

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Renata Lipovec i Marija Radiček

**Povezanost salivarnih biokemijskih biljega stresa s  
psihološkim pokazateljima i stupnjem tjelesne aktivnosti u  
studentskoj populaciji**

Zagreb, 2014

Ovaj rad izrađen je u Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Nade Vrkić, i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2013./2014.

Najveći dio financijske konstrukcije istraživanja odnosi se na laboratorijsku obradu. Obrada je financirana dijelom iz sredstava znanstvenog projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske (*Hemoreološki poremećaji u kroničnim bolestima* br. projekta 134-0061245-0205), a dijelom iz donacije tvrtke Euroimmun iz Njemačke.

## SADRŽAJ

1. Uvod .....	1
1.1. Slina.....	1
1.1.1. Funkcija i lučenje sline .....	1
1.1.2. Tehnike sakupljanja sline.....	4
1.1.3. Prednosti i nedostaci sline kao uzorka.....	5
1.2. Stres.....	7
1.2.1. Akutni stres .....	8
1.2.2. Kronični stres .....	8
1.2.3. Psihički stres.....	8
1.2.4. Fizički stres .....	9
1.3. Biokemijski pokazatelji stresa u slini.....	9
1.3.1. sAA.....	10
1.3.2. Kortizol .....	11
2. Opći i specifični ciljevi .....	13
3. Ispitanici i metode .....	14
3.1. Ispitanici .....	14
3.2. Metode.....	15
3.2.1. Psihološki upitnik .....	16
3.2.2. Uzorkovanje .....	18
3.2.3. Određivanje koncentracije $\alpha$ -amilaze u sline enzimmuno-analizom.....	20
3.2.4. Određivanje koncentracije kortizola u slini enzimmuno-analizom.....	22
3.2.5. Statističke metode.....	23
4. Rezultati .....	25
4.1. Deskriptivna statistika ispitivanih skupina .....	25
4.2. Usporedba biokemijskih biljega između skupina studenata.....	29
4.3. Usporedba rezultata psihološkog testiranja između studentskih skupina .....	31
4.4. Povezanosti biokemijskih i psiholoških pokazatelja suočavanja sa stresom.....	32
5. Rasprava.....	35
6. Zaključci .....	39
7. Zahvale.....	40
8. Popis literature.....	41
9. Sažetak .....	44

10. Summary .....	45
11. Životopis .....	46
12. Prilozi .....	47
12.1. Prilog 1: Upitnik stilova suočavanja sa stresnim situacijama .....	47
12.2. Prilog 2: Upitnik kvalitete života .....	51
12.3. Prilog 3: Način bodovanja upitnika o kvaliteti života .....	52

## Popis kratica

ACTH – adrenokortikotropni hormon

CBG – kortizol vezujući protein (engl. cortisol binding globulin)

COPE - suočavanje sa stresnim situacijama (eng. Coping Orientation to Problems Experienced)

CRF - kortikotropin otpuštajući faktor ( engl. *corticotropin-releasing factor*)

DHEA- dehidroepiandrosteron

ELISA - enzimski imunotest (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

HIV - virus humane imunodeficijencije

HPA - hipotalamusno-hipofizna-adrenalna osovina (engl.*hypotalamis-pituarity-adrenocortical-axis*)

IVD - engl. In vitro diagnostic

OC – oralni kontraceptivi

OS - ostali studenti

sAA – alfa amilaza u slini (engl. *alpha amylase saliva*)

SAM - simpato-adrenalno-medularna osovina (engl. *symatho-adrenomedullary-axis*)

sIgA - imunoglobulin A u slini

SK - studenti kineziologije

SŽS – središnji živčani sustav

TMB - trimetil benzidin

WHO – svjetska zdravstvena organizacija ( engl. *World Health Organization* )

WHOQOL-BREF- Upitnik kvalitete života Svjetske zdravstvene organizacije

## 1. Uvod

### 1.1. Slina

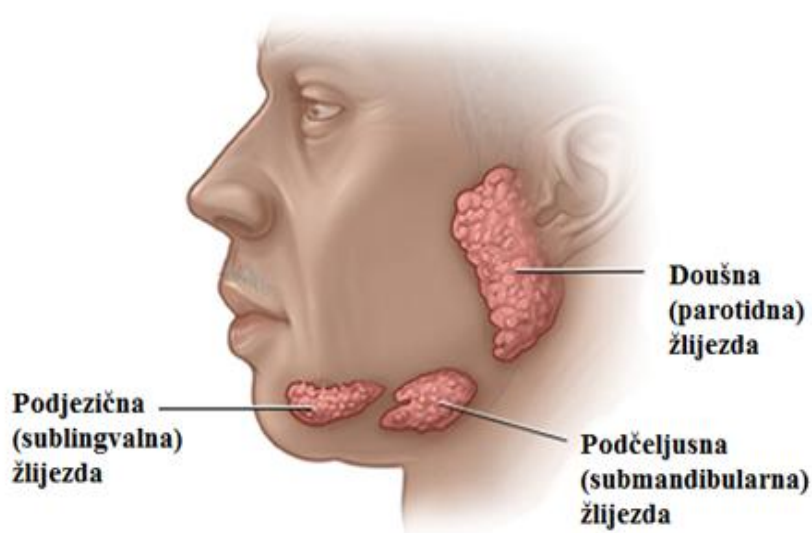
#### 1.1.1. Funkcija i lučenje sline

Slina je tjelesna tekućina složenog sastava. Izlučevina je iz velikih i malih žlijezda slinovnica, čijim lučenjem upravlja autonomni živčani sustav. Sekrecija sline iz slinovnica mijenja se tijekom dana, a razlikuje se bazalna i stimulirana sekrecija. Ukupna slina nastaje miješanjem sline iz slinovnica s ostalim tekućinama i tvarima koje dopiju u usnu šupljinu. Slina čovjeka ima razne funkcije u usnoj šupljini, uključujući: održavanje homeostaze, pospješivanje zarastanja rana, olakšavanje mineralizacije zubne površine, probavljanje ugljikohidrata djelovanjem alfa-amilaze, lipida pomoću lipaze, olakšavanje procesa žvakanja, govora, gutanja, osjeta okusa, te je lubrikant usne šupljine. Iako usna šupljina omogućuje dobre uvjete za rast mnogih mikroorganizama, antibakterijsko djelovanje sline pomaže održavanju oralne higijene čisteći i inhibirajući njihov rast.



*Slika 1. Funkcija sline (preuzeto iz rada Marković, 2013.)*

Egzokrine žlijezde proizvode slinu, koja u ustima ima probavnu, mehaničku (podmazivanje) i zaštitnu ulogu. Uz mnogo malih žlijezda slinovnica smještenih unutar stijenke usne šupljine, postoje i tri para velikih žlijezda slinovnica: doušna, podčeljusna i podjezična.



**Slika 2. Žlijezde slinovnice (preuzeto iz rada Marković, 2013.)**

Žlijezde slinovnice i mukozne žlijezde izlučuju svoje sekrete u usnu šupljinu, u kojoj se miješaju, dajući mješoviti sekret koji je poznat pod nazivom mješovita slina ili saliva. Proces lučenja sline naziva se salivacija. Mješovita slina je sredstvo oralne homeostaze. Za njeno usklađeno lučenje potrebno je regulatorno djelovanje endokrinološkog sustava i središnjeg živčanog sustava (SŽS).

U stresnim stanjima, koji su praćeni pojačanim lučenjem adrenalina u krv, luči se gusta slina (tzv. simpatikusna slina) oskudnog volumena. I druge endokrine žlijezde utječu izravno ili neizravno na volumen i sastav mješovite sline (npr. tijekom trudnoće značajno povećanje koncentracije izlučenog IgA).

SŽS ima najznačajniju ulogu u regulaciji salivacije. U inervaciji žlijezda slinovnica sudjeluju simpatikus i parasimpatikus, ali je presudan utjecaj parasimpatikusa. Podraživanjem simpatikusa nastaje prolazno lučenje sline bogate proteinima, koje ubrzo prestaje. Podraživanjem parasimpatikusa nastaje konstantno lučenje sline (posebno iz podčeljusne žlijezde), koja je razrijeđena i sadrži malo organskog sadržaja. Iz fiziologije je poznato kako postoje tri centra koji usklađuju funkcioniranje žlijezda slinovnica i salivaciju u određenim uvjetima u kojim se organizam nalazi. To su: primarni centar salivacije koji se nalazi u produženoj moždini (*medula oblogata*), sekundarni centar salivacije u talamusu i tercijarni centar salivacije u operkularno - insularnoj zoni kore velikog mozga (*Fissura Sylvii*). Stimulacijom svakog od navedenih centara može se dobiti efekt pojačanog lučenja sline, što

se odražava u određenoj količini izlučene sline. Ipak, najznačajniju funkciju u lučenju i usklađivanju sekrecije žlijezda slinovnica ima primarni salivacijski centar (Anđić, 2000.). Ovisno o trenutnom stanju oralne sredine, stanju primarnog centra za salivaciju, kao i stanju određenih dijelova kore velikog mozga ovisi kvantitet i kvalitet izlučene sline. Zbog toga slinu (ukupnu slinu) možemo grubo podijeliti na nestimuliranu (bazalnu) i stimuliranu.

Bazalna ukupna slina nastaje kao proizvod sekrecije cjelokupnog žljezdanog sustava usne šupljine u uvjetima nestimulacije, tj. onda kada nikakve nutritivne tvari ne djeluju na okusne i ostale receptore usne šupljine (Humphrey, Williamson, 2001.).

U prilog tvrdnji da pojedini dijelovi kore velikog mozga utječu na aktivnost primarnog salivacijskog centra govori podatak da je salivacija smanjena kod slijepih osoba, što ukazuje kako centar za vid koji je smješten u okcipitalnom dijelu kore velikog mozga normalno, refleksnim putem, ostvaruje svoj utjecaj na primarni salivacijski centar. Zbog toga je količina izlučene sline, bez neke značajnije stimulacije, prosječno 75% manja kod slijepih nego kod zdravih pojedinaca. Da stanje kore velikog mozga i njegovih drugih centara utječe na stanje aktivnosti primarnog salivacijskog centra najbolje pokazuju podatci dobiveni kateterizacijom izvodnih kanala žlijezda slinovnica dobrovoljaca, u svrhu sakupljanja sline i mjerenja količine salivacije. Istraživanje je pokazalo kako postoji ustaljeni dnevni ritam salivacije, po kojem sekrecija sline praktički prestaje od ponoći do 6h ujutro, nakon čega slijedi spontani porast do 18h, kada nestimulirana salivacija doseže svoj maksimum, nakon čega se smanjuje do prestanka lučenja u ponoć (Dickmeis, 2009.).

Stimulirana ukupna slina, naprotiv nastaje kao logična posljedica djelovanja različitih čimbenika koji, djelujući izravno u usnoj šupljini na brojne i raznovrsne receptore i neizravno preko osjetila vida, sluha i mirisa, uzrokuju pojačano izlučivanje ukupne sline u znatno većim količinama, nego bez njihova utjecaja. Ukupna slina je karakterizirana pisutnošću enzima amilaze u velikim količinama. Po prestanku stimulacije i lučenja ukupne sline, smanjuje se količina izlučene salivarne amilaze, salivacija prelazi u fazu mirovanja, kada se izlučuju male količine tzv. bazalne ukupne sline. Ukupna slina sadrži više pufera, praktički se radi o puferskom mehanizmu sline koji se sastoji od; bikarbonatnog pufera, fosfatnog pufera, uree, preventivnog pufera tipa salivarne amilaze, preventivno-profilaktičkog pufera tipa fluorida (Anđić, 2000.).



Slina sadrži niz imunoloških i neimunoloških proteina s izrazitim antibakterijskim svojstvima važnim u obrani. Neki od tih proteina su nužni jer sprječavaju spontano taloženje kalcijevih i fosfatnih iona u žlijezdama slinovnicama i njihovim izlučevinama (Axelsson, 2000.).

