Assay), která je dostupná v kompetitivním uspořádání i nekompetitivním.

Další metodou je fluoroimunoanalýza. Sem patří metody, které ke značení po-

užívají nějakou fluorescenční látku, například fluorescein. Používají se zde také oba principy, tedy jak kompetitivní, tak nekompetitivní- sendvičový způsob.

Široce používaná je také chemiluminiscenční metoda. Chemiluminiscence je založena na emisi světla, která nastane v okamžiku, kdy substrát přechází z excitovaného do základního energetického stavu [25].

Energie je uvolňována při chemických reakcích, nejčastěji oxidacích. Vzhledem k nízkým pozadím biologických vzorků je chemiluminiscence vedle radioimunoanalýzy nejvíce citlivá imunometoda. Jako značka se zde používá chemiluminofor, který neinterferuje v biologickém materiálu a je stabilní. Nejběžněji používaným luminoforem je akridinový ester. Chemická reakce produkující světlo je vyvolána přidáním peroxidu vodíku v prostředí hydroxidu sodného.

Používané značení a metody separace komplexu antigen protilátka jsou obvykle součástí patentovaného postupu, který používají výrobci imunoanalytických systémů.

3 Experimentální část

3.1 Metodika

3.1.1 Princip metody

Slinný kortizol se stanovuje za použití kompetitivní imunoanalýzy s přímou chemiluminometrickou technologií na analyzátoru ADVIA: Centaur firmy Siemens. Kortizol ze vzorku soutěží s kortizolem značeným akridinovým esterem o vazbu na polyklonální králičí protilátku proti kortizolu. Tato protilátka je vázána na monoklonální myší anti-králičí protilátku, která je kovalentně vázaná na paramagnetické částice. Separace komplexu antigen – protilátka se provádí magneticky. Detekuje se chemiluminiscenční signál vznikající rozpadem akridinového esteru působením peroxidu vodíku po přidání alkalického roztoku. Mezi koncentrací kortizolu ve vzorku a relativními světelnými jednotkami naměřenými analyzátozem existuje nepřímá úměra.

3.1.2 Reagencie

Regenerační souprava Centaur Cortisol. Vlastní reagencie jsou v kazetách se dvěma typy roztoků:

- a) Solid Phase – králičí anti-kortizol protilátka vázaná na monoklonální myší anti-králičí IgG protilátku, která je kovalentně vázaná na paramagnetické částice v pufru s azidem sodným a stabilizátory
- b) Lite Reagent – kortizol značený akridinovým esterem v pufru se salicylátem sodným, azidem sodným a stabilizátory
- c) Multi Diluent 3 – lidská plazma s azidem sodným – určeno k ředění vzorků s vysokou koncentrací

Do použití se skladuje při 2 – 8 °C.

Stabilita do expirace nebo 28 dní po prvním použití ve stroji.

Kalibrátor E

Určený ke kalibraci kortizolu. Lahvičky lyofilizovaných kalibrátorů (2x2), které se rozpouští v 5 ml redestilované vody. Používá se pro rekalibraci každé nové šarže reagensů.

- a) Low kalibrátor – nižší hladina
- b) High kalibrátor – vyšší hladina

Do použití se skladuje při 2 – 8 °C. Stabilita do expirace nebo 28 dní po rekonstrukci. V analyzátoru je stabilita 4 hodiny.

ADVIA: Centaur Acid/base

Pomocné roztoky pro chemiluminiscenční detekci.

- a) Acid obsahuje peroxid vodíku a malé množství kyseliny dusičné
- b) Base obsahuje roztok hydroxidu sodného s detergentem

Stabilita do expirace.

3.1.3 Přístroj

Pro stanovení kortizolu ve slinách byl využit analyzátor ADVIA: Centaur od firmy Siemens, DE (Obr. 3.1). Tento analyzátor je založen na imunochemické chemiluminiscenci a je samostatnou jednotkou, která zahrnuje dávkování vzorků i reagensů, inkubaci, detekci a automatické vyhodnocení výsledků. Analyzátor je určen k neustálému provozu. Reagencie uložené uvnitř mají vlastní chlazený prostor.



Obrázek 3.1: Analyzátor ADVIA: Centaur [27].

3.2 Materiál

3.2.1 Analyzované látky

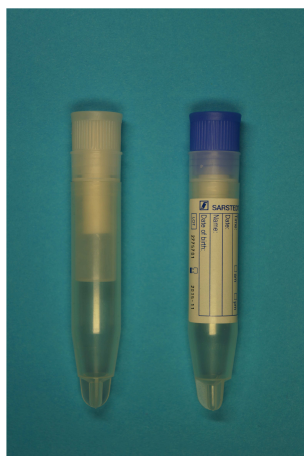
Analyzovaným vzorkem byl biologický materiál – sliny. Sliny byly získávány přímým neinvazivním odběrem od dobrovolných dárců. Pro jedno stanovení bylo zapotřebí 20 μl vzorku, ale mrtvý objem, který je potřeba pro správné pipetování analyzátoru je alespoň 150 μl vzorku. Na odběru se podílelo 141 dobrovolníků ve věkovém rozmezí 7 – 76 let. Ženy byly zastoupeny počtem sedmdesát sedm vzorků, mužů se zúčastnilo šedesát čtyři.

Dalším odebraným biologickým materiálem byla krev. Tento vzorek poskytl pouze dvanáct účastníků experimentu. Každému zúčastněnému bylo odebráno 10 ml krve, která byla po vytvoření sraženiny centrifugována dle běžných laboratorních postupů, sérum bylo separováno a byl v něm stanoven kortizol.

3.2.2 Postup odběru vzorku

Pro odběr slin bylo nutné dodržet několik podmínek: nejíst a nepít, nekouřit a nečistit si zuby minimálně 30 minut před odběrem. Tyto podmínky byly nezbytné pro samotný odběr, neboť jejich nedodržení by vedlo k znehodnocení vzorku.

Odběr se prováděl standardizovanou metodou sloužící k diagnostice a k monitorování hladiny kortizolu, při které bylo využito systému Salivette od firmy Sarstedt. Tato metoda je vhodná díky své neinvazivnosti a mohou při ní být analyzována i malá množství slin s nízkými hladinami kortizolu. Při výzkumu byly použity dva typy salivet (Obr. 3.2). Saliveta s bílou i modrou zátkou je tvořena stejnými částmi (Obr. 3.3). Liší se druhem buničiny, která pohlcuje sliny. Bílé salivety jsou tvořeny buničinou, která obsahuje malé množství kyseliny citrónové a modré salivety, určené přímo k odběru slin pro stanovení kortizolu, obsahují syntetickou buničinu.



Obrázek 3.2: Salivety.

