

HODNOTENIE PRACOVNO-PSYCHICKEJ ZÁŤAŽE SLINNÝMI BIOMARKERMI – METODOLOGICKÉ ASPEKTY

EVALUATION OF MENTAL LOAD WITH USE OF SALIVARY BIOMARKERS – THE METHODOLOGICAL ASPECTS

OLGA ŠUŠOLIAKOVÁ, MARKÉTA PAPRŠTEINOVÁ, DANA POTUŽNÍKOVÁ,
JINDRA ŠMEJKALOVÁ

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Ústav hygieny a preventivního lékařství

SOUHRN

Veľký počet profesií sa viaže s množstvom zdravotných rizík. Väčšina populácie pracuje v nadmernej pracovnej psychickej a senzorickej záťaž. Psychická záťaž je faktor, ktorý sa spája s ovplyvňovaním zdravia a spokojnosti, a celkovej kvality života. Mnohé štúdie a výskumy sa v objektivizácii stresu, alebo zvýšenej odpovede na stres v čoraz väčšej miere opierajú o metódu analýzy v slinách, tzv. slinné biomarkery. Tieto biomarkery sú používané nielen pri analýze stresu ako psychosociálneho faktora, ale i v pracovnom lekárstve a v životnom prostredí.

Kľúčová slova: stres, stresové markery, sliny, metódy zberu

SUMMARY

Many professions are linked with occupational health risks. The majority of the population works under conditions of occupational, sensory and mental stress. Psychological stress is a factor that affects health, personal satisfaction, and overall quality of life. Many studies and research in the objectification of stress, or increased response to stress are increasingly based on the method of analysis in saliva, so-called salivary biomarkers. These biomarkers are used not only for the analysis of psychosocial stress as a factor, but also in occupational medicine and the environment.

Key words: stress, stress markers, saliva collection methods

Úvod

Stres je druhým najčastejšie udávaným problémom súvisiacim s prácou, ktorý postihol 22 % zamestnancov v EÚ. Označuje sa aj za tzv. módný rizikový faktor. Počet osôb trpiacich stresujúcimi podmienkami, ktoré zapríčinila alebo zhoršila práca, bude s najväčšou pravdepodobnosťou rásť. Postihuje približne jedného zo štyroch pracovníkov a zo štúdií vyplýva, že s ním súvisí 50 až 60 % všetkých vymieškaných pracovných dní (21).

V rámci hodnotenia pracovno psychickej záťaže sa v oblasti ochrany verejného zdravia používajú mnohé metodiky, ako napr. metódy založené na subjektívnej odozve organizmu, psychologické výkonové testy, psychofyziologické testy a biochemické testy.

Avšak je snaha objektivizovať stres aj za pomoci biochemickej analýzy slín. Sliny ako biologický materiál sa stávajú vhodným diagnostickým a prognostickým markerom a bežnou rutinou záležitosťou. Stávajú sa viac skúmané medicínou, farmakológiou, zubným lekárstvom a v čoraz väčšej miere aj molekulárnou diagnostikou, pracovným lekárstvom, psychobiológiou. Takisto sú obrazom neuroendokrinného a imunologického statusu

organizmu. Autonómny nervový systém reguluje proces slinenia a koncentrácie ostatných slinných komponentov, ako napr. α -amylázy, a tým umožňuje meranie akútnej stresovej odpovede (7). Túto skutočnosť potvrdzuje aj americká spoločnosť Salimetrics, ktorá sa zaoberá výskumom v slinách. Upozorňuje, že každý, kto uvažuje o takomto type analýzy, si musí byť vedomý dôležitých a správnych zaobchádzaní v procese zberu, aby sa zabezpečilo získanie čo najviac kvalitných dát.

Stres

Keď je človek vystavený akémukoľvek z veľkého množstva škodlivých, alebo potenciálne škodlivých vplyvov, zvyšuje sa sekrécia ACTH a následkom toho sa zvýši aj hladina glukokortikoidov. Selye pomenoval tieto škodlivé vplyvy ako „stresory“ a dnes je moderné tieto všetky podnety nazvať pojmom „stres“ (4). Rozlišujeme dve základné neuroendokrinné zložky stresovej reakcie, hoci aktivácia oboch z nich nemusí byť prítomná v každej stresovej reakcii. Prvou zložkou je aktivita hypotalamo-hypofýzo-adrenokortikálnej (HHA) osi.