Među neimunološke salivarne proteine spadaju enzimi (lizozim, laktoferin i peroksidaze), glikoproteini mucina, aglutinini, histatini, proteini bogati prolinom i cistatini (Axelsson, 2000.; Schenkels i sur., 1995.).

Sekrecijski IgA je najzastupljenija imunološka sastavnica sline. Otporniji je od ostalih imunoglobulina na proteolizu bakterijskim hidrolazama, a njegov omjer prema IgG je oko 400 puta veći nego li omjer IgA : IgG u serumu (Veerman, Amerongen, 1995.; Ten, 1998.; Humphrey, Williamson, 2001.). Time je smanjeno izlučivanje i prisutstvo sAA u takvoj slini. Međutim, djelovanje sAA se nastavlja zbog tog jer je tijekom stimulirane salivacije ovaj enzim dospio u velikim količinama do retencijskih mjesta usne šupljine, gdje natapanjem zaostalih čestica hrane dolazi u kontakt s škrobnim makromolekulama, koje nastavlja hidrolitički cijepati i u uvjetima kad je salivacija svedena na najmanju mjeru (Marković, 2013.).

Brzina lučenja sline povezana je sa nekoliko faktora: uočavanjem stresa i depresije, razlikama u godinama, konzumacijom alkohola, intenzitetom vježbanja, liječenjem karcinoma - radiacijskom terapijom. Fluktuacija brzine lučenja sline podudara se sa fluktuacijom sAA koncentracija. Nejasno je međutim da li je fluktuacija sAA koncentracija učinak drugačije brzine lučenja sline ili direktno ovisi o faktorima stresa. Mnogi autori navode da utjecaj može biti različit ovisno o tehnikama sakupljanja, vremenu uzimanja uzorka (Arhakis i sur., 2013.).

### **1.1.2. Tehnike sakupljanja sline**

Jedina praktična metoda sakupljanja sline je mješana slina koje se koristi za rutinske potrebe, za istraživanja otvorenog tipa te kod uzimanja uzoraka vanjskih pacijenata.

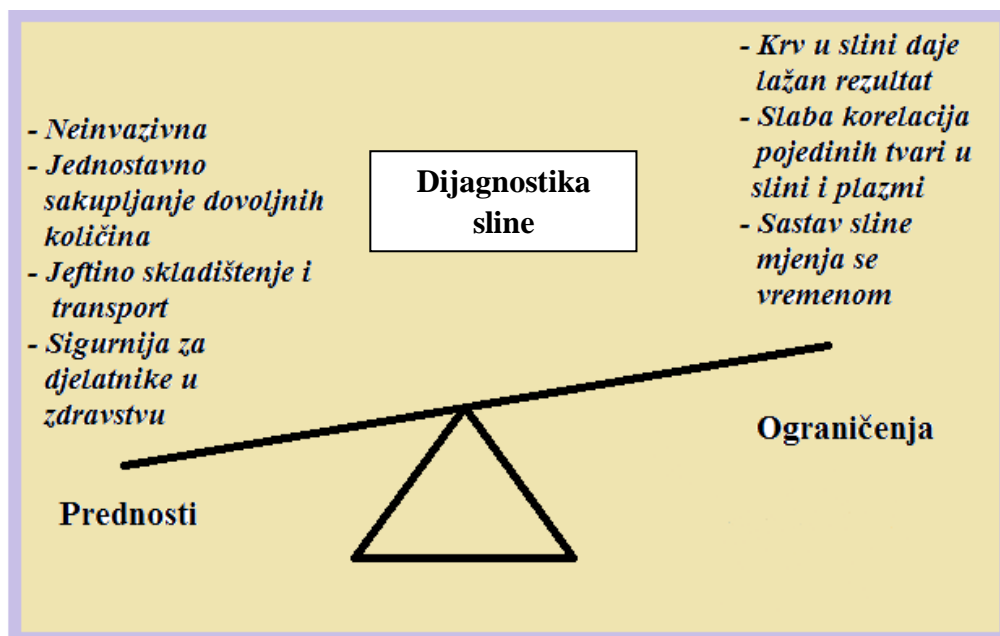
U mnogim istraživanjima se traži pacijente da ispljunu slinu izravno u epruvetu (posudu). Takav direktan način sakupljanja ima nekoliko nedostataka: odrediti dovoljnu socijalnu barijeru za ispljuvavanje (osobito u gerijatrijskih pacijenata), problem se također javlja kod kserostomije (suha usta) koja je često prisutna kod starijih osoba. Izlučivanje sline može se stimulirati stavljanjem limunske kiseline na jezik, no korištenje limunske kiseline može izazvati interferencije kod imunodgovora u tijeku analize povećanjem pH sakupljenog uzorka. Posljedično se u mnogim istraživanjima slina sakuplja tkaninama u ustima te potom centrifugira. Procedura sakupljanja uzorka ne smije utjecati na salivarne koncentracije ni

apsorpcijom ni modifikacijom analita. Materijali poput Parafilma i pamuka apsorbiraju određene molekule iz slina te dovode do lažno sniženih rezultata mjerenja.

Najčešće korišteni sustavi za sakupljanje slina su Salivette, Quantisal i Intercept. Svi sistemi sadrže jastučice koji se stave u usta ili ispod jezika ili uz obraze. Apsorbirajući jastučići drže se u ustima tako da upijaju slinu, čije se stvaranje povećava žvakanjem, standardiziran period od 1 - 2 minute. Potom se jastučić vraća u epruvetu. Nakon toga slijedi centrifugiranje gdje se slina odvaja od jastučića. Sustavi za uzimanje slina pokazali su reproducibilne rezultate za analizu mnogih steroidnih i peptidnih hormona (Gröschl, 2008.).

### 1.1.3. Prednosti i nedostaci slina kao uzorka

Zbog svog sastava, ukupna slina je pogodna za cijeli niz dijagnostičkih postupaka. Činjenica da se u slini nalaze komponente plazme omogućuje njihovu detekciju i kvantifikaciju iz uzorka slina. Korištenje slina u laboratorijskoj dijagnostici, umjesto uobičajene krvi ili urina ima brojne prednosti.



Slika 3. Prednosti i ograničenja slina kao uzorka (preuzeto iz Marković, 2013.)

Iako je poznato kako slina sadrži brojne komponente pogodne za laboratorijsku dijagnostiku, njihova niska koncentracija u odnosu na koncentracije u krvi dugo vremena bila je ograničenje za kliničku primjenu salivarne dijagnostike. Međutim, zbog razvoja novih visoko osjetljivih tehnologija niske koncentracije analita više nisu ograničenje.

Kao dijagnostički uzorak slina se jednostavnije može sakupiti u većim količinama te se mnogo lakše skladišti i transportira u odnosu na krv ili urin. Kako se slina ne zgrušava olakšano je rukovanje tijekom dijagnostičkog postupka, a višestruko je smanjen i broj manipulacija uzorkom, što značajno smanjuje i troškove. Za zdravstvene djelatnike korištenje sline u odnosu na serum sigurnije je zbog smanjenog rizika infekcijama npr. HIV-om ili hepatitisom jer nema izravnog kontakta s uzorkom (Yi, Moochhala, 2013.).

No, postoje i ograničenja pri korištenju sline kao dijagnostičkog medija. Da bi bilo koji test iz sline bio klinički koristan mora postojati pouzdana korelacija između koncentracije biljega u slini i krvnoj plazmi. Tako npr. mjerenje glukoze u slini nije pouzdan način praćenja šećerne bolesti zbog slabe korelacije sa plazmatskom koncentracijom. Nadalje, prisutnost čak i najmanje količine krvi u slini primjerice prilikom korištenja zubnog konca, uzrokuje pogreške u mjerenju i povećanje broja lažno pozitivnih rezultata testova.

Mogućnost točne procjene biljega u uzorku usne šupljine ovisi o biokemijskim karakteristikama biljega, korištenom uzorku, načinu uzorkovanja, rukovanju uzorkom, skladištenje, odabir analitičke metode kao i samom mehanizmu ulaska biljega u prostor usne šupljine.

Slina čovjeka je ultrafiltrat plazme i sadrži proteine koji su sintetizirani in situ u žlijezdama slinovnicama ili iz krvi. Sadrži biljege iz seruma, gingivalne tekućine i transudata mukoze. Do danas istraživači su identificirali 2340 proteina od kojih 20 - 30% se nađu i u krvi što je ohrabrujući indikator u kliničkoj upotrebi sline kao dijagnostičke tekućine. Načelno, općenita analiza ljudskog proteoma sline omogućuje opsežan uvid u oralno i sistemsko zdravlje (Bandhakavi i sur., 2009.).

U slini se nalaze analiti u svom aktivnom obliku te su zbog toga koncentracije analita određivanih u slini dobro kolerireju s koncentracijama tih analita u serumu/plazmi (Marković, 2013.).

## 1.2. Stres

Stres je stanje u kojem je poremećena unutrašnja (psihofiziološka) ravnoteža organizma i koje zahtjeva ulaganje dodatnih napora radi prilagodbe. Uz pojam stresa vezani su i pojmovi kao što su stresni podražaji, stresna situacija i stresni doživljaj. Stresni podražaj (stresor) je svaki podražaj koji dovodi pojedinca u stanje stresa. To mogu biti vrlo raznoliki podražaji, koji ne izazivaju stres kod svakog pojedinca nego njihovo djelovanje ovisi o subjektivnom značenju podražaja za pojedinca. Prema tome, stresna situacija, kao. npr. medvjed u šumi, može predstavljati stresni podražaj za pojedinca koji se suoči s takvim podražajem. Međutim, da li će doći do stresne reakcije, ovisi o tome percipira li pojedinac situaciju kao ugrožavajuću ili ne. Ako se osjeća zaštićen, stresna reakcija se ne javlja i obratno. Stresni doživljaji su ona doživljavanja koja se zbivaju pod utjecajem stresnog podražaja. Promjene koje se u organizmu događaju pod utjecajem stresa mogu u određenim uvjetima izazvati lažne organske smetnje koje nazivamo psihosomatskim poremećajima i psihosomatskim bolestima (Havelka, 1995.).

Stres aktivira dva velika biološka sistema hipotalamusno-hipofiznu-adrenalnu osovinu (HPA engl. *hypotalamis-pituarity-adrenocortical-axis*) i simpato-adrenalno-medularnu osovinu (SAM engl. *sympatho-adrenomedullary-axis*). Kod ljudi aktivacija HPA rezultira povećanom sekrecijom hormona kortizola. Kortizol ima cirkadijalni ritam u kojem su koncentracije veće ujutro, a niže uvečer. Aktivacija SAM uzrokuje otpuštanje epinefrina i norepinefrina iz CNS-a. Salivarne koncentracije kortizola odnose se na slobodnu formu i dobro koreliraju sa koncentracijama slobodnog kortizola u serumu koji se smatra biološki aktivnom komponentom. Obećavajući kandidat za sličnu, neinvazivnu i jednostavnu metodu daje i marker SAM osovine, alfa amilaza u slini (sAA). Ona je enzim za probavu ugljikohidrata njegova je sekrecija pod snažnom neurohormonskom kontrolom, uzima se kao marker simpatičke aktivnosti (Wolf, Nicholls, Chen, 2007.).

Reakcija na stres je sastavni dio alostaze, jer svojim fiziološkim i bihevioralnim odgovorom omogućava preživljavanje u iznenadnoj opasnosti, a njezini glavni medijatori su isti oni koji sudjeluju u održavanju dnevnih ciklusa aktivnosti i mirovanja HPA-o i simpatikoadrenalni sustav. Ona korisna, poželjna i neophodna adaptivna reakcija koja ima za cilj izvući organizam iz stanja nefiziološkog stanja i ponovno uspostaviti homeostazu.