Vzorky slin byly odebírány následovně:

1. Vyjmutí buničiny ze zkumavky.
2. Vložení buničiny do úst.
3. Převalování buničiny v ústech po dobu minimálně jedné minuty.
4. Vložení buničiny zpět do zkumavky.
5. Uzavření zkumavky.

Ihned po odběru byly vzorky uchovávány v chladu a do 48 hodin dopraveny do laboratoře. Zde se provedla centrifugace, 10 minut při 6000 otáčkách a odstředěné sliny se následně analyzovaly.

Odběr vzorků probíhal po dobu několika dní. Odběry probíhaly ve dvou časových rozmezích. Ráno mezi sedmou a osmou hodinou, odpoledne mezi čtvrtou a pátou hodinou. Za účelem stanovení denního profilu kortizolu dobrovolníci poskytli vzorky slin v několika časových intervalech a to: ráno, individuálně – bezprostředně po probuzení, v poledne, odpoledne mezi čtvrtou a pátou hodinou a o půlnoci.

Každému zúčastněnému byl rozdán dotazník s klíčovými údaji, který byl nepostradatelný pro vyhodnocování výsledků.

Vzorky krve byly odebírány odborným zdravotnickým personálem (diplomovaná sestra Zdena Kynclová). Paralelně s odběrem krve probíhal i odběr slin. Krev byla odebírána do zkumavek se separačním gelem. Po odběru bylo ihned zajištěno chlazení vzorků a do 48 hodin byly dopraveny do laboratoře k následné analýze.



Obrázek 3.3: Jednotlivé části salivety: a) zátka, b) buničina, c) vložka, d) vzorková zkumavka [28].

3.3 Statistické postupy

K vytvoření grafů a statistických údajů byly použity programy Microsoft Excel 2010 a StatSoft, Inc. STATISTICA, version 10.

4 Výsledky

4.1 Srovnání dvou typů salivet

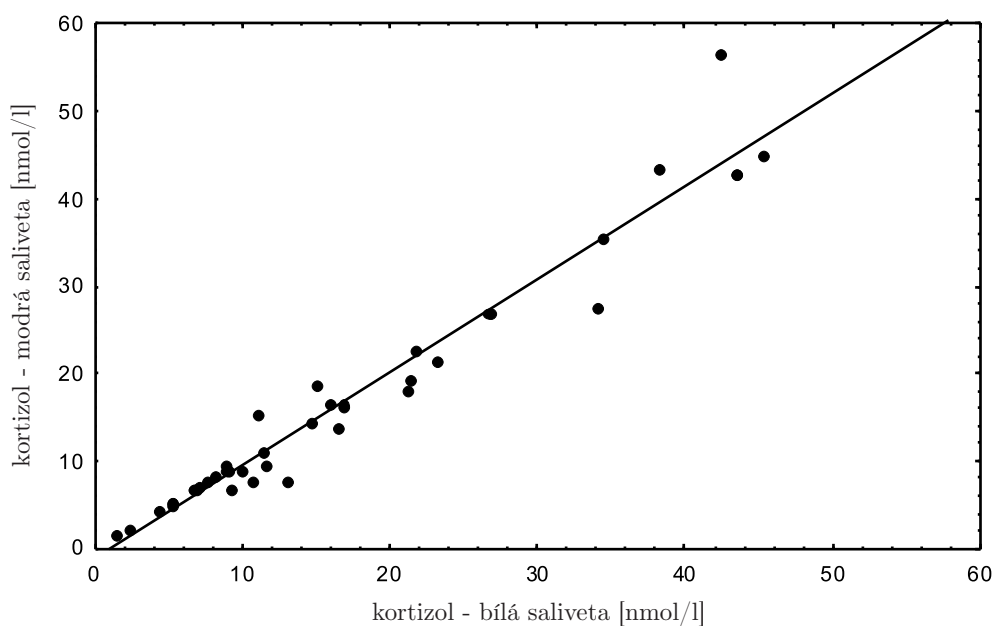
Jedním ze stanovených cílů bylo porovnat dva systémy salivet. Třicet šest dobrovolníků poskytlo vzorek slin současně do modré i bílé salivety. Tabulka 4.1 uvádí parametry sledovaného souboru, ze kterých je vidět, že oba systémy se od sebe liší nepatrně.

Tabulka 4.1: Parametry srovnávaných souborů

	počet vzorků	[nmol/l]			
		průměr	medián	minimum	maximum
bílá saliveta	36	17,32	12,25	1,50	45,29
modrá saliveta	36	17,29	12,39	1,50	56,59

Závislost koncentrace slinného kortizolu na typu salivety je v grafu (Obr. 4.1) vyjádřena rovnicí regresní přímky $f(x) = -1,0772 + 1,0603x$. Z rovnice je patrné, že rozdíl v hladinách slinného kortizolu naměřený z obou typů salivet není významný.

Závislost koncentrací slinného kortizolu na typu salivet



Obrázek 4.1: Graf závislosti koncentrací slinného kortizolu na typu salivet.

4.2 Stanovení meze stanovitelnosti

V rámci této práce byla ověřena nejnižší mez stanovitelnosti kortizolu ve slinách používanou metodou (tab. 4.2). Mez stanovitelnosti pro slinný kortizol byla posunuta na 3 nmol/l z původních 5,5 nmol/l, které byly stanoveny výrobcem. Všechny hodnoty nižší než 3 nmol/l jsou označovány < 3,0 nmol/l.

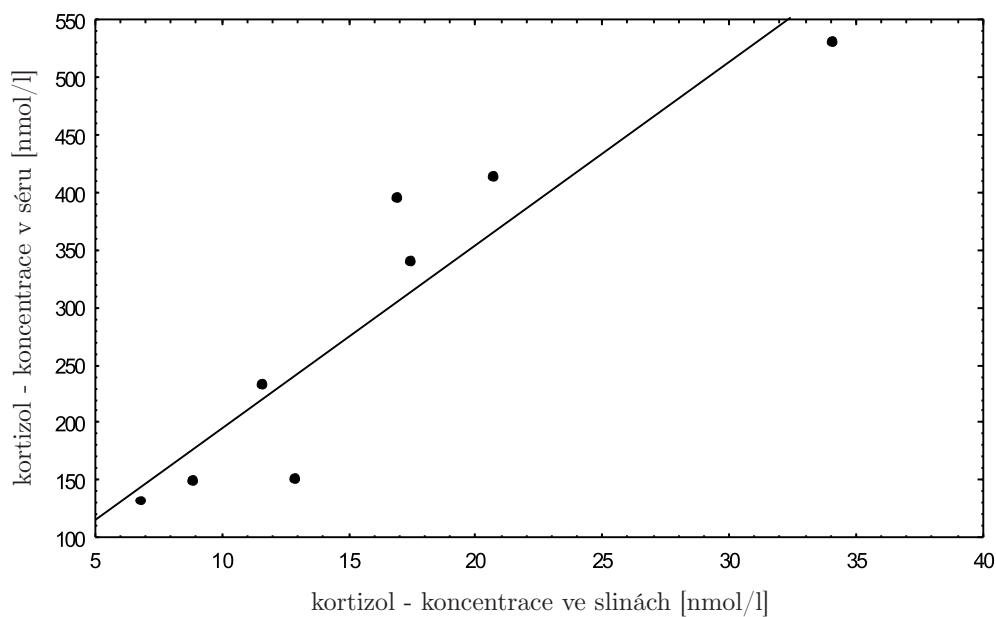
Tabulka 4.2: Rozpis ředění pro stanovení meze stanovitelnosti pomocí recovery a reprodukovatelnosti vybraných vzorků