Jej efektorovou časťou je vylučovanie nadobličkových glukokortikoidov, u človeka predovšetkým kortizolu (3). Druhou zložkou je aktivácia sympatiko-adrenomedulárneho systému sprevádzaná zvýšenou sekréciou katecholamínov.

Zo psychologického hľadiska sú stres a záťažová situácia momenty, ktoré často vyvolávajú súbor závažných procesov, ktoré obecné nazývame psychosociálny stres. Pre definíciu stresovej situácie je podstatný pomer medzi mierou (intenzitou, veľkosťou, tlakom apod.) stresogénnej situácie (stresora či stresorov) a silou (schopnosťami, možnosťami organizmu apod.) danú situáciu zvládnuť. Hovoríme o nej v prípade, že miera intenzity stresogénnej situácie je vyššia než schopnosť či možnosť daného človeka túto situáciu zvládnuť. Nadlimitná záťaž je celá stresogénna situácia. Môže byť len jeden stresor, alebo súhra niekoľko stresorov (12).

Pracovný stres

Podľa Európskej agentúry pre bezpečnosť a ochranu zdravia pri práci nastáva pracovný stres vtedy, keď ľudia pociťujú nerovnováhu medzi požiadavkami, ktoré sa na nich kladú, a prostriedkami, ktoré majú k dispozícii na zvládnutie týchto požiadaviek. Každý človek reaguje na rovnaké podmienky inak. Niektorí ľudia sa dokážu lepšie vyrovnat' s náročnými požiadavkami než iní ľudia. Dôležité je, ako jednotlivec sám posudzuje situáciu, v ktorej sa nachádza. Zo samotnej situácie nie je možné stanoviť úroveň stresu, ktorú môže vyvolať.

K spoločným faktorom v prípade pracovného stresu patria chýbajúca kontrola nad prácou, nevhodné požiadavky na zamestnancov a chýbajúca podpora zo strany kolegov a vedenia. Krátkodobý stres obvykle nie je problémom, pretože niektorým ľuďom môže vlastne pomáhať v maximálnom využívaní ich schopností. Stres sa stáva rizikovým faktorom pre bezpečnosť a zdravie, keď je dlhodobý (22).

Delenie symptómov pracovného stresu

Prežívanie stresu môže zmeniť spôsob cítenia, myslenia a správania postihnutej osoby. Základné symptómy pracovného stresu sa delia podľa toho, na akej úrovni vznikajú. Rozlišujeme vznik na organizačnej úrovni a na úrovni jednotlivca. Medzi symptómy na organizačnej úrovni patria absentérstvo, vysoká fluktuácia, nedodržovanie termínov, problémy s disciplínou, obťažovanie, znížená produktivita, úrazy, chyby a zvýšené náklady v dôsledku vyplácania náhrad alebo zdravotnej starostlivosti.

Na úrovni jednotlivca sa rozlišuje viacero typov reakcií. Medzi najčastejšie radíme emočné reakcie (podráždenosť, úzkosť, problémy so spánkom, depresia, hypochondria, odcudzenie, syndróm „vyhorenia“, problémy v rodinných vzťahoch), kognitívne reakcie (ťažkosti s koncentráciou, pamätaním si a učením sa nových vecí, rozhodovaním), behaviorálne reakcie (zneužívanie drog, alkoholu a tabaku, deštruktívne správanie) a fyziologické reakcie (problémy s chrbticou, oslabená imunita, žalúdočné vredy, kardiologické problémy, hypertenzia) (22).

Pracovný stres a slinné biomarkery

Podľa najnovších výskumov sa ukazuje, že pracovný stres dobre koreluje s niekoľkými slinnými biomarkermi. Výber markerov na hodnotenie pracovnej záťaže závisí od typu sledovaného stresu.

Medzi základné ukazatele, ktoré často spájame so stresom a stresovou odpoveďou, radíme: kortizol v rámci chronického stresu, α -amylázu a chromogranín A pri akútnom strese. Značnú úlohu tu hrá aj imunitný systém, ktorého reakciu môžeme monitorovať analýzou slinného IgA a lyzozómu. Vzhľadom k tomu, že z výskumných dôvodov sa najčastejšie využíva stanovenie kortizolu a α -amylázy, je potrebné pripomenúť si ich fyziológiu.