Stresor odnosno, štetni agens koji uzrokuje stres, može biti fizički (izloženost buci, hladnoći, ekstremnom naporu, traumi, senzornoj deprivaciji), psihički (strah, tjeskoba, krivnja, tuga, mobbing, frustracije), ekonomski (gubitak posla, velike ekonomske krize, rat, rastava).

Postoji nekoliko tipova stresa koji se po trajanju i učestalosti dijele na: akutni stres, kronični stres, psihički stres i fizički stres.

### **1.2.1. Akutni stres**

Akutni stres je najčešći oblik koji proizlazi iz pritiska i zahtjeva iz neposredne prošlosti, aktualnih zahtjeva okoline, te pritisaka i očekivanja od skore budućnosti. Rezultira fiziološkom reakcijom „borbe ili bijega“ kada se tijelo dovodi u stanje uzbune i pripravnosti da reagira ili se adaptira na iznenadnu promjenu ili opasnost. Epizodički akutni stres javlja se kod osoba koje često proživljavaju i perpetuiraju akutne stresne situacije, čiji su životi tako nesređeni, da se ne znaju organizirati između vlastitih ciljeva i mogućnosti, često katastrofičnih pogleda na život. Posttraumatski stresni poremećaj nastaje u situacijama izloženosti ekstremnom akutnom stresu koji reverberira godinama s permanentnom repetitivom traumatskih iskustva. Stresor perzistira unutar organizma (Šupe i sur., 2011.).

### **1.2.2. Kronični stres**

Kronični stres je izloženost stresnim i iscrpljujućim situacijama tijekom dužeg razdoblja, osobito na poslu ili u obiteljskom okruženju. Često je povezan sa lošim socioekonomskim statusom, društvenom izolacijom, nemogućnosti kontroliranja i utjecanja na događaje, padom samopouzdanja i suicidalnim mislima (Šupe i sur., 2011.).

### **1.2.3. Psihički stres**

Emocionalni ili kronični stres je vrlo opasan i on se nalazi na drugom mjestu izazivanja bolesti. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO engl. *World Health Organization*) proglasila je stres na radnom mjestu svjetskom epidemijom, a sada je on veći zbog recesije, globalne krize i bojazni gubitka radnog mjesta (izvor opstanka).

"Burn out" je sindrom potpune emocionalne iscrpljenosti zbog poteškoća na poslu (uzaludan trud na poslu). Zahvaćeni takvim stresom opisuju ga: Imamo osjećaj da smo izgubili kontrolu

nad novonastalom situacijom, osjećamo se ugroženo, stalno smo pod pritiskom. Međuljudski odnosi su potpuno poremećeni, obiteljski odnosi narušeni, stalno dobivamo signale pogoršanja i opasnosti (<http://www.zdravljeizprirode.hr>).

Psihički stres također je prisutan kod pisanja ispita. Mnoga istraživanja bave se doživljavanjem stresa izazvanim ispitima i njegovim posljedicama na funkcioniranje stanične imunosti. Tijekom ispitnog perioda ispitanici doživljavaju viši stupanj stresa uz značajno smanjenje funkcije različitih indikatora stanične imunosti (Hudek-Knežević, Kardum, 2005.).

#### **1.2.4. Fizički stres**

Fizički stres nastaje kada je tijelo u neposrednoj opasnosti - fizička borba, prometna nesreća, ranjavanje, kada nam je život u opasnosti (borba za opstanak) ili vožnja biciklom, trčanje, izloženost hladnoći. Čini se da su naši preci poznavali samo takav stres. U tijelu se događaju gore opisane reakcije. Ovaj stres traje obično kraće i tijelo se poslije toga vraća u normalu (ravnotežu). Tijelo je potrošilo povećane količine glukoze, tlak se normalizira, hormoni nadbubrežne žlijezde u krvi su u normalnoj količini. Tijelo je opušteno (<http://www.zdravljeizprirode.hr>; Arhakis i sur., 2013.).

#### **1.3. Biokemijski pokazatelji stresa u slini**

Salivarni biomarkeri popularniji su u istraživanjima vezanim za stres jer je dokazano da su bolji od provođenja testiranja biomarkera iz krvi (Yi, Moochhala, 2013.). Napretkom u području imunologije i molekularne biologije znanstvenici su pronašli nove načine analiziranja salivarnih biomarkera i njihove primjene u istraživanjima stresa. Postoje mnoge prednosti korištenja salivarnih biomarkera u odnosu na biomarkere iz krvi u istraživanjima stresa. Prednosti su toga što je metoda neinvazivna, uklanja se rizik uboda iglom prilikom vađenja krvi, te uzrokuje minimalnu nelagodu kod pojedinca. Također je uklonjen stres koji se javlja prilikom uboda igle za vrijeme uzorkovanja, što je korisno kod djece, jer kod njih flebotomija može biti traumatična.

Trenutno se u istraživanju stresa koristi nekoliko salivarnih biomarkera kao što su: koncentracije salivarnog kortizola, sAA, sIgA i dehidroepiandrosteron (DHEA) (Yi, Moochhala, 2013.).

### 1.3.1. sAA

sAA je digestivni hormon, sintetizira se u acinarnim stanicama, te pohranjuje u granulama i otpušta u slinu kao odgovor na neurohormonsku stimulaciju.

Ovaj enzim dospjeva u usnu šupljinu iz tri glavna izvora: parotidnih, sublingvalnih i submandibularnih žlijezda slinovnica. Parotidna žlijezda je najznačajniji izvor salivarne amilaze, a to je i najznačajniji sastojak sline koju ona stvara. Ona sintetizira 80% ovog enzima, dok ostatak nastaje u submandibularnim žlijezdama. Ovaj enzim je dobar pokazatelj funkcioniranja žlijezda slinovnica, jer čini 40% do 50% ukupnih proteina sline (Marković, 2013.).

Koncentracija sAA je neovisna o količini proizvedene sline. Značajno je da je koncentracija ovog enzima u slini proporcionalna koncentraciji IgA, a obrnuto proporcionalna stupnju stresa. sAA se koristi kao marker stresa, te je visoko osjetljiv u stresnim situacijama uključujući i psihički stres (npr. izloženost pacijenta slikama koje potiču negativne emocije, rješavanje psiholoških testova) te fizički stres (npr. vožnja biciklom, trčanje, izloženost hladnoći) (Yi, Moochhala, 2013.).

Izlučivanje sAA više je povezano sa psihoneuroendokrinim odgovorom na stres nego sa brzinom lučenja sline i dobi. sAA jedna je od bogatijih komponenti u slini te čini 10 - 20 % ukupnog sadržaja proteina. Sudjeluje u digestiji hrane hidrolizirajući škrob u glukozu i maltozu. Sprečava bakterijske infekcije usne šupljine i onemogućuje bakterijski klirens u ustima. Prijašnja razmatranja pokazuju vezu između sekrecije sAA i izlaganja stresnom stanju (Arhakis i sur., 2013.; Scannapieco i sur., 1993.).

### 1.3.2. Kortizol

Kortizol je vrlo djelotvoran kortikosteroid koji se sintetizira iz kolesterola stupnjevitim enzimatskim pregradnjama u kori nadbubrežne žlijezde pod utjecajem hormona hipofize adrenokortikotropnog hormona (ACTH) i hipotalamusa koji otpušta kortizol otpuštajući hormon (CRF - engl. *corticotropin-releasing factor*), a sustavom povratne sprege inhibira iste. Kortizol u pravilu ima tipični cirkadijalni ritam viših vrijednosti u jutarnjim satima, a nižih vrijednosti u večernjim satima (Dorn i sur., 2007.; Dickmeis, 2009.). Aktivacija SAM osovine povećava izlučivanje norepinefrina i epinefrina iz adrenalne medule te izlučivanje norepinefrina iz završetaka simpatičkih živaca. U plazmi je veći dio vezan na globulin transkortin, a djeluje na mnoge metaboličke procese posredstvom intracelularnih receptora. Izlučuje se urinom u slobodnoj, nevezanoj formi. Salivarni kortizol izvrstan je indikator slobodnog kortizola, dobro korelira sa serumskom vrijednošću i odražava slobodnu frakciju kortizola koja je biološki aktivna te mjerenje koncentracija salivarnog kortizola bolje pokazuje adrenokortikalnu funkciju od serumskog kortizola (Aardal i sur., 1995.). Stoga se salivarni kortizol često koristi u procjeni stresa. Salivarni kortizol u odnosu na ukupni kortizol je 1 - 2 % niži. Koncentracije salivarnog kortizola moraju se tumačiti s oprezom kada ne oponašaju linearnost sa serumom, u odgovoru na izazov, ili kod utjecaja na promjene kortizol vezujućeg globulina (CBG engl. *cortisol binding globulin*) npr. kod uzimanja OC menstrualni ciklus, trudnoća. Štoviše, povećane koncentracije ACTH i kortizola u stanju fizičkog ili psihološkog stresa izlučuju se neovisno o cirkadijalnom ritmu (Anizan, Marylin, 2014.).

Kortizol pasivnom difuzijom prelazi u žlijezde slinovnice, s malom ovisnošću o koncentracijskom gradijentu. Koncentracija kortizola u slini je niska (1-10  $\mu\text{g}$  /L) zbog prisutnosti 11 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze koja oksidira 30 % slobodnog kortizola enzimski u kortizon. To treba imati na umu kada se gledaju referentne vrijednosti za kortizol koje se razlikuju od literatute do literature (Anizan, Marylin, 2014.).

Mnogi faktori kao neuropeptidi, neurotransmiteri, opiodi, faktori rasta, citokineza, adipokineza, baterijski ligandi moduliraju otpuštanje adrenalnih glukokortikoida neovisno o hipofiznim ACTH. To treba uzeti u obzir jer u tom slučaju koncentracija salivarnog kortizola kao odgovora na stres može biti poremećena drugim faktorima. Adrenalno otpuštanje kortizola za vrijeme cirkadijalnog uspona i odgovor na stres su pod kontrolom i ACTH i preganglijskih simpatičkih neurona. Ostala istraživanja pokazuju da to može utjecati na otpuštanje adrenalnog glukokotrikoida neovisno o otpuštanju ACTH. Faktori koji mogu izazvati takvu reakciju su kronični stres, kontinuirano vježbanje i stimulansi. Smatra se da



vježbanje i psihološki stres vrše različite učinke. Istraživanja pokazuju da postoji dodatni ACTH mehanizam koji oblikuje adrenalni odgovor, osiguravajući povišene koncentracije kortikosterida, kako bi se omogućilo povećanje izdržljivosti kada je to potrebno, ali i osiguravajući niže koncentracije kortikosteroida kada je fizička aktivnost u granicama izdržljivosti (Hellhauer i sur., 2009.; Anizan, Marylin; 2014.).

## 2. Opći i specifični ciljevi

### *Opći cilj*

Cilj je ovog rada izmjeriti u slini koncentracije  $\alpha$ -amilaze i kortizola, biokemijskih pokazatelja stresa, u zdravoj studentskoj populaciji. Nadalje, rezultate testiranja želimo povezati s kroničnim fizičkim stresom u skupini studenata koji su izloženi trajnom i intenzivnom fizičkom stresu u nastavi u odnosu na skupinu studenata koja nastavu provodi s neznatnim fizičkim aktivnostima, a moguće je da su izloženi većem psihičkom stresu. Rezultate mjerenja biljega povezat će se s rezultatima psihološkog testiranja koje svojim metodama mjeri način na koji se ispitanik suočava sa stresnim situacijama.