Ředění Kortizol	Naměřená hodnota [nmol/l]	Očekávaná hodnota [nmol/l]	Recovery [%]	Reprodukovatelnost CV [%]
1:0	9,80	9,80	100,0	
1:0	9,80	9,80	100,0	
2:1	6,90	6,50	106,2	
1:1	5,30	4,90	108,2	
1:2	3,50	3,27	107,0	84,2
1:3	1,80	2,45	73,5	68,3
1:4	2,40	1,96	122,4	
1:5	0,28	1,60	17,5	
1:9	0,15	0,98	15,3	

4.3 Srovnání séra a slin

Hladina kortizolu byla současně stanovena v séru a slinách. Z přiloženého grafu (Obr. 4.2) je vidět, že koncentrace sérového a slinného kortizolu spolu korelují. Bylo splněno očekávání, že vysoké hladiny kortizolu ve slinách odráží vysoké hladiny kortizolu v séru.

Porovnání koncentrace kortizolu v séru s koncentrací kortizolu ve slinách



Obrázek 4.2: Graf porovnání koncentrace kortizolu v séru s koncentrací kortizolu ve slinách.

4.4 Stanovení referenčních intervalů

Pro stanovení referenčního intervalu byl použit 95% interval ve studované skupině. Skupina 141 dobrovolníků byla rozdělena na ženy a muže bez rozdílu věku. Ženy byly dále rozděleny na skupinu žen, které užívají HAK a na skupinu žen, které HAK neužívají. Vzorky slin byly odebírány ve dvou denních dobách a to ráno mezi 7.00 – 8.00 hodinou a odpoledne mezi 16.00 – 17.00 hodinou. Referenční intervaly jednotlivých skupin jsou uvedeny v tabulce 4.3.

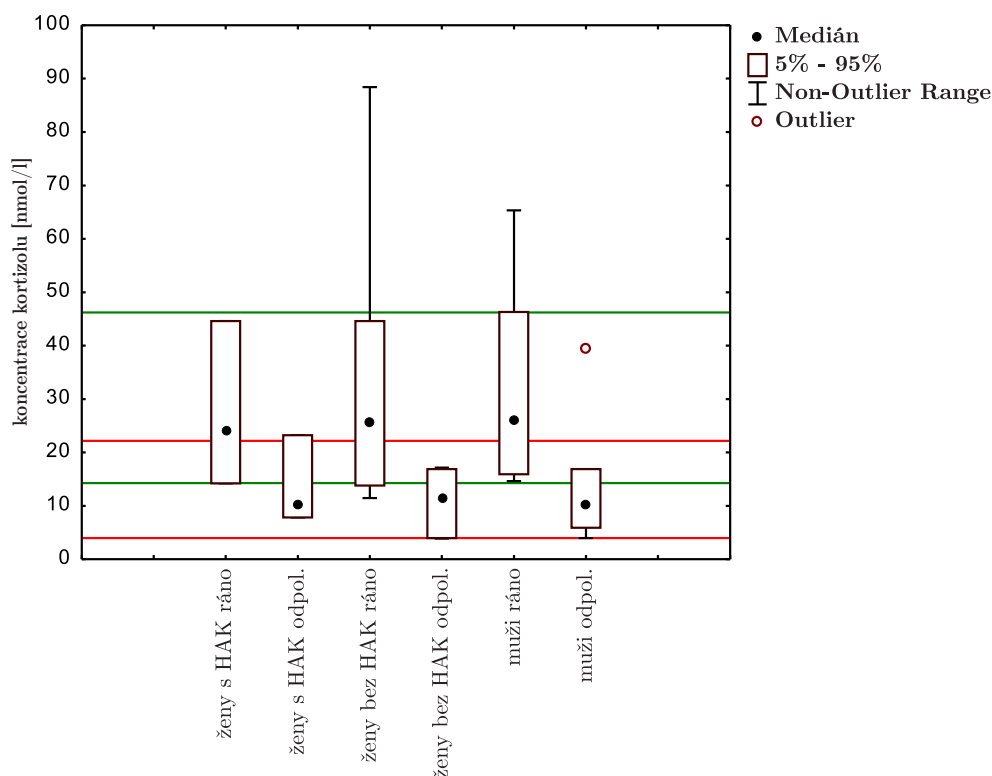
Tabulka 4.3: Referenční intervaly a statistické údaje jednotlivých skupin

	Počet vzorků	Průměr [nmol/l]	Medián [nmol/l]	Minimum [nmol/l]	Maximum [nmol/l]	Percentil 0,025	Percentil 0,975
ženy HAK ráno	16	27,90	24,16	14,23	44,59	15,47	44,17
ženy HAK odpoledne	10	12,53	10,32	7,83	23,24	7,91	22,61
ženy bez HAK ráno	31	28,86	25,61	11,46	88,42	13,22	55,55
ženy bez HAK odpoledne	20	11,07	11,57	3,90	17,17	3,99	16,61
muži ráno	38	29,11	26,09	14,67	65,34	15,83	47,73
muži odpoledne	26	11,52	10,35	3,96	39,56	5,17	25,39

Statistické údaje z výše uvedené tabulky jsou graficky znázorněny na obrázku 4.3.