Fyziológia kortizolu a alfa amylázy

Kortizol je hormón kôry nadobličiek steroidnej povahy zo skupiny glukokortikoidov (prevažuje účinok na metabolizmus glukózy a proteínov). V krvi je v 90 % viazaný na transkortín (= cortisol-binding globulin, CBG), 7 % na albumín. Táto viazaná forma je však biologicky neaktívna. Len 3 % kortizolu v krvi je vo voľnej, biologicky aktívnej forme. Jeho sekrécia je riadená cestou „hypotalamus → hypofýza (ACTH) → kôra nadobličiek (zóna fasciculata)“ (1).

Hlavné účinky kortizolu možno rozdeliť do 3 kategórií. Dôležitým účinkom je pôsobenie kortizolu na intermediárny metabolizmus (zvyšovanie glukoneogenézy, zníženie vychytávania glukózy vo svaloch a v tuku, zvýšenie tvorby glykogénu – závisí na prítomnosti inzulínu, zvýšenie lipolýzy v tukovom tkanive – uvoľnenie mastných kyselín a glycerolu). Proteokatabolické účinky kortizolu spočívajú v inhibícii v niektorých tkanivách, najmä v spojivovom. Inhibuje tvorbu proteínov, čím sa zrýchľuje ich rozpad.

V imunitnom systéme znižuje počet eozinofilných leukocytov a takisto znižuje rezistenciu voči infekciám. Protizápalové účinky spočívajú najmä v liečbe špecifických zápalov – napr. reumatoidná artritída, alergické prejavy (17).

Uloha kortizolu pri rozvoji stresovej reakcie spočíva vo zvyšovaní glykémie (dostatok glukózy pre nervové bunky, ich aktivita počas stresu stúpa) a v zosilnení účinku katecholamínov (aktivujú krvný obeh a uvoľňujú energetické zásoby, mastné kyseliny z tukového tkaniva, glukózu z glykogénu) (13).

Vylučovanie kortizolu podlieha cirkadiánnemu rytmu, ktorý sleduje cirkadiánnny rytmus ACTH z hypofýzy – maximálnych koncentrácií celkového kortizolu v krvi dosahuje okolo 8. hodiny ránej, minimum okolo polnoci. Večerná koncentrácia je asi polovičná v porovnaní s rannou špičkou (1).

Klinicky sa využíva pri diferenciálnej diagnostike hypo/hyperkortilizmu, porúch kôry nadobličiek a porúch osi hypotalamus → hypofýza (ACTH) → kôra nadobličiek (glukokortikoidy).

Stanovenie kortizolu sa využíva pri podozrení na Cushingov syndróm rôznej etiológie, a to zvlášť u pacientov so zmenenými koncentraciami transkortínu (napr. obézni jedinci, tehotné ženy, ženy na hormonálnej liečbe estrogénmi, ženy užívajúce hormonálnu antikoncepciu,

pacienti s hypertyreózou, mentálnou anorexiou, mnohopočetným myelómom, nefrotickým syndrómom) (1).

Alfa amyláza

Alfa amyláza (alfa-1,4glukan-4-glukan-hydroláza) sa v organizme vyskytuje v 2 formách:

- slinná (S-typ, S-AMS),
- pankreatická (P-typ, P-AMS).

Pankreatická amyláza je tvorená v acinárnych bunkách pankreasu a hromadí sa v zymogénnych granulách. Do črevného lúmenu sa dostáva vo forme pankreatického sekrétu (pankreatickej šťavy) spolu s ďalšími tráviacimi enzýmami (11). Okrem slinných žliaz sa slinná izoamyláza tvorí vo vajcovodoch, slzách, mlieku a pote. Molekulová hmotnosť amylázy je 55 000. Kompletný metabolizmus amylázy nie je celkom objasnený, predovšetkým rola pri pečevných funkciách; pri nekróze a cirhóze pečene je rovnako zvýšená (6). Štúdie dokazujú, že α -amyláza významne koreluje s akútnou stresovou odpoveďou. Najnižšia úroveň je v ranných hodinách a najvyššia v popoludňajších hodinách, čo je rozdiel oproti kortizolu a IgA (14, 15). Zvýšená α -amyláza je taktiež indikátorom pre celú radu ochorení. Najčastejšie je preukázateľná pri diagnostike akútnej pankreatitídy, ochorení GIT-u, slinných žliaz, gynekologických ochoreniach, možná je aj diabetická príčina (6).