### *Specifični ciljevi*

1. Izmjeriti bazalnu jutarnju koncentraciju kortizola i  $\alpha$ -amilaze u slini studenata različitih fakulteta koji nemaju fizičke aktivnosti ili imaju povremene tjedne tjelesne aktivnosti.
2. Izmjeriti bazalnu jutarnju koncentraciju kortizola i  $\alpha$ -amilaze u slini studenata II. i III. godine Kineziološkog fakulteta koji imaju redovito svakodnevne i intenzivne tjelesne vježbe kao obavezni dio nastave.
3. Psihotestiranjem izmjeriti svim studentima stilove suočavanja sa stresnim situacijama.
4. Ispitati razlike u koncentracijama biokemijskih biljega stresa između dvije skupine studenata.
5. Ispitati razlike u načinima suočavanja sa stresnim situacijama između dvije skupine studenata.
6. Povezati rezultate psihotestiranja s koncentracijom biokemijskim biljezima stresa u svih studenata te u svakoj grupi studenata zasebno.
7. Zaključiti ima li intenzivna fizička aktivnost obilježja kroničnog stresa u odnosu na fizičku neaktivnu grupu te može li se za tu hipotezu naći uporište u koncentraciji salivarnih biokemijskih biljega ili u psihotestiranju spremnosti na stres.

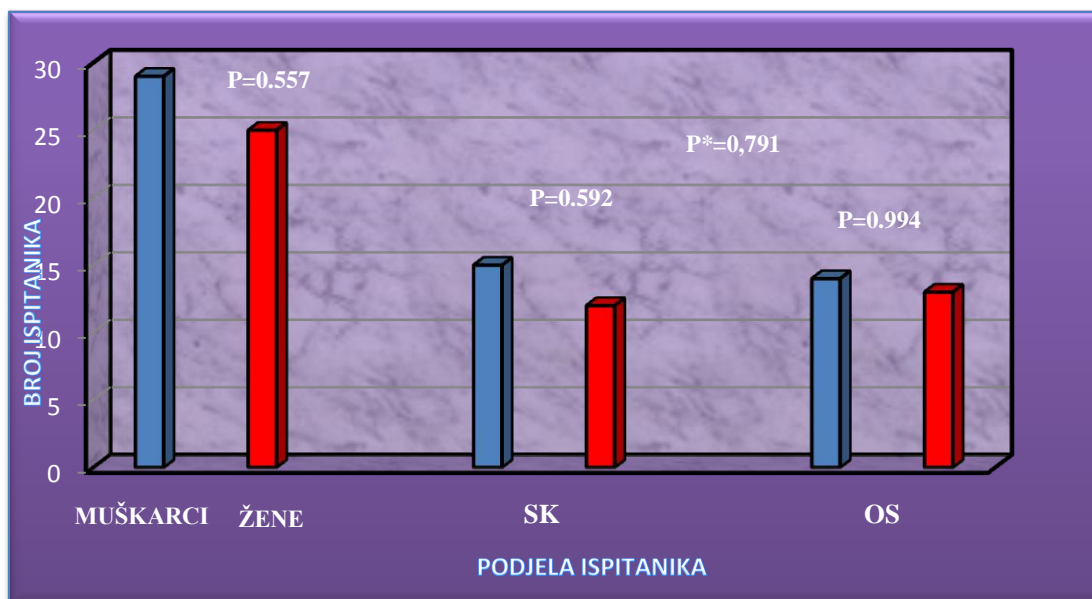
### **3. Ispitanici i metode**

#### **3.1. Ispitanici**

U istraživanje je bilo uključeno 54 zdravih dobrovoljaca ( $N = 54$ ), studenata Sveučilišta u Zagrebu, podijeljenih u dvije skupine, jednu skupinu dobrovoljaca činili su fizički aktivni dobrovoljci ( $N = 27$ ) sa Kineziološkog fakulteta - SK, a drugu skupinu činili su fizički neaktivni dobrovoljci ( $N = 27$ ) sa Pravnog fakulteta, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Stomatološkog fakulteta, Veterinarskog fakulteta, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Rudarsko-geološko-naftnog fakulteta, Katoličko-bogoslovnog fakulteta, Fakulteta organizacije i informatike, Filozofskog fakulteta i Agronomskog fakulteta - OS. Skupina ispitanika bila je ujednačena po spolu odnosno u prvoj skupini fizički aktivnih ispitanika bilo je 15 muškaraca i 12 žena, dok je drugu skupinu fizički neaktivnih ispitanika činilo 14 muškaraca i 13 žena, u dobi od 19 do 26 godina. Prvi uzorci sline uzeti su 27.3.2014. 18 ispitanika, potom 28.3.2014. 20 ispitanika, 29.3.2014. 3 ispitanika 30.3.2014. 1 ispitaniku, 1.4.2014. 6 ispitanika, te posljednji uzorci su uzeti 4.4.2014 6 ispitanika. Uzorci su bili obilježeni šiframa. Jedini osobni podaci uzeti od ispitanika bili su dob i spol ispitanika. Na svakom uzorku je također bilo obilježeno vrijeme i datum uzimanja uzorka.

Informirani pristanak sadržavao je svrhu istraživanja, opis istraživanja, tok istraživanja i cilj istraživanja, a ispitanici su dodatno upoznati usmeno sa informiranim pristankom, te su ga u konačnici i sami pročitali i potpisali.

Etičko povjerenstvo Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta odobrilo je naše istraživanje.



**Slika 4. Podjela ispitanika prema spolu i fizičkoj aktivnosti**

SK - studenti Kineziološkog fakulteta; OS - ostali studenti; P - normalnost distribucije; P\*- normalnost distribucije između dvije skupine studenata

### 3.2. Metode

Svi ispitanici najprije su ispunili psihološki test, a potom su pristupiti davanju sline na i neagresivni način uz pomoć standardiziranog sustava dvostrukih epruveta (Sarsted, Njemačka). Takve duple epruvete podvrgnute su centrifugiranju koje je kroz otvor na dnu manje epruvete prouzročilo odvajanje tekućine (sline) od natopljenog jastučića. Veća epruveta sa sadržajem sline i ostacima eventualnih raspadnutih dijelova stanica i ostalih čestica sabijenih u uski konusni završetak epruvete, pohranila se u hladnjak na +4 do +8 °C kroz najviše 7 dana nakon čega se analizirala koncentracija kortizola i sAA.

Koncentracija sAA i kortizola u slini određivane su enzimimunometodom u kliničkom zavodu za kemiju KBC Sestre milosrdnice, a psihološke testove obradio je klinički psiholog u KBC Sestre milosrdnice.

Za prikaz rezultata i statističku obradu podataka koristio se računalni programi, a prikazuju se skupni prikaza udjela starosne dobi i spola ispitanika.

### 3.2.1. Psihološki upitnik

Posljednjih godina u psihološkoj literaturi nalazimo različite definicije pojma suočavanja sa stresom, ovisno o teorijskim orijentacijama i području istraživanja različitih autora.

Najobuhvatnija i najpreciznija čini se da je definicija suočavanja koja proizlazi iz transakcijske teorije suočavanja ili pristupa usmjerenog na proces Richarda Lazarusa i Susan Folkman (Lazarus 1966., 1993.). Oni naglašavaju da je suočavanje proces u kojem osoba konstantno nastoji bilo kognitivnim ili ponašajnim naporima savladati, podnijeti ili smanjiti internalne i/ili eksternalne zahtjeve koji su procijenjeni prevelikim za sposobnosti osobe. Empirijska istraživanja koja uzimaju za teorijski okvir ovaj model najčešće ispituju odnose između karakteristika stresnih situacija. Uzimaju se u obzir priroda ili tijek određene stresne transakcije te kako ih osoba percipira i procjenjuje.

Prema pristupu (Carvera i sur., 1989.) prema kojima pojedinac uz pojedinačne načine suočavanja u konkretnim situacijama, posjeduje i različite stilove suočavanja (tj. skupine pojedinačnih strategija) koje fleksibilno koristi u različitim situacijama, a dosljedno u sličnim stresnim situacijama (Arambašić, 1994). U svojim istraživanjima (Carvera i sur., 1989.) pokazuju da su različiti stilovi ili strategije suočavanja na smislen način povezani s različitim dimenzijama ličnosti kao što su optimizam-pesimizam, anksioznost, samopoštovanje te internalnost. No stupanj povezanosti nije tako visok da bi se moglo zaključiti da crte ličnosti determiniraju stilove suočavanja. Također, (Windle, Windle, 1996.) proučavali su interakciju između strategija suočavanja, motiva za konzumiranje alkohola, velikih stresnih životnih događaja (u posljednjih 6 mjeseci), problema izazvanih konzumiranjem alkohola i postignuća u školi na srednjoškolcima. Za procjenu preferiranih strategija suočavanja (što osoba obično čini u svakodnevnim stresnim situacijama) koristio se Coping Inventori for stressful situation (Endler, Parker, 1999.). Autori zaključuju da su strategije suočavanja orijentirane na zadatak negativno povezane s konzumiranjem alkohola i depresivnim afektom, a pozitivno s postignućem u školi. Strategije emocijama orijentiranog suočavanja nisu povezane s konzumiranjem alkohola, ali su pozitivno povezane s depresijom. Strategije suočavanja izbjegavanjem su pozitivno povezane s problemima izazvanim alkoholom i inverzivno sa školskim uspjehom i depresijom.

Za ispitivanje strategija suočavanja primijenjena je adaptirana verzija upitnika suočavanja sa stresnim situacijama (Coping Orientation to Problem s Experienced - COPE). Autori ovog upitnika su Carver, Weintraub i Scheirer (1989.).

Učinjena je adaptacija ovog upitnika našim kulturalnim uvjetima (Hudek-Kneževi, Kardum, 1993). Ovako adaptirani upitnik COPE sastoji se od 71 čestice koje čine 17 empirijski deriviranih skala od kojih je 15 preuzeto iz izvornog (COPE) upitnika, dok specifični odgovori ispitanika našeg područja sačinjavaju dvije dodatne skale koje se nazivaju skala osamljivanja i skala potiskivanja emocija. Upitnik suočavanja koji je korišten u našem istraživanju nalazi se u Prilogu 1. Zadatak ispitanika je bio da odgovore što općenito osjećaju i kako reaguju kada se nađu u stresnim situacijama.

COPE upitnik se sastoji od 17 skala koje čine sljedeće strategije suočavanja:

1. **Pozitivna reinterpretacija i rast ličnosti** odnosi se na viđenje date situacije upovoljnom svjetlu ili korištenje dobrih strana situacije.
2. **Mentalno izbjegavanje** se odnosi na psihološki dezangažman od cilja s kojiminterferira stresor maštanjem, spavanjem i samodestruktivnim ponašanjem.
3. **Ventiliranje emocija** predstavlja povećanu svjesnost o stresnom događaju uz tendenciju da se emocije ventiliraju i izraze.
4. **Traženje socijalne podrške zbog instrumentalnih razloga** predstavlja traženje pomoći, informacija ili savjeta o tome što da radimo.
5. **Aktivno suočavanje** odnosi se na poduzimanje akcije ili napora da bi se uklonio ili izbjegao stresor.
6. **Negiranje** se odnosi na pokušaje da se odbije realnost stresnog događaja.
7. **Religija** predstavlja oslanjanje na vjeru u Boga i religijska osjećanja.
8. **Humor** se odnosi na korištenje šala i humora u vezi sa stresnom situacijom.
9. **Ponašajno izbjegavanje** predstavlja odustajanje ili povlačenje napora u smjeru postizanja cilja s kojim interferira stresor.
10. **Obuzdavanje(odgađanje) suočavanja** odnosi se na pasivno suočavanje obuzdavanjem pokušaja suočavanja sve dok to bude potrebno.
11. **Traženje socijalne podrške zbog emocionalnih razloga** odnosi se na primanje simpatije ili emocionalne podrške.
12. **Alkohol i droge** predstavlja konzumaciju psihoaktivnih tvari (alkohola, tableta ili droga).
13. **Prihvatanje** se odnosi na prihvatanje činjenice da se stresni događaj dogodio i daje stvaran.
14. **Planiranje** se odnosi na razmišljanje o konfrontaciji sa stresorom i planiranje suočavajućih napora.
15. **Potiskivanje kompeticijskih aktivnosti** predstavlja usmjeravanje pažnje s drugih aktivnosti, kako bi se potpunije koncentriralo na suočavanje sa stresorom.
16. **Fizička izolacija** se odnosi na tendenciju povlačenja od drugih ljudi i potreba da se bude sam.
17. **Potiskivanje emocija** predstavlja ne izražavanje emocija.