Tabulka 4.4: Referenční intervaly a statistické údaje pro celkový zkoumaný soubor

	Počet vzorků	Průměr [nmol/l]	Medián [nmol/l]	Minimum [nmol/l]	Maximum [nmol/l]	Percentil 0,025	Percentil 0,975
ráno	85	28,79	25,61	11,46	88,42	14,27	46,20
odpoledne	56	11,54	10,49	3,90	39,56	4,00	22,19

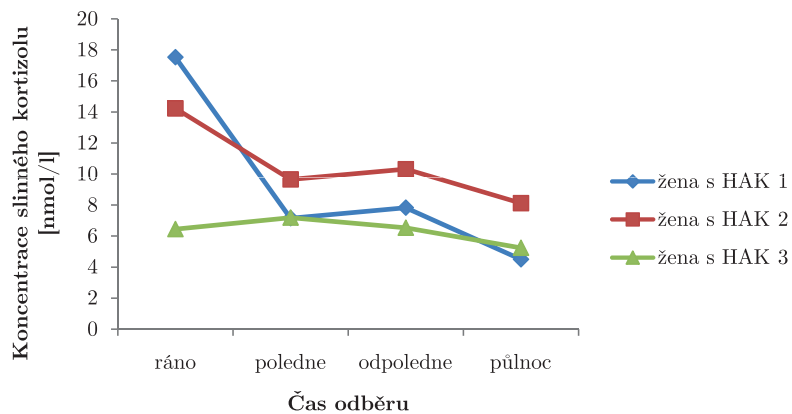


Obrázek 4.3: Srovnání referenčních intervalů slinného kortizolu u žen a mužů. „Krabicové“ diagramy znázorňují minimální a maximální hodnotu koncentrace slinného kortizolu vždy pro danou skupinu dobrovolníků a čas odběru. V každém diagramu je znázorněna průměrná hodnota koncentrace slinného kortizolu typická pro danou skupinu. Červená linie ohraničuje referenční interval pro odpolední kortizol. Zelená linie ohraničuje referenční interval pro ranní kortizol.

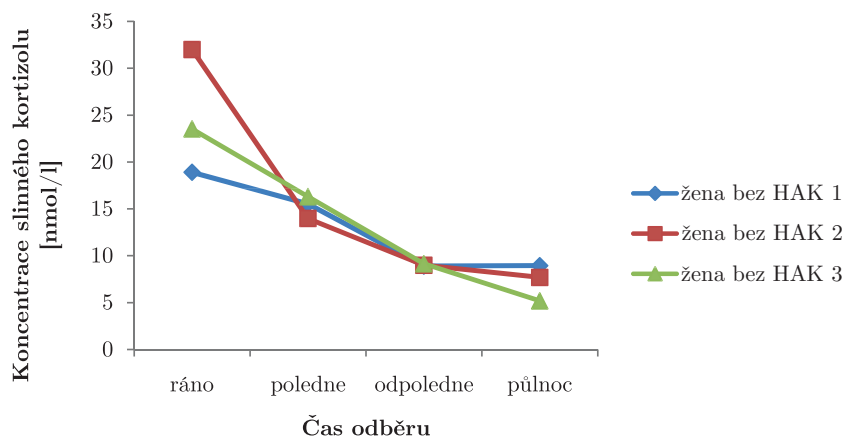
4.5 Profily

V rámci této práce byly stanoveny hladiny slinného kortizolu v několika časech během dne. Vzorek poskytl deset probandů, z toho šest žen a čtyři muži, bezprostředně po probuzení, v poledne, odpoledne mezi 16.00 – 17.00 hodinou a o půlnoci. Jednotlivé grafy (Obr. 4.4, 4.5, 4.6) znázorňují hladiny slinného kortizolu u jednotlivých osob.

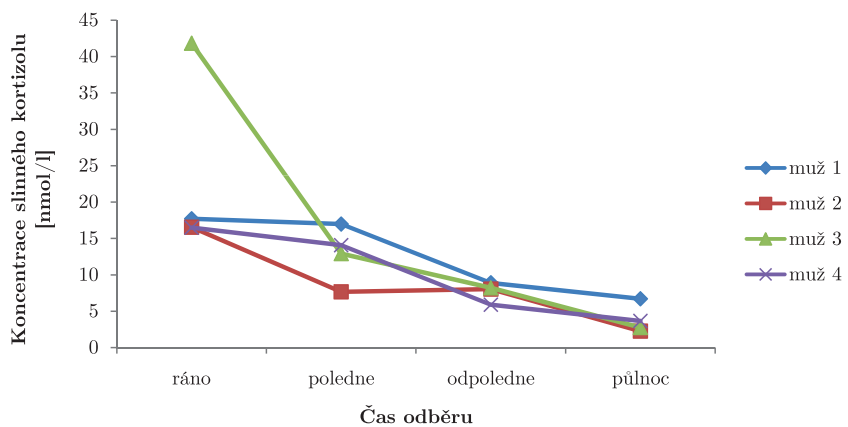
Průběhy křivek ukazují, že koncentrace slinného kortizolu v jednotlivých časových úsecích odpovídají diurnálnímu rytmu, kterému kortizol podléhá. A to jak u mužů, žen s HAK i u žen bez HAK. Výjimkou je jedna žena, která užívá HAK (Obr. 4, žena 3). Pro tento profil jsou typické nízké hladiny slinného kortizolu po celý den.



Obrázek 4.4: Graf závislosti koncentrací slinného kortizolu u žen s HAK na čase.



Obrázek 4.5: Graf závislosti koncentrace slinného kortizolu u žen bez HAK na čase.



Obrázek 4.6: Závislost koncentrace slinného kortizolu u mužů na čase.

5 Diskuze

5.1 Odběr materiálu

Systém salivet, který byl použit pro odběr slin, prokázal řadu výhod. Za největší lze považovat neinvazivnost odběru. Ani u jednoho z dárců nevyvolal odběr žádné fyzické ani psychické trauma. Výhoda neinvazivnosti se potvrdila i při nočních odběrech, kdy rozespálý dárců byl schopen bez stresu touto jednoduchou a nenáročnou metodou poskytnout samostatně požadovaný vzorek. Právě samostatnost, u dospělých pacientů a starších dětí, je bezesporu dalším kladem této metody. K urychlení výzkumu přispěl i fakt, že odběr mohl probíhat současně od několika dárců. Samotný odběr je časově nenáročný. Nevyžaduje složité přípravy ani další pracovní materiál.

Instrukce pro použití setu jsou jasné, na pochopení jednoduché. Po správném vysvětlení byli všichni, jak menší děti, tak staří lidé, schopni odběr samostatně provést. Konstrukce zkumavek umožňuje snadnou manipulaci se vzorkem a to jak při odběru, skladování, tak i při transportu. Ani 24 hodinová prodleva mezi odběrem a centrifugací neovlivnila výsledek.

Komplikace při získávání vzorků představoval lidský faktor. Zejména dobrovolníci ve věku 16 – 17 let nebyli vždy zodpovědní v dodržování instrukcí. Po stanovení vzorku bylo patrné, že studenti nesplnili 30 minutový interval nejíst, nepít, nekouřit před odběrem. Tyto vzorky musely být vyřazeny stejně tak jako v případě odebraného malého množství slin. Tento problém nastal u několika málo jedinců starších 10 – 13 let.

Obtížné bylo rovněž získávání dobrovolníků v požadovaném rozsahu. Někteří oslovení nebyli ochotni poskytnout biologický materiál. U nezletilých dětí byl nutný souhlas rodičů, kteří nebyli vždy k experimentu svolní. Tím se značně zmenšil počet dobrovolníků mladších osmnácti let. Ještě složitější situace nastala u odběru krve. Málo kdo byl ochoten podstoupit tuto invazivní metodu.