Stanovenie slinných biomarkerov

Účinok slín na obsah analyzovaného markera

Sliny nie sú jednoduchou tekutinou s konzistentným zložením. Každá z hlavných a vedľajších slinných žliaz ma inú bunkovú stavbu, a preto tam môžu byť určité rozdiely v zložení každej oblasti tvorby slín (2, 18).

Stanovenie koncentrácií v slinách sa ukazuje ako vhodné pre hodnotenia širokého spektra ukazovateľov, ako sú napr. hormóny, toxíny a ich metabolity (napr. kotinín), imunoglobulíny (IgA), zápalové cytokíny (IL-1 α , IL-6, TNF α), TH1 cytokíny (IL-2, α -IFN, IL-12) a TH2 cytokíny (IL-4) a ostatné proteíny a DNA (19).

Výskumníci sa vo veľkej miere zaujímajú aj o štúdium proteomových komponentov slín s prianím nájdenia a identifikácie neobvyklých markerov (7).

Mnoho steroidných hormónov sa uvoľňuje do krvného riečiska v menších dávkach. Takisto väčšina steroidov ľahko prechádza difúziou do slín, a to sa odráža pomerne rýchlo na ich koncentracii v slinách. Úroveň steroidov a ostatných analytov v slinách, ako napr. α -amylázy, sú závislé na cirkadiánnom rytme. Avšak, hodnoty niektorých slinných analytov sú ovplyvnené stresom alebo iným stimulom. Je to dôležité hlavne pri porozumení základnej fyziológie, aby sme mohli čo najlepšie rozvíjať stratégiu pre odber vzoriek.

Výhody a nevýhody stanovovania v slinách

Medzi najčastejšie používané slinné biomarkery vo výskume stresu patria hormóny – slinný kortizol, enzýmy – slinná α -amyláza a chromogranín A, imunitné zložky – IgA a lyzozóm.

Výhody stanovenia:

- hladina voľného kortizolu v slinách koreluje s hladinami kortizolu v krvi,
- hladina voľného kortizolu je nezávislá na slinotoku,
- jednoduchý a neinvazívny odber, hlavne u detí a neľudných pacientov,
- odpadnutie stresového faktora venepunkcie,
- možný odber v domácom prostredí,
- odber možno urobiť v ktorúkoľvek hodinu – možné opakovanie počas dňa,
- možná dlhšia doba skladovania až 5 dní pri 2–5 °C – možnosť zabránenia zmeny koncentrácie spôsobené baktériami ústnej dutiny (po centrifugácii je možné pri teplote –20 °C až –80 °C skladovať vzorky aj do 1 roka),
- nie je potreba predúprava vzorky, ako napr. pri moči,
- oproti krvi menšia pravdepodobnosť prenosu infekcie.

Nevýhody stanovenia:

- absorpcia hormónov na odberový materiál,
- vplyv odberového materiálu na koncentráciu analyzovanej vzorky,
- nedodržiavanie presného času odberu,
- pacientova nespokojnosť,
- nedostupnosť referenčných hodnôt vo vzťahu ku pohlaviu, veku pacienta,
- chýbajúca ustálenosť metodiky (16, 20).

Metodológia stanovenia

Aby sa predišlo kontaminácii znečisťujúcimi látkami, a takisto možného skreslenia v imunoanalýze, doporučuje sa dodržiavať nasledujúce opatrenia pre účastníkov výskumu:

- 12 hodín pred odberom vyhýbať sa alkoholu, fajčeniu,
- vyvarovať sa potravinám s vysokým obsahom cukru alebo kyslosti, mliečnym výrobkom, vysokému obsahu kofeínu, a to bezprostredne pred odberom vzorky,
- nejest' hlavné jedlo do 60 minút od odberu vzorky,
- vypláchnuť ústa vodou k odstráneniu zvyškov jedla pred vzorkou a prehltnúť pre zvýšenie hydratácie,
- počkať aspoň 10 minút po opláchnutí na zhromaždenie slín, aby sa zabránilo riedeniu vzorky,
- je veľmi dôležité oddychovať, neprevádzkať náročné športové cvičenia a športové výkony, vyhýbať sa rozrušeniu.