Objedinjavanje stilova sa zajedničkim načinom reakcije na stres primijenjeno je u istraživanju Hudek-Knežević i Kardum (Hudek-Knežević, Kardum, 1993.) po kojem je i ovaj rad ocijenio

ispitanike na koji se način suočavaju s psihološkim stresom (Sanja Belak-Kovačević, 2004.; WHOQOL User Manual, 1998.)

Razlikujemo stilove:

- 1) **suočavanja sa stresom usmjerena na problem** (na stresora),
- 2) **suočavanja sa stresom usmjerena na emocije** (emocionalni pristup)
- 3) **strategije izbjegavanja** (negiranje i bježanje od problema tj. stresora).

### **Upitnik kvalitete života Svjetske zdravstvene organizacije - WHOQOL-BREF**

Upitnik WHOQOL-BREF predstavlja skraćenu verziju upitnika WHOQOL-100 koji je izradila Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) u svrhu procjene kvalitete života. WHOQOL-BREF je sastavljen korištenjem i analizom podataka pilot istraživanja WHOQOL-100. Odabrano je 25 čestice iz originalnog upitnika, odabrana po jedna čestica za kvalitetu života u cjelini i za opće zdravlje. Upitnik u cijelosti sadrži 26 čestica. Psihometrijska istraživanja su pokazala da je WHOQOL-BREF pouzdan i validan instrument. Boduje se percepcija kvalitete života u svakoj od 4 domene upitnika posebno (**fizičko zdravlje, psihološko stanje, socijalni odnosi te okoliš**), pri čemu je skala usmjerena pozitivno, što znači da veći broj bodova predstavlja veću kvalitetu života. Upitnik se sastoji od 26 pitanja, a svako se pitanje boduje Likertovom skalom od 1 (najlošije) do 5 (najbolje). Nakon transformacija bodova, koje se vrše u dva koraka, bodovi za pojedinu domenu su unutar skale 0 - 100. U ovom je istraživanju korištena validirana hrvatska verzija upitnika koja je prilagođena za našu skupinu ispitanika. Ovaj upitnik procjenjuje individualnu percepciju pojedinca u kontekstu njegove kulture, osobnih ciljeva, standarada i zabrinutosti (Vurnek-Živković, 2011.; WHOQOL User Manual, 1998.).

#### **3.2.2. Uzorkovanje**

Prije uzimanja uzoraka svi ispitanici bili su ispunjavali psihološki test koji će nizom pitanja psihometrijski izmjeriti njihov način suočavanja sa stresnim situacijama u životu, te ispitanici nisu smjeli konzumirati piće, jelo, žvakati, pušiti ni prati zube pola sata prije uzimanja uzorka.

Kod uzimanja uzoraka koristili smo standardiziran postupak uzimanja uz sustav Salivetta (Sarsted, Njemačka). Svim ispitanicima uzorci su uzeti u vremenu između 10 i 12 sati. Svim

ispitanicima uzorci su uzeti na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju, Domagojeva 2. Sustav se sastoji od dvije epruvete, u manjoj epruveti nalazi se sterilan jastučić, a u većoj epruveti centrifugiranjem dobivamo uzorak sline. Uzimanje uzorka provodi se stavljanjem sterilnog jastučića u usta, izravno iz epruvete, potom se postupkom žvakanja, na neagresivan način, jastučić puni slinom u trajanju od 1 minute, te ponovno vraća izravno iz usta u epruvetu. Nakon uzorkovanja slijedi centrifugiranje na standardnoj centrifugi na 3000 okretaja 3 minute (u centrifugi promjera 10 cm). Centrifugiranjem smo dobili od  $1.1 \pm 0.3$  ml uzorka sline. Centrifugirane uzorke potom smo pohranili u hladnjak do dana analiziranja, 13.04.2014.

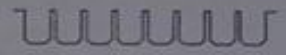
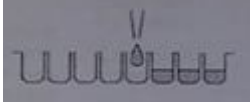

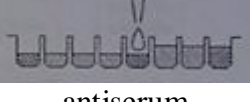
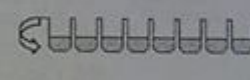

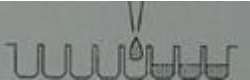
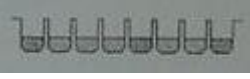
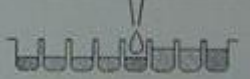
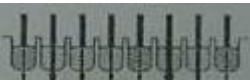


Slika 3. Salivette- preuzeto sa:

<http://cvi.asm.org/content/5/4/419.full>

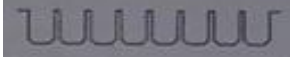
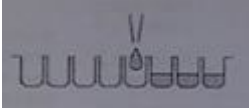
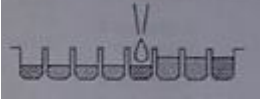
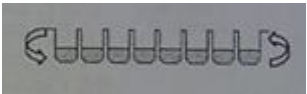
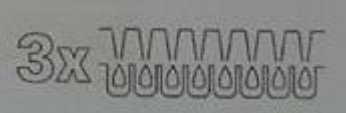
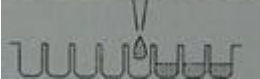
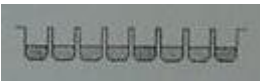
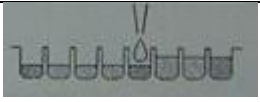
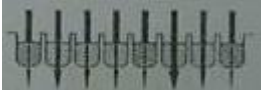


### 3.2.3. Određivanje koncentracije $\alpha$ -amilaze u sline enzimimuno-analizom

	RAZRJEĐIVANJE UZORKA	razrijediti uzorke 1 : 201 npr. 5 $\mu$ l sline s 1 ml pufera	
			jažice obložene antitijelima
	PIPETIRANJE	20 $\mu$ l po jažici	
			kalibracija, kontrole, uzorci
	PIPETIRANJE	100 $\mu$ l po jažici	
			konjugirani enzim
	PIPETIRANJE	100 $\mu$ l po jažici	
			antiserum
1	INKUBACIJA	pokriti jažice 60 minuta na sobnoj temperature (18°C-25°C) pri srednjoj brzini (cca. 400 rpm) na orbitalnom mješaču	
	PRANJE	300 $\mu$ l (man.)/ 450 $\mu$ l (aut.) po jažici vrijeme reakcije 30-60 sekundi po jednom krugu pranja	
	PIPETIRANJE	100 $\mu$ l po jažici	
			kromogen/supstrat
2	INKUBACIJA	15 min na sobnoj temperaturi (18°C- 25°C)	
	PIPETIRANJE	100 $\mu$ l po jažici	
			Stop otopina
	EVALUACIJA	fotometrijsko mjerenje (450 nm)	

Koncentraciju  $\alpha$ -amilaze u slini određivali smo komercijalnim testom Alpha Amylase Saliva ELISA E130607AB (Euroimmun, Lübeck, Njemačka) koji je sadržavao unaprijed sve reagense i standardne otopine i koji je priređen po IVD (engl. In Vitro Diagnostic) direktivi namijenjen upravo određivanju sAA u slini. U radu smo se pridržavali svih uputa proizvođača (Euroimmun rev.2012). Neposredno prije određivanja koncentracije  $\alpha$ -amilaze uzorke sline razrijedili smo s puferom za razrijeđivanje u omjeru 1 : 201 odnosno na 5  $\mu$ L sline dodali smo 1 ml pufera te ih dobro pomiješali na električnoj mješalici. Potom smo odpipetirali zasebno 20  $\mu$ L kalibratora, kontrola i razrijeđenih uzoraka u jažice mikrotitarskih pločica koje su obložene antitijelima. Nakon toga dodali smo u svaku jažicu po 100  $\mu$ L enzim konjugata (sAA obilježena peroskidazom) te 100  $\mu$ L antiseruma (poliklonalna antitijela sAA). Zatim smo jažice pokrili zaštitnom folijom i inkubirali 60 min na sobnoj temperaturi (18°C - 25°C) i uz stalno protresanje na električnoj tresalici (IKA<sup>®</sup> VIBRAX VXR basic, brzinom 400 U/min). Za vrijeme inkubacije dolazi do natjecanja sAA iz uzorka i sAA iz enzim konjugata za slobodna mjesta specifičnih antitijela na mikrotitarskoj pločici. Nakon što je postignuta reakcijska ravnoteža, suvišak slobodnog antigena (sAA) i kompleksa antigen-antiserum ispiru se tri puta sa po 450  $\mu$ L pufera za ispiranje na aparatu za automatsko ispiranje (STAT FAX-2600 - aparat za ispiranje). Trajanje svakog pojedinog ispiranja je između 30 i 60 s. Po postupku ispiranja mikrotitarsku pločicu smo prislonili na apsorberajuću podlogu da iz jažica odstranili svaki suviška pufera za ispiranje. U suhe jažice na čijim stijenkama je preostao samo vezani kompleks antigen-antiserum dodali smo 100  $\mu$ L kromogen supstrata (TMB/ $H_2O_2$ ) i inkubirali 15 min u mraku na sobnoj temperaturi tijekom čega je peroksidaza katalizirala oksidaciju supstrata TMB i formirala obojeni kompleks. Reakciju smo zaustavili dodatkom 100  $\mu$ L stop otopine koja sadrži 0.5 M  $H_2SO_4$ . Razvijena plava boja je dodatkom stop otopine prešla u žutu. Nakon dodatka otopine za zaustavljanje enzimske reakcije količina stvorenog obojenog kompleksa određuje se odčitanjem absorbancija u mikrotitarskoj ploči na automatskom fotometru Humareader prilagođenom za mikrotitarske pločice (Human, Njemačka) uz valnu duljinu 450 nm i sekundarnu korekcijsku valnu duljinu od 630 nm.

### 3.2.4. Određivanje koncentracije kortizola u slini enzimmuno-analizom

			jažice obložene antitijelima	
	PIPETIRANJE	50 $\mu$ l po jažici		kalibracija, kontrole, uzorci
	PIPETIRANJE	100 $\mu$ l po jažici		enzim konjugata
1	INKUBACIJA	pokriti jažice 90 minuta na sobnoj temperature (18°C-25°C) pri srednjoj brzini (cca. 400 rpm) na orbitalnom mješaču		
	PRANJE	300 $\mu$ l (man.)/ 400 $\mu$ l (aut.) po jažici vrijeme reakcije 30-60 sekundi po jednom krugu pranja		
	PIPETIRANJE	100 $\mu$ l po jažici		kromogen/supstrat
2	INKUBACIJA	15 min na sobnoj temperaturi (18°C- 25°C)		
	PIPETIRANJE	100 $\mu$ l po jažici		Stop otopina
	EVALUACIJA	fotometrijsko mjerenje (450 nm)		

Koncentraciju kortizola u slini određivali smo komercijalnim testom Cortisol Saliva ELISA E131106BK (Euroimmun, Lübeck, Njemačka) koji je sadržavao unaprijed sve reagense i standardne otopine i koji je priređen po IVD (engl. In Vitro Diagnostic) direktivi namijenjen upravo određivanju kortizola u slini. U radu smo se pridržavali svih uputa proizvođača (Euroimmun rev. 2012). Najprije smo odpipetirali zasebno 50  $\mu$ L kalibratora, kontrola i razrijeđenih uzoraka u jažice mikrotitarskih pločica koje su obložene antitijelima. Nakon toga dodali smo u svaku jažicu po 100  $\mu$ L enzim konjugata (kortizol obilježen peroksidazom). Zatim smo jažice pokrili zaštitnom folijom i inkubirali 90 min na sobnoj temperaturi (18°C -

25°C) i uz stalno protresanje na električnoj tresalici (IKA® VIBRAX VXR basic, srednjom brzinom 400 r.p.m.). Za vrijeme inkubacije dolazi do natjecanja nepoznate koncentracije kortizola iz uzorka i poznate koncentracije kortizola obilježenog peroksidazom za slobodna vezna mjesta antitijela na mikrotitarskoj pločici. Nakon što je postignuta reakcijska ravnoteža, suvišak slobodnog antigena (kortizola) ispiri se tri puta sa po 450 µL pufera za ispiranje na aparatu za automatsko ispiranje (STAT FAX- 2600 - aparat za ispiranje). Trajanje svakog pojedinog ispiranja je između 30 i 60 s. Po postupku ispiranja mikrotitarsku pločicu smo prislonili na apsorbirajuću podlogu da iz jažice uklonili svaki suviška pufera za ispiranje. U suhe jažice na čijim stijenkama je preostao samo vezani kompleks dodali smo 100 µL kromogen supstrata (TMB/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i inkubirali 15 min u mraku na sobnoj temperaturi tijekom čega je peroksidaza katalizirala oksidaciju supstrata TMB i formirala obojeni kompleks. Reakciju smo zaustavili dodatkom 100 µL stop otopine koja sadrži 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Razvijena plava boja je dodatkom stop otopine prešla u žutu. Nakon dodatka otopine za zaustavljanje enzimske reakcije količina stvorenog obojenog kompleksa određuje se odčitanjem absorbancija u mikrotitarskoj ploči na automatskom fotometru Humareader prilagođenom za mikrotitarske pločice (Human, Njemačka) uz valnu duljinu 450 nm i sekundarnu korekcijsku valnu duljinu od 630 nm.