Výše uvedené problémy byly ale spojeny pouze s touto prací. V praxi, kdy by se jednalo o zdraví jednotlivých pacientů, by bezesporu odpadly. Je také zřejmé, že při možnosti výběru, by zvolili neinvazivní metodu.

K dispozici jsem měla dva typy odběrových salivet firmy Sarstedt. Systém salivet (Sarstedt, Numbrecht, Germany) je nejběžněji užívaný odběrový materiál. Vhodná příprava vzorku je důležitá pro samotnou analýzu. Vzhledem ke stabilitě kortizolu mohou pacienti uchovávat vzorky slin při teplotách 4 – 8 °C v běžných chladničkách

až po dobu 7 dnů, než jsou ke zpracování doručeny do laboratoře [29].

Konstrukčně jsou téměř stejné, liší se v barvě víčka (modrá resp. bílá) a v materiálu, do kterého jsou sliny nasáknuty (umělá celulóza resp. buničina). Salivety s modrými víčky jsou přímo určeny k odběru slin pro stanovení kortizolu, protože umělý materiál nemá kortizol pohlcovat. Právě jedním z cílů této práce bylo systémy porovnat. Inder a jeho spolupracovníci zjistili, že se při použití různých odběrových systémů stanovená hladina kortizolu liší, v některých případech až o 62 % [20]. Při porovnání modré a bílé salivety však bylo zjištěno, že hladiny slinného kortizolu se liší jen nepatrně, jak naznačuje graf (Obr. 4.1). V modré salivetě byla dokonce průměrná hladina kortizolu oproti bílé mírně snížena. Rozdíl mezi naměřenými výsledky ale není klinicky významný. Tato práce tedy nepotvrdila nezbytnost používání speciálních a tím tedy i dražších salivet pro stanovení kortizolu ve slinách, přesto je možné doporučit je zvláště pro pľnoční odběry, kde je předpokládána nízká hladina kortizolu, která by mohla být na hranici meze detekce používané metody.

Ve slinách lze vyšetřovat kromě kortizolu a ACTH i řadu steroidních hormonů, jako jsou aldosteron, testosteron, dehydroepiandrosteron a řada dalších. Z hormonů je ve slinách nejčastěji stanovovaný právě kortizol. Nejčastěji se sliny v běžné praxi využívají při orientačním vyšetření na přítomnost drog, zvláště při silničních kontrolách a kontrolách profesionálních řidičů.

5.2 Imunoanalytické vyšetřování

Hladiny slinného kortizolu se u pľnočních odběrů pohybují v nízkých hodnotách. Byla proto ověřena vhodnost analytického systému pro toto vyšetřování. Pro měření hladiny kortizolu byl využíván analytický systém ADVIA: Centaur od firmy Siemens. Mez detekce pro sérový a plazmatický kortizol uváděná výrobcem je 5,5 nmol/l. Kortizol, ale i další hormony se běžně vyšetřují imunoanalytickými metodami. Tento způsob se využívá kvůli vysoké citlivosti, rychlosti, jednoduchosti a hlavně kvůli menší finanční náročnosti na přístrojové vybavení. Jako referenční metoda se také využívá tandemová hmotnostní spektrometrie s izotopovou dilucí (IS LC/MS/MS). Tato specifická a citlivá metoda umožňuje screening kompletního profilu steroidních hormonů ze vzorku. Je využívána spíše pro experimentální účely než pro běžná stanovení v laboratořích nemocnic. Chromatografické metody v kombinaci s hmotnostní spektrometrií jsou finančně náročné, a proto je jejich zavádění do běžného provozu omezeno obvykle jen na fakultní a specializovaná pracoviště. Pro rutinní vyšetřování se stále používají metody imunoanalytické.

Pro potřeby stanovení slinného kortizolu v rámci této bakalářské práce bylo nutné ověřit co nejnižší mez stanovitelnosti ve slinách, tedy v materiálu, který má spíše vodnou než sérovou matici. Reprodukovatelnost byla stanovena pouze u dvou vzorků. Hodnota požadované reprodukovatelnosti bývá v klinické laboratoři

$CV (\%) = 20,0$ [30]. Tomuto kritériu vyhověl vzorek s průměrnou koncentrací $3,27 \text{ nmol/l}$ (Tab. 4.2). Mez stanovitelnosti se podařilo posunout na 3 nmol/l . Všechny hodnoty nižší než $3,0 \text{ nmol/l}$ jsou tedy označovány $< 3,0 \text{ nmol/l}$.

5.3 Srovnání séra a slin

V rámci experimentu bylo provedeno orientační srovnání hladiny slinného kortizolu se sérovým. Z literatury [31] je zřejmé, že kortizol se ve slinách vyskytuje pouze ve volné, biologicky aktivní formě, zatímco v séru je kortizol vázaný na transportní bílkoviny. Z tohoto důvodu není srovnání zcela přesné. I přes tuto malou nepřesnost experiment potvrdil, že hladina kortizolu ve slinách odráží hladinu kortizolu v séru. Tuto skutečnost zachycuje graf (Obr. 4.2). Experimentem prokázané tvrzení je shodné s tvrzením uvedeným v publikacích [23], [31], [32], [33]. Stejně jako uvádí literatura [23], [34], bylo výzkumem potvrzeno, že stanovení slinného kortizolu může nahradit stanovení kortizolu v séru.

Kortizol se stanovuje zásadně v séru, plazmě a moči a to jak nativní, tak sbírané za 24 hodin. Z těchto biologických materiálů je prováděno 99 % analýz. Sliny jsou pouze pomocný materiál ke stanovení, který je vhodný. Dalším možným biologickým materiálem, ze kterého lze kortizol stanovit, jsou vlasy [35], [36]. Prameny vlasů mohou být využívány ke sledování aktivity osy hypotalamus – hypofýza – kůra nadledvin jak u klinických pacientů, tak i u zvířat. Některé studie konstatují, že hladiny kortizolu v jednotlivých částech vlasů, které se liší vzdáleností od pokožky hlavy, jsou užívány jako „kalendář“, který mapuje aktivitu osy hypotalamus – hypofýza – kůra nadledvin uběhlou v předchozích fázích života před odběrem vzorku. Měření koncentrace kortizolu ve vlasech je také využíváno ke sledování chronického stresu.