Je vhodné, aby sa vypracoval dokument času odberov, konzumácie alkoholu, kofeínu, nikotínu a liekov pre kontrolu dodržiavania týchto opatrení (5, 9). Víta sa, aby bola zdokumentovaná aj fyzická aktivita a choroby ústnej dutiny – možná kontaminácia krvou (8, 10).

Metódy pre odber slín podľa analyzovaného markera

Výber metódy a zariadenia pre zber bude závisieť na výbere analyzovaného markera a veku účastníkov výskumu.

Sú k dispozícii nasledujúce možnosti a metodiky pre zbieranie slín, ktoré sú rozdelené do 2 skupín, a to:

- kojenci a deti do 6 rokov – Sorbety a bavlnené lanko,
- deti od 6 rokov a staršie a dospelí – pasívne slintanie, ústny vatový tampón.

V nasledujúcej kapitole sa budeme bližšie zmieňovať o metodikách pre dospelých.

Je to veľmi rentabilná metóda, ktorá je respondentmi akceptovaná a veľmi často používaná. Ide o zber celých slín pasívnym slintaním do malej skúmavky. Metóda pasívneho slintania je vysoko doporučená, pretože je schválená pre použitie s takmer so všetkými analytami, na rozdiel od absorbčného zariadenia, ktoré môže spôsobiť zásah do imunoanalýzy.

Vždy je potrebné poučiť účastníkov výskumu, aby sliny hromadili v ústach. Pre lepšiu tvorbu slín sa osvedčujú užitočné spôsoby – napr. predstavenie si svojho obľúbeného jedla. Hlavu nakloniť dopredu, účastník by mal slintat' do slamky a zbierať sliny do skúmavky (je normálne, keď sú sliny ako pena, takže doporučuje sa použiť skúmavku s 2-násobnou kapacitou objemu vzorky). Opakuje sa tak často, pokiaľ je to potrebné do dostatočnej vzorky. Jeden ml (bez peny) je primeraný pre viacero testov. Zbieranie vzoriek k analýze na viac než 1 analyt môže vyžadovať väčšie skúmavky.

Ústne tampóny

Niektorí účastníci nie sú ochotní, alebo schopní slintat' do skúmavky. Ak sú tieto vzorky analyzované na kortizol, testosterón, α -amylázu, kotinín, C-reaktívny proteín, alebo SIgA, ústny tampón je vynikajúca alternatíva pre jeho jednoduché použitie. Je vyrobený z netoxického inertného polyméru tvarovaného do 30x10 mm válčeka. Nie je to však vhodné pre deti kvôli možnosti udusení. Najčastejšími doporučenými miestami sú odbory spod jazyka a medzi lícom a ďasnom (v blízkosti 2. hornej stoličky). Avšak umiestnenie sa môže líšiť v závislosti od zamerania výskumu. Doporučenia pre odber sú rovnaké.

Záver

Výšetrenie slinných biomarkerov ponúka nový prístup v praxi ochrany verejného zdravia populácie. V súčasnej dobe začínajú mať uplatnenie v posúdení pracovného stresu, hlavne pomocou kortizolu a α -amylázy. Je však dôležité dostať túto možnosť do povedomia a porozumieť biologickému významu.

Podakovanie

Práca vznikla za podpory Vnitřního grantu LF UK č. 84123.

LITERATÚRA

1. Bálková O. Kortizol, ACTH [online]. Roche s. r. o., Diagnostics Division; 2001 [cit. 2010-10-09]. Dostupný z: http://www.roche-diagnostics.cz/download/prolekare/kortizol_prezentace_web_June08.pdf.
2. Crawford JM, Taubman MA, Smith DJ. Minor salivary glands as a major source of secretory immunoglobulin A in the human oral cavity. Science. 1975 Dec 19;190(4220):1206-9.
3. de Kloet ER. Hormones, brain and stress. Endocr Regul. 2003 Jun;37(2):51-68.
4. Ganong FW. Přehled lékařské fyziologie. Praha: Galén; 2005.
5. Granger DA, Blair C, Willoughby M, Kivlighan KT, Hibell LC, Fortunato CK; Family Life Project Investigators, et al. Individual differences in salivary cortisol and alpha-amylase

in mothers and their infants: relation to tobacco smoke exposure. Dev Psychobiol. 2007 Nov;49(7):692-701.