### 3.2.5. Statističke metode

Za prikaz rezultata i statističku obradu podataka korišteni su računalni programi Excel 2010, Microsoft office (Microsoft USA) i MedCalc v. 12.2.1.0.. (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija). Metodom deskriptivne analize prikazane su karakteristike skupova podataka, Kolmogorov-Smirnovljevim statističkim testom ispitana je normalnost raspodjele.

**Tablica 1. Tumačenje koeficijenta korelacije *r* prema Coltonu**

<b>KOEFICIJENT KORELACIJE (r)</b>	<b>POVEZANOST</b>
<b>0 do ± 0,25</b>	Nema povezanosti
<b>± 0,26 do ± 0,50</b>	Slaba povezanost
<b>± 0,51 do ± 0,75</b>	Umjereno do dobra povezanost
<b>± 0,76 do ± 1</b>	Dobra do izvrsna povezanost

Ako distribucija podataka ne bude slijedila Gaussovu raspodjelu koristi ćemo neparametrijske testove te podatke opisivati medijanom i rasponom izmjerenih vrijednosti. Za ispitivanje povezanosti varijabli koja govori o njihovoj povezanosti korišten je statistički postupak po Pearsonu ili Spearman za parametrijske, odnosno neparametrijske testove s pripadajućim koeficijentom korelacije  $r$  i njegovom statističkom značajnošću  $P$ . Koeficijenti korelacije tumačili smo prema Coltonu (Tablica 1.). Modelom linearne regresije procjenjivali smo ovisnu varijablu prema predikcijskoj na razini statističke značajnosti  $P < 0,05$ . Koeficijentom determinacije ( $R^2$ ) utvrđivali smo u kojoj je mjeri matematički model primjenjiv za predviđanje ovisne varijable. Rezultati su prikazani grafičkim prikazom histograma kojim se može primjetiti da raspodjela podataka ne slijedi Gaussovu krivulju. Zatim, pravcem regresije s jednadžbom  $y = a + bx$ , gdje „a“ predstavlja odsječak na osi  $y$  u kojem pravac siječe ordinatu, a „b“ nagib pravca, tj. porast na osi  $y$  za jedinični porast na osi  $x$ , uz naznačene granice pouzdanosti od 95 % i granice predviđenih vrijednosti od 95 %.

Za usporedbu varijabli korišten je parametrijski  $t$ -test za nezavisne uzoroke ili neparametrijski Mann-Whitney test ovisno o normalnosti raspodjele.

Svi rezultati interpretirat će se na razini statističke značajnosti  $P < 0.05$ .

## 4. Rezultati

### 4.1. Deskriptivna statistika ispitivanih skupina

U Tablici 2. prikazani su rezultati dobiveni određivanjem sAA i kortizola za pojedine skupine, KS studenti Kineziološkog fakulteta i OS ostali studenti. Prikazani su statistički podatci koji uključuju srednje vrijednosti koncentracije sAA i kortizola te pripadajuće standardna devijacija (SD) te medijan, minimum i maksimum, broj ispitanika u pojedinoj skupini i dob ispitanika. Sve rezultate interpretirali smo na razini statističke značajnosti  $P < 0.05$ . Dobivene P vrijednosti pokazuju normalnu distribuciju svih varijabli osim za životnu dob.

U Tablici 3. prikazani su rezultati bodovanja odgovora dijela psihološkog upitnika „Stilovi suočavanja sa stresnim situacijama“ kojem su ispitanici bili podvrgnuti. U tablici su prikazani podaci za KS i OS skupinu i to godine ispitanika, broj ispitanika u pojedinoj skupini, srednja vrijednost, SD, medijan, minimum, maksimum i normalnost distribucije bodovanih odgovora psihološkog upitnika „Stilovi suočavanja sa stresnim situacijama“ za svaku skupinu. Dobiveni rezultati interpretirani su na razini statističke značajnosti  $P < 0.05$ . Dobivene P vrijednosti pokazuju normalnu distribuciju svih varijabli osim za životnu dob i stil suočavanja sa stresom izbjegavanjem za skupinu OS.

Tablica 4. prikazuje rezultate bodovanja odgovora dijela psihološkog testa „Percepcija kvalitete života“ kojem su ispitanici bili podvrgnuti. Tablicom je prikazan ukupan broj ispitanika, dob ispitanika, srednja vrijednost bodovanih odgovora s pridruženim SD, medijanom, minimumom, maksimumom i P vrijednostima za svaku skupinu. Dobiveni rezultati interpretirani su na razini statističke značajnosti  $P < 0.05$ . Dobivene P vrijednosti pokazuju normalnu distribuciju svih varijabli osim za životnu dob.

**Tablica 2. Prikaz rezultata kocentracije sAA i kortizola**

	KS							OS						
	N	$\bar{x} \pm SD$	Medijan	Min	Max	25 - 75P	P	N	$\bar{x} \pm SD$	Medijan	Min	Max	25 - 75 P	P
<b>Dob</b> <b>(godine)</b>	27	21,4±1,31	21,0	20,0	24,0	20,3 - 22,0	0,226	27	23,0±1,56	23,0	19,0	26,0	23,0 - 24,0	0,005
<b>sAA</b> <b>(U/mL)</b>	27	132,1±136,76	101,8	2,9	439,3	3,2 - 222,9	0,159	27	120,5±72,08	120,9	15,3	324,4	78,4 - 165,6	0,146
<b>Kortizol</b> <b>(ng/mL)</b>	27	2,6±1,39	2,8	0,5	6,0	1,6 - 3,7	0,791	27	3,0±1,52	2,8	0,2	5,6	2,1 - 4,3	0,645

KS - Studenti Kineziološkog fakulteta; OS - ostali studenti; N - broj ispitanika;  $\bar{x}$  - srednja vrijednost; SD - standardna devijacija, Min - minimum; Max - maksimum; 25 - 75 P - raspon veličina varijabli od 25 - 75 percentile; P – normalnost distribucije; sAA- salivarna  $\alpha$ -amilaza

**Tablica 3. Prikaz rezultata bodovanja odgovara upitnika „ Stilova suočavanja sa stresnim situacijama“**

	KS							OS						
	N	$\bar{x}\pm SD$	Medijan	Min	Max	25 – 75 P	P	N	$\bar{x}\pm SD$	Medijan	Min	Max	25 - 75 P	P
<b>Dob (godine)</b>	27	21,4±1,31	21,0	20,0	24,0	20,25 - 22,00	0,226	27	23,0±1,56	23,0	19,0	26,0	23,00 - 24,00	0,005
<b>Emocijama usmjereno suočavanje (bodovano odgovori)</b>	27	21,6±8,39	23,0	2,0	33,0	16,50 - 28,50	0,298	27	19,0±8,34	18,0	0,0	39,0	13,00 - 24,25	0,566
<b>Problemu usmjereno suočavanje (bodovani odgovori)</b>	27	48,7±9,54	46,0	31,0	66,0	41,50 - 57,75	0,325	27	42,4±10,27	40,0	23,0	65,0	36,25 - 46,75	0,291
<b>Suočavanje izbjegavanjem (bodovani odgovori)</b>	27	37,9±15,21	38,0	17,0	68,0	24,25 - 51,50	0,147	27	33,0±16,70	32,0	11,0	93,0	21,00 - 41,75	<0,0001

KS - Studenti Kineziološkog fakulteta; OS - ostali studenti; N - broj ispitanika;  $\bar{x}$  - srednja vrijednost; SD - standardna devijacija; Min - minimum; Max - maksimum; 25 - 75 P raspon veličina varijabli od 25 - 75 percentile; P – normalnost distribucije Varijable (emocijama usmjereno suočavanje, problemu usmjereno suočavanje, suočavanje izbjegavanjem) predstavljaju odgovore ispitanika ostvarene u upitniku o kvaliteti života koji su bodovani na ljestvici od 0-4. Upitnik sa ljestvicom bodovanja nalazi se u Prilogu 1.



**Tablica 4. Prikaz rezultata bodovanja odgovora o percepciji kvalitete života**

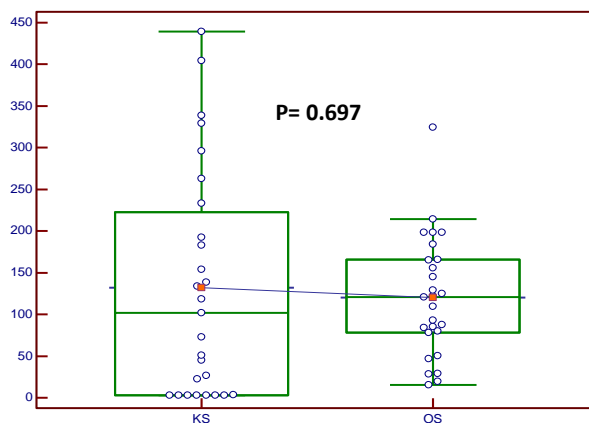
	KS							OS						
	N	$\bar{x} \pm SD$	Medijan	Min	Max	25 - 75 P	P	N	$\bar{x} \pm SD$	Medijan	Min	Max	25 - 75 P	P
<b>Dob (godine)</b>	27	21,4±1,31	21,0	20,0	24,0	20,25 - 22,00	0,226	27	23,0±1,56	23,0	19,0	26,0	23,00 - 24,00	0,005
<b>Fizičko zdravlje (bodovani odgovori)</b>	27	24,1±3,20	23,0	19,0	31,0	22,00 - 26,75	0,580	27	22,6±2,83	23,0	18,0	28,0	21,00 - 24,00	0,852
<b>Okolina (bodovani odgovori)</b>	27	28,3±2,48	27,0	23,0	33,0	27,00 - 31,00	0,711	27	26,1±4,27	26,0	17,0	34,0	23,00 - 28,75	0,851
<b>Socijalni odnosi (bodovani odgovori)</b>	27	10,4±2,98	11,0	3,0	15,0	8,25 - 13,00	0,445	27	11,0±2,17	11,0	6,0	15,0	9,25 - 12,00	0,753
<b>Psihičko zdravlje (bodovani odgovori)</b>	27	21,3±3,31	22,0	13,0	26,0	19,25 - 23,75	0,167	27	21,3±2,55	21,0	17,0	27,0	19,25 - 23,00	0,798

KS - Studenti Kineziološkog fakulteta; OS - ostali studenti; N - broj ispitanika;  $\bar{x}$  - srednja vrijednost; SD - standardna devijacija, Min - minimum; Max - maksimum; 25 - 75 P raspon veličina varijabli od 25 - 75 percentile; P – normalnost distribucije

Varijable ( fizičko zdravlje, okolina, socijalni odnos i psihičko zdravlje) predstavljaju odgovore ispitanika ostvarene u upitniku o kvaliteti života koji su bodovani na ljestvici od 1-5. Upitnik sa ljestvicom bodovanja nalazi se u Prilogu 2.