Dalším možným, nestandardním, biologickým materiálem pro hodnocení koncentrace kortizolu v organismu může být stolice [36]. Tento způsob stanovení hladiny kortizolu se využívá převážně u divokých zvířat, která díky tomu nemusí být chycena a uspana, méně pak u zvířat domácích. Například u psů se preferuje stanovení kortizolu z chlupů, sloužící k diagnostice hyperkortizolizmu, nebo také stanovení slinného kortizolu [37]. Pro orientační srovnání bylo v rámci této práce provedeno stanovení slinného kortizolu u psa. Hladina kortizolu ve vzorku slin odebraného v 16.00 byla

6,7 nmol/l. Z této hodnoty se nedá usuzovat nic jiného, než že sliny jsou vhodný materiál k odběru i u psa a že pro měření této hladiny lze použít imunoanalytické soupravy určené k vyšetřování u lidí, stejně jako je tomu u mnoha dalších parametrů.

5.4 Stanovení referenčních intervalů

Referenční interval slouží k orientaci lékaře ve výsledcích pacienta. Každý výrobce imunoanalytických systémů doporučuje, aby referenční intervaly byly stanoveny každou laboratoří samostatně. Z důvodu finanční náročnosti není toto stanovení vždy možno provést. V rámci řešení grantu (IGA: NT 11 277 – 6, 2010 – 2015, GIGH – 1021 – 00 – 6 – 0203) bylo možné si referenční interval stanovit. K tomu bylo využito 95% intervalu ze souboru sledovaných osob. Sekrece kortizolu podléhá diurnálnímu rytmu [4]. Na základě tohoto faktu bylo nutno stanovit referenční intervaly ráno a odpoledne. Odběry probíhaly mezi 6.00 – 7.00 ráno a v rozmezí 16.00 – 17.00 hodiny. Probandi byli rozděleni na skupiny, a to na muže a ženy. Ženy byly dále rozděleny do dvou skupin. Na ženy, které užívají HAK a na ženy, které HAK neužívají. Rozdělení žen do dvou skupin bylo provedeno na základě literatury [38], která uvádí, že ženy užívající HAK mají zvýšenou hladinu sérového kortizolu. Hodnoty veškerých referenčních intervalů jsou uvedeny v tabulce 4.3.

Referenční interval pro ranní kortizol u skupiny žen bez HAK byl 13,2 – 55,5 nmol/l, zatímco u žen s HAK byl interval stanoven v rozmezí 15,5 – 44,2 nmol/l. Na základě těchto hodnot je zřejmé, že rozdíly v koncentracích slinného kortizolu u žen bez HAK a u žen s HAK nejsou natolik velké, aby pro další měření bylo nutno u žen uvádět, zda antikoncepci užívají nebo ne. Je tedy možné referenční intervaly pro obě skupiny žen spojit. Stejně tvrzení platí i pro hladiny naměřené v odpoledních hodinách. Odpolední hodnoty pro ženy bez HAK jsou v rozmezí 4,0 – 16,6 nmol/l a u žen s HAK byly odpolední intervaly v rozmezí 7,9 – 22,6 nmol/l. Z těchto intervalů je patrné, že užívání HAK nemá vliv na hladinu kortizolu ve slinách. Toto tvrzení je shodné s publikací [39], která mimo to také uvádí, že slinný kortizol může být využíván pro monitorování funkce nadledvin u žen, které HAK užívají. Ve slinách se vyskytuje pouze volný kortizol, který užíváním kontraceptiv není ovlivněn jako kortizol vázaný na transportní bílkoviny, který měříme v séru nebo plazmě.

U mužů byl stanoven interval ranního slinného kortizolu 15,8 – 47,7 nmol/l. Odpolední hodnoty se pohybovaly v rozmezí 5,2 – 25,4 nmol/l, které jsou oproti ranním hodnotám sníženy v důsledku cirkadiánního rytmu stejně, jako je tomu u odpoledních intervalů ve skupinách žen.

Při porovnání ranních hladin slinného kortizolu u skupiny žen bez HAK, žen s HAK a u mužů, nejsou rozdíly v referenčních intervalech téměř patrné. Stejně tomu je u referenčních intervalů stanovených z odpoledních vzorků slinného kortizolu. V důsledku toho je možné skupinu žen bez HAK, žen s HAK a mužů spojit v jeden sledovaný celek. Nutné je však zachovat různé referenční intervaly pro ranní a odpolední odběry. U takto vzniklého velkého souboru byl stanoven referenční interval pro ranní kortizol 14,3 – 46,2 nmol/l. Referenční interval pro odpolední kortizol byl 4,0 – 22,2 nmol/l. Referenční intervaly tohoto zkoumaného souboru jsou uvedeny v tabulce 4.4.

Referenční interval stanovený v rámci této práce se nepatrně liší od intervalu stanoveného Šimůnkovou a jejím týmem, který uvádí koncentrace ranního kortizolu 6 – 30 nmol/l, [40]. Odchyłka může být způsobena použitou metodou stanovení pro daný hormon, citovaná práce užívala stanovení kortizolu radioimunoanalýzou. Šimůnková et al. uvádí referenční interval 8,1 – 22,7 nmol/l, [39]. Neuvádí však, v jakou hodinu byly vzorky odebrány. Při porovnání referenčního intervalu s intervaly stanovenými tímto experimentem, by mohla být hladina kortizolu 8,1 – 22,7 nmol/l stanovena ze vzorků odebraných odpoledne. Tyto hodnoty jsou tedy téměř shodné s hodnotami pro odpolední slinný kortizol stanovenými v rámci této práce. Autoři Stone, Schwarz a kolektiv uvádí referenční interval 3 – 25 nmol/l, [4]. Stejně jako v předchozí publikaci není uveden čas odběru vzorků. Za předpokladu, že se jedná o odpolední slinný kortizol, je patrné, že se intervaly téměř shodují.

Hodnota referenčního intervalu pro ranní kortizol se od intervalu uváděného Aardalem a Holmem liší nepatrně [41]. Zdroj uvádí, že pro slinný kortizol odebraný v osm hodin ráno jsou typické referenční hodnoty 3,5 – 27,0 nmol/l. Hodnoty menší než 6 nmol/l jsou dle uvedeného zdroje typické pro slinný kortizol odebíraný v deset hodin večer. Tato hodnota se od stanoveného intervalu liší, neboť byl slinný kortizol odebíran v pozdějších hodinách oproti prováděnému experimentu. Většina prací se spíše zabývá stanovením referenčních intervalů pro ranní a noční kortizol. Noční slinný kortizol je v praxi více využitelný než odpolední a to pro diagnostiku CS. Referenční intervaly pro noční kortizol jsou dále popsány v kapitole profily.

5.5 Profily

Stanovení hladiny slinného kortizolu je nápomocné při odhalování CS. Ze studií [20], [32], [34], [42], [43] vyplývá, že stanovení kortizolu ve slinách se stalo nejvýznamnějším a nejvýhodnějším parametrem pro diagnostiku CS. Studie uvádí, že

citlivost a specifita tohoto stanovení je až 90% v porovnání s ostatními diagnostickými testy, jako jsou dexamethasonový supresní test, 24 hodinový sběr moči nebo stanovení sérového kortizolu.