6. Hashimoto N, Haji S, Nomura H, Ohyanagi H. Hyperamylasemia after hepatic resection. Hepatogastroenterology. 2003 Sep-Oct;50(53):1472-3.
7. Hellhammer DH, Wüst S, Kudielka BM. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. Psychoneuroendocrinology. 2009 Feb;34(2):163-71.
8. Henskens YM, van den Keijbus PA, Veerman EC, Van der Weijden GA, Timmerman MF, Snoek CM, et al. Protein composition of whole and parotid saliva in healthy and periodontitis subjects. Determination of cystatins, albumin, amylase and IgA. J Periodontol Res. 1996 Jan;31(1):57-65.
9. Hibell LC, Granger DA, Kivlighan KT, Blair C. Individual differences in salivary cortisol: associations with common over-the-counter and prescription medication status in infants and their mothers. Horm Behav. 2006 Aug;50(2):293-300.
10. Kivlighan KT, Granger DA. Salivary alpha-amylase response to competition: relation to gender, previous experience, and attitudes. Psychoneuroendocrinology. 2006 Jul;31(6):703-14.
11. Kocna P. Biochemická diagnostika v gastroenterologii. In: Schneiderka P, a kol. Kapitoly z klinické biochemie. 2. vyd. Praha: Karolinum; 2004. s. 131-57.
12. Křivohlavý J. Psychologie zdraví. Praha: Portál; 2001.
13. Merkunová A, Orel M. Anatomie a fyziologie člověka pro humanitní obory. Praha: Grada; 2008.
14. Li TL, Gleeson M. The effect of single and repeated bouts of prolonged cycling and circadian variation on saliva flow rate, immunoglobulin A and alpha-amylase responses. J Sports Sci. 2004 Nov-Dec;22(11-12):1015-24.
15. Rohleder N, Nater UM, Wolf JM, Ehler U, Kirschbaum C. Psychosocial stress-induced activation of salivary alpha-amylase: an indicator of sympathetic activity? Ann N Y Acad Sci. 2004 Dec;1032:258-63.
16. Šimůnková K, Stárka L, Dušková M, Hill M, Vondra K. Hormony ve slinách: metodické předpoklady [online]. DMEV 2009;12(3):149-53 [cit. 2010-10-09]. Dostupný z: http://www.tigis.cz/images/stories/DMEV/2009/03/08_simunkova_dmev_3-09.pdf.
17. Trojan S. Lékařská fyziologie. Praha: Grada; 2003.
18. Veerman EC, van den Keybus PA, Vissink A, Nieuw Amerongen AV. Human glandular salivas: their separate collection and analysis. Eur J Oral Sci. 1996 Aug;104(4 (Pt 1)):346-52.
19. Vitorino R, Lobo MJ, Ferrer-Correia AJ, Dubin JR, Tomer KB, Domingues PM, et al. Identification of human whole saliva protein components using proteomics. Proteomics. 2004 Apr;4(4):1109-15.
20. Wood P. Salivary steroid assays - research or routine? Ann Clin Biochem. 2009 May;46(Pt 3):183-96.
21. Európska agentúra pre bezpečnosť a ochranu zdravia pri práci. Stres [online]. Košice: Národný inšpektorát práce; 2010. [cit. 2011-02-17]. Dostupný z: http://osha.europa.eu/sk/topics/stress/index_html.
22. Európska agentúra pre bezpečnosť a ochranu zdravia pri práci. Stres – definícia a symptómy [online]. Košice: Národný inšpektorát práce; 2010. [cit. 2011-02-17]. Dostupný z: http://osha.europa.eu/sk/topics/stress/index_html/definitions_and_causes.

Došlo do redakcie: 16. 3. 2011

Přijato k tisku: 20. 6. 2011

Mgr. Olga Šušoliová
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Ústav hygieny a preventivního lékařství
Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové
E-mail: susolia@lfhk.cuni.cz