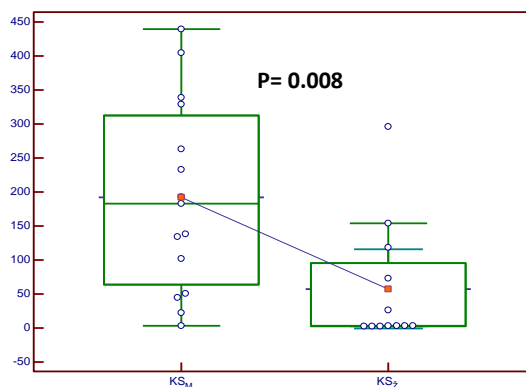
#### 4.2. Usporedba biokemijskih biljega između skupina studenata

Nakon što smo odredili koncentracije sAA i kortizola, usporedili smo njihove vrijednosti kako bismo provjerili da li postoji razlika između skupina. Vrijednosti koncentracija  $\alpha$ -amilaze usporedili smo između obje skupine ( $P = 0,697$ ), između žena i muškaraca KS skupine ( $P = 0.008$ ) te koncentraciju sAA svih ženskih ispitanika i svih muških iz obje skupine ( $P = 0.033$ ). Od dobivenih rezultata, po interpretaciji statističke značajnosti za  $P < 0.05$ , statističku značajnost pokazuje kod koncentracijama sAA među muškarcima i ženama u skupini KS te kod usporedbe svih muškaraca i žena obje skupine. Uspoređivali smo koncentracije kortizola među skupinama neovisno o spolu ( $P = 0.426$ ) zatim žene skupine KS sa ženama iz skupine OS ( $P = 0.241$ ) te koncentracije kortizola među muškarcima KS i OS ( $P = 0,930$ ). Statistički smo interpretirali rezultate prema vrijednosti  $P < 0.05$  te nismo dobili statističku značajnost za vrijednosti kortizola među ovim skupinama. Rezultati tih mjerenja prikazani su na slijedećim slikama gdje centralni zeleni kvadrat obuhvaća vrijednosti od 25 do 75 percentile, središnja crta u kvadratu predstavlja medijan, crvenom točkom označena srednja vrijednost, horizontalne linije se protežu od minimuma do maksimuma isključujući „outside“ i „fal out“ vrijednosti koje se prikazuju kao zasebne točke. Plavom linijom povezane su središnje vrijednosti dviju skupina.



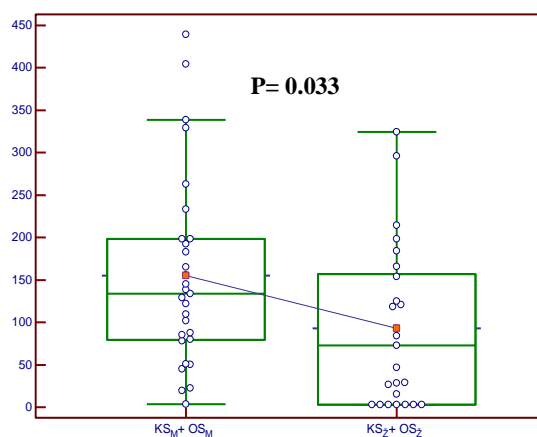
*Slika 4. Prikaz usporedbe koncentracije sAA između KS i OS*

(sAA - salivarna  $\alpha$ -amilaza; KS - studenti Kineziološkog fakulteta; OS - ostali studenti; P - normalnost distribucije)



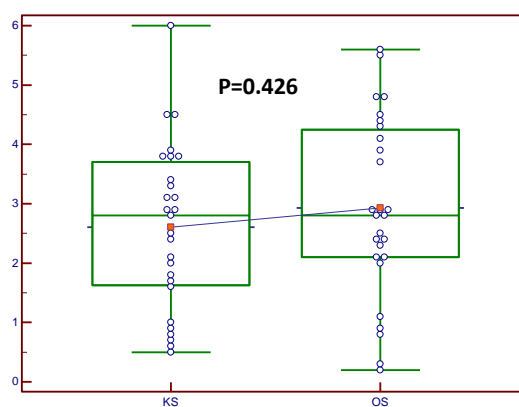
**Slika 5. Prikaz usporedbe koncentracije sAA među spolovima KS**

sAA - salivarna  $\alpha$ -amilaza;  $KS_M$  - studenti Kineziološkog fakulteta;  $KS_Z$  - studentice Kineziološkog fakulteta, P - normalnost distribucije



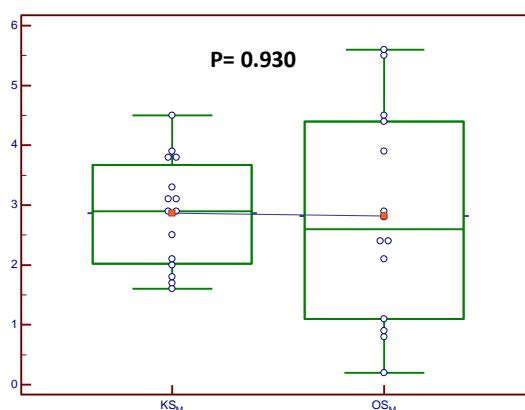
**Slika 6. Prikaz usporedbe koncentracije sAA između muškaraca i žena obje skupine**

sAA - salivarna  $\alpha$ -amilaza;  $KS_M + OS_M$  - svi muški ispitanici;  $KS_Z + OS_Z$  - sve ženske ispitanice; P - normalnost distribucije



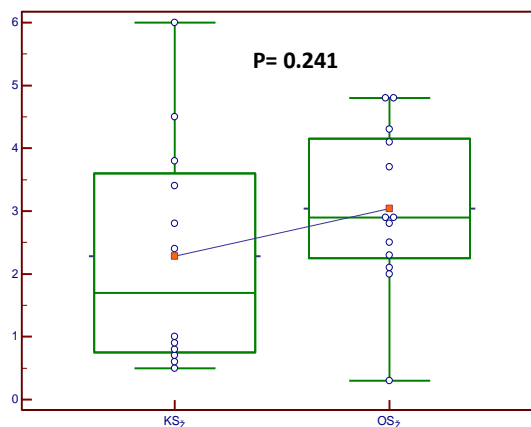
**Slika 7. Prikaz usporedbe koncentracije kortizola između studenata Kineziološkog fakulteta (KS) i ostalih studenata (OS)**

P- normalnost distribucije



**Slika 8. Prikaz usporedbe koncentracije kortizola između muškaraca u obje skupine**

KS<sub>M</sub> - studenti Kineziološkog fakulteta; OS<sub>M</sub> - ostali studenti; P – normalnost distribucije



**Slika 9. Prikaz usporedbe kortizola između žena obje skupine**

KS<sub>Z</sub> - studentice Kineziološkog fakulteta; OS<sub>Z</sub> - ostale studentice; P – normalnost distribucije

### 4.3. Usporedba rezultata psihološkog testiranja između studentskih skupina

Rezultate dobivene rješavanjem psiholoških testova „Upitnik stilova suočavanja sa stresnim situacijama“ i „Upitnika o kvaliteti života“ usporedili smo među skupinama KS i OS kosrištenjem t-testa. Dobivene su statistički značajne vrijednosti za stil Problemu usmjerenom suočavanju ( $P = 0.023$ ) te za Okolina ( $P = 0.023$ ). Ostali rezultati prikazani su u Tablici 5. i za njih nije dobivena statistički značajna vrijednost P.

**Tablica 5. Usporedba rezultata psiholoških testiranja između dvije skupine studenata korištenjem t-testa**

Strategije	KS			OS			P
	N	$\bar{x}$	SD	N	$\bar{x}$	SD	
<b>Rezultati upitnika stilova suočavanja sa stresnim situacijama</b>							
<b>Problemu usmjereno suočavanje</b>	27	21,6	8,39	27	19,0	8,34	0,023
<b>Emocijama usmjereno suočavanje</b>	27	48,7	9,54	27	42,4	10,27	0,253
<b>Suočavanje izbjegavanjem</b>	27	38*	Min 17 Max 68	27	32*	Min 11 Max 93	0,194*
<b>Rezultati upitnika o kvaliteti života</b>							
<b>Fizičko zdravlje</b>	27	24,1	3,20	27	22,6	2,83	0,071
<b>Psihičko zdravlje</b>	27	28,3	2,48	27	26,1	4,27	0,964
<b>Socijalni odnosi</b>	27	10,4	2,98	27	11,0	2,17	0,468
<b>Okolina</b>	27	21,3	3,31	27	21,3	2,55	0,023

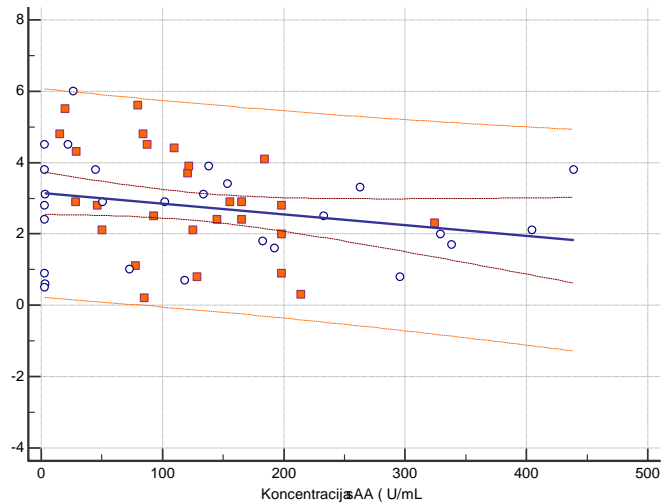
KS - Studenti Kineziološkog fakulteta; OS - ostali studenti;  $\bar{x}$  - srednja vrijednost; SD - standardna devijacija; P – normalnost distribucije; \*rezultati su testirani Mann-Whitney-evim neparametrijskim testom

#### **4.4. Povezanosti biokemijskih i psiholoških pokazatelja suočavanja sa stresom**

##### **Povezanost između kortizola i amilaze**

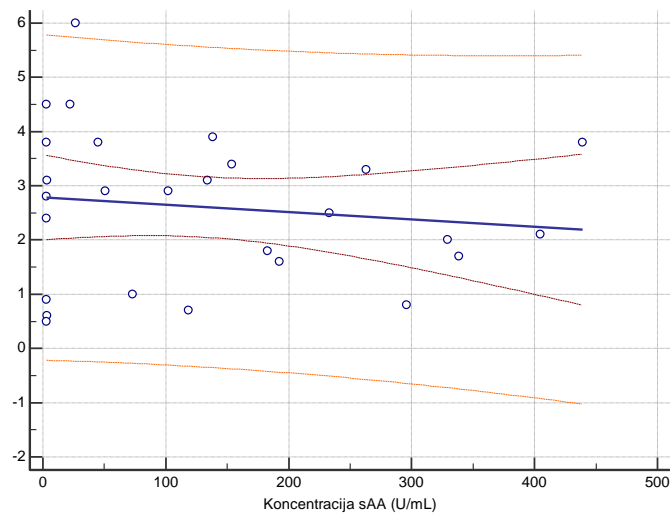
Niže navedene slike prikazuju korelacije sAA i kortizola među skupinama KS i OS te njihove korelacije unutar pojedine skupine matematičkim modelom linearne regresije. Na slikama su narančastom crtama označen je interval prediktivnosti, ljubičastim crtama interval pouzdanosti, a središnja plava crta je pravac regresije. Prema koeficijentu korelacije r prema Coltonu, dobivena je korelacija sAA i kortizola za OS skupinu studenata ( $r = -0.410$ ), ali ta je

korelacija slaba. Međutim, interpretacijom prema statističkoj značajnosti  $P < 0.05$  dobili smo da je naš rezultat statistički značajan jer smo dobili vrijednost  $P = 0.03$ .