Pro diagnostiku CS jsou významné hladiny pŕlnočního kortizolu, které mají být v tuto dobu u zdravých osob nejnižší, zatímco u CS kortizol neklesá. K potvrzení diurnálního rytmu, kterému kortizol podléhá, jak uvádí literatura, [34], [32], byl stanoven celodenní profil kortizolu u deseti, objektivně zdravých, osob. Jak je patrné z grafů (Obr. 4.4, 4.5, 4.6), průběh hladiny slinného kortizolu u těchto probandů opravdu cirkadiánnímu rytmu odpovídá. Odchytky nejsou patrné ani u pŕlnočních odběrů, které by mohly signalizovat přítomnost CS. Výjimkou byl pouze jeden dobrovolník, jehož profil byl atypický. Vyznačoval se nízkými hladinami kortizolu v průběhu celého dne. Cirkadiánní rytmus zde nebyl téměř patrný. Byl doporučen k vyšetření na endokrinologii.

Stanovit správně hladinu cut off pro pŕlnoční kortizol nebylo v této studii možné z důvodu malého počtu vzorků. Hodnota cut off se nejčastěji pohybuje kolem hodnoty 9 nmol/l v závislosti na použité metodě [42]. Přesto je možné konstatovat, že všechny pŕlnoční vzorky měly hladinu slinného kortizolu nižší než 9 nmol/l.

V rámci experimentu uvedeného v publikaci [44] bylo provedeno srovnání hladin nočního slinného kortizolu stanovených elektrochemiluminiscencí (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) a IS LC/MS/MS. Průměrná koncentrace slinného kortizolu stanovená imunoanalyticky byla 4,4 nmol/l. Hodnota 1,8 nmol/l odpovídala průměrné koncentraci slinného kortizolu, která byla naměřena IS LC/MS/MS. Variační koeficient byl při srovnání těchto dvou metod 11,6 – 40,4 %.

Pomocí IS LC/MS/MS je tedy možné stanovit nižší koncentrace vzorků. Pro imunoanalýzu Roche byla nalezena hladina cut off 8,9 nmol/l. Ani od této hodnoty se nijak neodlišují hladiny nočního slinného kortizolu stanovené v rámci této bakalářské práce.

6 Závěr

Hlavním tématem této bakalářské práce bylo stanovení kortizolu ve slinách. Imunoanalytický systém ADVIA: Centaur od firmy Siemens určený k běžnému stanovení kortizolu v séru, plazmě a moči byl shledán i jako vhodný pro stanovení vzorků slinného kortizolu a to i vzorků menšího objemu. Vyšetřené hladiny slinného kortizolu v ranních a odpoledních hodinách u skupiny žen neužívající HAK, u žen užívajících HAK a u mužů umožnily stanovení referenčních intervalů u těchto jednotlivých skupin.

Vzhledem k podobnosti obou ranních a odpoledních skupin byl zvolen jednotný referenční interval pro muže i ženy, a to pro ranní kortizol 14,3 – 46,2 nmol/l a pro odpolední slinný kortizol byl referenční interval 4,0 – 22,2 nmol/l.

Při stanovení denního profilu kortizolu u 10 dobrovolníků bylo zjištěno, že hladiny slinného kortizolu v jednotlivých částech dne odpovídají očekávanému cirkadiánnímu rytmu kortizolu.

Dva porovnané systémy Salivette od firmy Sarstedt nevykazovaly podstatný rozdíl v naměřených hladinách slinného kortizolu a je možné pro toto stanovení využít oba typy salivet.

Z dosažených výsledků vyplývá, že místo invazivního odběru krve pro účel stanovení sérového kortizolu, lze použít v některých případech stanovení slinného kortizolu, neboť hladiny v séru a slinách spolu poměrně dobře korelují.

Mezi neoddiskutovatelné výhody stanovení kortizolu ve slinách patří samotný odběr vzorku, který je neinvazivní. Pacient není nijak zatěžovaný. Odběr se tak stává vhodným zvláště u dětí nebo psychiatrických pacientů. Volný kortizol může být stanoven bez předchozí úpravy vzorku. Je možné provádět jednorázové stanovení, ale může být vícekrát opakováno během dne nebo noci. Při nočních odběrech jsou tak eliminovány stresory z odběru.

Literatura

- [1] Ganog, W. F.; *Přehled lékařské fyziologie*. 20. přeprac. vyd. Praha, Galén 2005.
- [2] Trojan, S.: *Lékařská fyziologie*. 4. přeprac. vyd. Praha, Grada Publishing a. s. 2003.
- [3] Ledvina, M.; Stoklasová, A.; Cerman, J.: *Biochemie pro studující medicíny II*. Praha, Karolinum 2009.
- [4] Stone, A. A.; Schwartz, J. E.; Smyth, J.; Kirschbaum, C.; Cohen, S.; Hellhammer, D.; Grossman, S.: Individual differences in the diurnal cycle of salivary free cortisol: a replication of flattened cycles for some individuals. *Psychoneuroendocrinology* **26**, 295–306 (2001).
- [5] Kordač, V.: *Vnitřní lékařství III*. Praha, Avicenum 1989.
- [6] Wallace, I.; Cunningham, S.; Lindsay, J.: The diagnosis and investigation of adrenal insufficiency in adults. *Annals of clinical biochemistry* **46**:5, 351–367 (2009).
- [7] Ledvina, M.; Stoklasová, A.; Cerman, J.: *Biochemie pro studující medicíny I*. Praha, Karolinum 2009.
- [8] Talabér, G.; Jondal, M.; Okret, S.: Extra-adrenal glucocorticoid synthesis: Immunoregulation and aspects on local organ homeostasis. *Molecular and cellular endocrinology*, (2005).
- [9] Veldhuis, J. D.; Iranmanesh, A.; Naftolowitz, D.; Tatham, N.; Cassidy, F.; Carroll, B. J.: Corticotropin secretory dynamics in humans under low glucocorticoid feedback. *The journal of clinical endocrinology and metabolism* **86**:11, 5554–5563 (2001).
- [10] Illnerová, H.; Sumová, A.: Vnitřní časový systém. *Medicína pro praxi* **8**:9, 374–378 (2011).

- [11] Silbernagl, S.; Despopulos. A: Atlas fyziologie člověka. 6. přeprac. vyd. Praha, Grada Publishing a. s. 2004
- [12] Arlt, W.; Stewart, P. M.: Adrenal corticosteroid biosynthesis, metabolism and action. *Endocrinology and Metabolism clinics of North America* **34**, 293–313 (2005).
- [13] Carpenter, G. H.: The secretion, components, and properties of saliva. *Annual review of food science and technology* **4**, 267–276 (2013).
- [14] Kittnar, O.: *Lékařská fyziologie*. Praha, Grada Publishing a. s. 2011.
- [15] Zima, T.: *Laboratorní diagnostika*. 2. přeprac. vyd. Praha, Galén, Karolinum 2007.
- [16] Ďurovcová, V.; Kršek, M.: Cushingův syndrom—charakteristika, diagnostika a léčba. *Medicína pro praxi* **6**:6, 295–299 (2009).
- [17] Sarkar, S. B.; Sarkar, S.; Ghosh, S.; Bandyopadhyay, S.: Addison's disease. *Contemporary Dentistry* **3**:4, 484–486 (2012).
- [18] Michels, A. V.; Eisenbarth, G. S.; Immunologic endocrine disorders. *Journal of allergy and clinical immunology* **125**, 226–237 (2010).
- [19] Chakera, A. J.; Vaidya, B.: Addison disease in adults: diagnosis and management. *The American journal of medicine* **123**:5, 409–413 (2010).
- [20] Inder, W. J.; Dimeski, G.; Russell, A.: Measurement of salivary cortisol in 2012—laboratory techniques and clinical indications. *Clinical endocrinology* **77**, 645–651 (2012).
- [21] Gröschl, M.: Current Status of Salivary Hormone Analysis. *Clinical chemistry* **54**:11, 1759–1769 (2008).
- [22] Sakihara, S.; Kageyama, K.; Oki, Y.; Doi, M.; Iwasaki, Y.; Takayasu, S.; Moriyama, T.; Terui, K.; Nigawara, T.; Hirata, Y.; Hashimoto, K.; Suda, T.: Evaluation of plasma, salivary, and urinary cortisol levels for diagnosis of Cushing's syndrome. *Endocrine Journal* **57**:4, 331–337 (2010).
- [23] Perogarnvros, I.; Keevil, B. G.; Ray, D. V.; Trainer, P. V.: Salivary cortisone is a potential biomarker for serum free cortisol. *The journal of clinical endocrinology and metabolism* **95**:11, 4951–4958 (2010).

- [24] <<http://sarstedt.com/product-pics/133/3.jpg>> [cit. 9. 7. 2013]
- [25] Koivunen, M. E.; Krogsrud, R. L.: Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. *Labmedicine* **37**:8, (2006).
- [26] Šterm, P.: *Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia*. 2. přeprac. vyd. Praha, Karolinum 2011.
- [27] <<http://www.healthcare.siemens.com/immunoassay/systems/advia-centaur-xp>> [cit. 4. 7. 2013]
- [28] <<http://www.sarstedt.com/katalog/en-us/index.html#/50/>> [cit. 4. 7. 2013]
- [29] Viardot, A.; Huber, P.; Jardená, J.; Puder, J.; Zulewski, H.; Keller, U.; Müller, B.: Reproducibility of night time salivary cortisol and its use in the diagnosis of hypercortisolism compared with urinary free cortisol and overnight dexamethasone suppression test. *The journal of clinical endocrinology & metabolism* **90**:10, 5730–5736 (2005).
- [30] Friedecký, B.; Šprongl, L.; Kratochvíl, J.; Plzák, Z.: Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích. *Klinická biochemie a metabolismus* **19**:40, 36–44 (2011).
- [31] Perogamvros, I.; Ray, D. W.; Trainer, P. J.: Regulation of cortisol bioavailability—effects on hormone measurement and action. *Nature reviews, advance online publication*.
- [32] Raff, H.; Trivedi, H.: Circadian rhythm of salivary cortisol, plasma cortisol, and plasma ACTH in edn-stage renal disease. *Endocrine connections* **1**, 134–142 (2013).
- [33] Dorn, L. D.; Lucke, J. F.; Loucks, T. L.; Berga, S. L.: Salivary cortisol reflects serum cortisol: analysis of circadian profiles. *Annals of clinical biochemistry* **44**, 281–284 (2007).
- [34] Wood, P.: Salivary steroid assays—research or routine?. *Annual clinical biochemistry* **46**, 183–196 (2009).
- [35] Meyer, J. S.; Novak, M. A.: Minireview: Hair cortisol: a novel biomarker of hypothalamic–pituitary–adrenocortical activity. *Endocrinology* **153**:9, 4120–4127 (2012).

- [36] Bryan, H. M.; Adams, A. G.; Invik, R. M.; Wynne-Edwards K. E.; Smits J. E.: Hair as a meaningful measure of baseline cortisol levels over time in dogs. *Journal of the american association for laboratory animal science* **52**:2, 189–196 (2013).
- [37] Ouschan, C.; Kuchar, A.; Möstl, A.: Measurement of cortisol in dog hair: a noninvasive tool for the diagnosis of hypercortisolism. *Veterinary dermatology* **24**:4, 428–494 (2013).
- [38] Boisseau, N.; Enea, C.; Diaz, V.; Dugué, B.; Corcuff, J. B.; Duclos, M.: Oral contraception but not menstrual cycle phase is associated with increased free cortisol levels and low HPA axis reactivity. *Journal of endocrinology investigation*, (2013).
- [39] Simunkova, K.; Starka, L.; Hill, M.; Kríz, L.; Hampl, R.; Vondra, K.: Comparison of total and salivary cortisol in low-dose ACTH (Synacthen) test: influence of three-month oral contraceptives administration to healthy women. *Physiological research / academia scientiarum* **57**, 193–199 (2008).
- [40] Šimůnková, K.; Stárka, L.; Dušková, M.; Hill, M.; Hampl, R.; Vondra, K.: Současné možnosti využití stanovení steroidních hormonů ve slinách. *DMEV* **12**:3, (2009).
- [41] Aardal, E.; Holm, A. C.: Cortisol in saliva—reference ranges and relation to cortisol in serum. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry: journal of the forum of european clinical chemistry societies* **33**:12, 927–932 (1995).
- [42] Putignano, P.; Toja, P.; Dubini, A.; Pecori, G. F.; Corsello, S. M.; Cavagnini, F.: Midnight salivary cortisol versus urinary free and midnight serum cortisol as screening tests for Cushing’s syndrome. *The journal of clinical endocrinology and metabolism* **88**:9, 4153–4157 (2003).
- [43] Kutsukake, N.; Ikeda, K.; Honma, S.; Teramoto, M.; Mori, Y.; Hayasaka, I.; Yamamoto, R.; Ishida, T.; Yoshikawa, Y.; Hasegawa, T.: Validation of salivary cortisol and testosterone assays in chimpanzees by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *American journal of primatology* **71**:8, 696–706 (2009).

- [44] Vogeser, M.; Durner, J.; Seliger, E.; Auernhamme, C.: Measurement of late-night salivary cortisol with automated immunoassay system. *Clinical chemistry and laboratory medicine: CCLM / FESCC* **44**:12, 1441–1445 (2006).