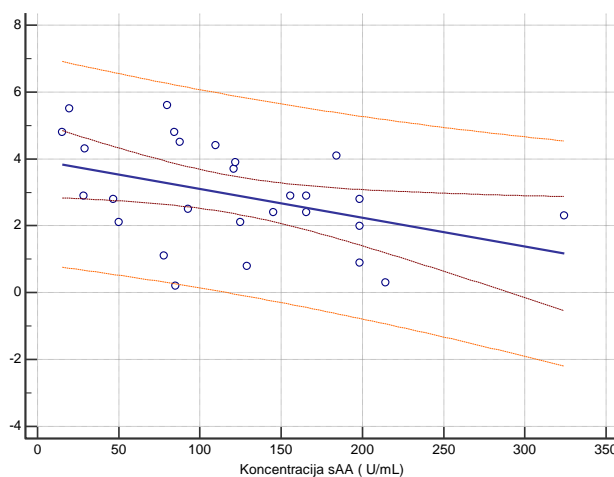
**Slika 10. Korelacija sAA i kortizola između SK(○) i OS (■),  $r = -0.225$ ,  $P = 0.102$**

sAA - salivarna  $\alpha$ -amilaza, SK - studenti Kineziološkog fakulteta; OS - ostali studenti



**Slika 11. Korelacija kortizola i sAA u skupini SK,  $r = -0.133$ ,  $P = 0.507$**

sAA - salivarna  $\alpha$ -amilaza; SK - studenti Kineziološkog fakulteta



**Slika 12. Korelacija kortizola i sAA u skupni OS,  $r = -0.410$ ,  $P = 0.034$**

sAA - salivarnam  $\alpha$ -amilaza, OS - ostali studenti

### **Povezanost između psiholoških pokazatelja**

Za psihološke pokazatelje uočena je korelacija za pojedine varijable, prema koeficijentu korelacije  $r$  prema Coltonu, ali ta je korelacija slaba. Varijable za koje smo dobili slabu povezanost su: usmjerenost suočavanje i fizičko zdravlje ( $r = 0.447$ ) u obje skupine KS i OS te u skupini KS za fizičko zdravlje i usmjerenost izbjegavanje ( $r = -0.448$ ) te socijalni odnosi i usmjerenost izbjegavanje ( $r = -0.475$ ) i u skupni OS za fizičko zdravlje i usmjerenost izbjegavanje ( $r = 0.432$ ). Za varijable usmjerenost suočavanje i psihičko zdravlje kod skupine KS ( $r = +0.535$ ) te dob i izbjegavanje problema kod OS skupine ( $r = -0.512$ ) uočena je umjerena povezanost.

### **Povezanost između biokemijskih i psiholoških pokazatelja**

Između koncentracija sAA i kortizola i psiholoških pokazatelja koji su temeljeni na bodovanju odgovora dvaju psiholoških testova „Upitnik stilova suočavanja sa stresom „ i „Upitnik kvalitete života“ nije pronađena statistički značajna korelacija.

## 5. Rasprava

Posljednih desetak godina slina je postala vrlo popularan laboratorijski uzorak, radi samog načina uzorkovanja koji je u odnosu na dobivanje ostalih uzoraka neinvazivan i brz te se može provesti pod nadzorom bilo koje educirane osobe. Prednost sline u odnosu na urin koji se također dobiva neinvazivnim načinom i sadrži brojne analite (metabolite lijekova, hormone, proteine) je u tome što u njoj nalazimo analite u njihovom aktivnom obliku te zbog toga koncentracije analita određivanih u slini dobro koleriraju s koncentracijama tih analita u serumu/plazmi. Salivarni biomarkeri popularniji su u istraživanjima vezanim za stres jer je dokazano da su bolji od provođenja testiranja biomarkera iz krvi (Yi, Moochhala, 2013.). Napretkom u području imunologije i molekularne biologije znanstvenici su pronašli nove načine analiziranja salivarnih biomarkera i njihove primjene u istraživanjima stresa. sAA i salivarni kortizol odabrani su za biljege kojima je moguće procijeniti razinu stresa jer su mnoga istraživanja pokazala njihovu obećavajuću poprimjenu (Yi, Moochhala, 2013.). O stresu se danas puno govori, drži se da bolest modernog doba i da je odgovoran za nastanak mnogih akutnih i kroničnih bolesti, uključujući sveprisutnije kardiovaskularne, gastrointestinalne, imunološke, psihičke, metaboličke i maligne bolesti. Stres može nastati kao posljedica različitih stresora bilo da su oni psihičke ili fizičke prirode kao npr. buka, intenzivno vježbanje, bavljenje ekstremnim sportovima, fizičko ili psihičko zlostavljanje, nesuglasice u obitelji, s prijateljima ili kolegama. Salivarni kortizol izvrstan je indikator slobodnog kortizola, dobro korelira sa serumskom vrijednošću i odražava slobodnu frakciju kortizola koja je biološki aktivna te mjerenje koncentracija salivarnog kortizola bolje pokazuje adrenokortikalnu funkciju od serumskog kortizola. Stoga se salivarni kortizol često koristi u procjeni stresa. Kako se u potrazi za sličnim neinvazivnim biljegom mentalnog i fizičkog stresa koji će biti pokazatelj aktivacije SAM osovine, najbolje je rezultate pokazala koncentracija sAA čije se lučenje poremeti u stresnim okolnostima. Sekreciju sAA, enzima važnog za probavu ugljikohidrata, snažno neurohumoralno nadzire simpatikus. Stoga je utemeljena pretpostavka da sAA odražava aktivnost simpatikusa. Imajući na umu sve te činjenice odlučili smo se da će naša interesna skupina biti studenti pošto i same pripadamo toj populaciji.

Ovo istraživanje je studentsko istraživanje koje je provedeno na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu te u analitičkom dijelu ELISA tehnikom u KBC Sestre milosrdnice. Odabrali smo studente za naše ispitanike jer nam je to populacijski bliska skupina te nas je zanimalo kako se studenti suočavaju sa stresom i kako ga podnose te koji biokemijski pokazatelji ukazuju



konkretno na to njihovo ponašanje. Istraživanje smo dizajnirali tako da smo odabrali dvije skupine studenata, jednu skupinu studenata činili su fizički aktivni ispitanici II. i III. godine Kineziološkog fakulteta, fakulteta koji imaju redovito svakodnevne i intenzivne tjelesne vježbe kao obavezni dio nastave, a drugu skupinu činili su studenti ostalih fakulteta koji u svoje nastavne aktivnosti nemaju uključenu fizičku aktivnost, kao što su studenti Pravnog fakulteta, Veterinarskog fakulteta, Agronomskog fakulteta, Stomatološkog fakulteta, Filozofskog fakulteta, Fakulteta organizacije i informatike, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Naftno-rudarskog fakulteta, Katoličko-bogoslovnog fakulteta. Ispitanici su najprije bili podvrgnuti psihološkom testiranju koje se sastojalo od dva upitnika „Upitnik kvalitete života“ i „Upitnik stilova suočavanja sa stresom“ te su potom pristupali uzimanju uzorka sline. Uzorkovanje je provedeno prema standardiziranom postupku pomoću sustava Salivetta koji se sastoji od sustava epruveta u kojem se nalazi apsorbirajući jastučić za žvakanje kroz standardiziran period od 1 minute. Prilikom umetanja i vađenja jastučića iz usta, isti se nije dodirivao rukama, već se izravno umetao iz epruvete u usta i obrnuto prilikom završetka uzorkovanja. Htjeli smo pokazati postoji li ikakva razlika ili povezanost među skupinama u biokemijskim pokazateljima ili percepciji stresa, odnosno njihovom odgovoru i spremnosti na stresne situacije. Obzirom da kontinuirane fizičke aktivnosti uzrokuju kronični stres koji se očituje sniženim koncentracijama kortizola i povišenim koncentracijama sAA, očekivali smo da će naša KS skupina imati takve vrijednosti biokemijskih biljega. Za skupni OS međutim smo predviđali obrnute rezultate, ili blago povišene koncentracije kortizola i niže koncentracije sAA u odnosu na KS, kao utjecaj psihičkog stresa prisutnog za vrijeme pripremanja ispita, izlaganja seminarskog rada i sl. Obzirom da je većina radova koje smo koristile kao literaturu imala prikazane rezultate samo fizički aktivnih skupina, odlučile smo istražiti fizički neaktivnu skupinu i usporediti je sa fizički aktivnom, jer psihički stres ima isti učinak kao i fizički stres, a prema već objavljenim radovima postavile smo moguće temelje naših očekivanja.

Vrlo slične studije provedene su proteklih godina kao npr. istraživanje 2014. (Van den Bos i sur., 2014.). Njihovu ispitivanu skupinu činilo je 49 zdravih muškaraca i 34 zdrave žene. Koncentracije salivarnog kortizola pozitivno i snažno koreliraju kod muškaraca u rizičnim situacijama što je značajno različito od slabe negativne povezanosti u rizičnim situacijama kod žena. Za razliku od negativne korelacije s kortizolom kod žena je zapaženo da  $\alpha$ -amilaza pozitivno korelira s rizikom posla koji im je bio zadan.

U istraživanju Wolf i suradnika (Wolf, 2007.) uspoređivana je vrijednost salivarnog kortizola i sAA kod zdrave djece i djece s astmom te je dobiveno da kronični stres i astma uzrokuju povišene vrijednosti salivarnog kortizola i snižene vrijednosti sAA u djece sa astmom u odnosu na zdravu djecu. U istraživanju je sudjelovalo 45 zdravih ispitanika od toga 24 dječaka i 21 djevojčica, te 47 astmatičara od čega 31 dječak i 16 djevojčica.

U literaturi smo pronašli i istraživanje (Hare, 2013.) koje je provedeno na 24 zdrava muškarca podijeljenih u dvije skupine. Prvu skupinu od 11 pripadnika činili su muškarci koji prvi puta skaču s padobranom, a drugu skupinu od 13 pripadnika činili su iskusni padobranc. Mjerene su im koncentracije salivarnog kortizola prije i nakon skoka te je uočeno da nema statistički značajne razlike u koncentracijama salivarnog kortizola između te dvije skupine, ali dobivene su povišene vrijednosti kortizola nakon skoka u obje skupine.

U istraživanju (Van Stegeren, 2008.) u kojem je sudjelovalo 40 zdravih osoba, 11 muškaraca i 29 žena koji su bili izloženi stresu na način da su držali ruku 10-20 minuta u vodi sa kockicama leda. Muškarci su imali više koncentracije sAA od žena za vrijeme istraživanja što ukazuje na razliku koncentracije između spolova. Međutim, ona nije statistički značajna. Također, praćene su na isti način i koncentracije salivarnog kortizola gdje se pokazalo da spol nema utjecaj na koncentracije kortizola, no koncentracije kortizola u odnosu na kontrolnu grupu bile su povišene.

Naše istraživanje je pokazalo da između dvije skupine KS i OS nema statistički značajne razlike između rezultata dobivenih određivanih koncentracija sAA i koncentracija salivarnog kortizola. Statistički značajna razlika pokazala se usporedbom svih muškaraca i žena iz obje skupine te između muškaraca i žena unutar skupine KS za koncentracije sAA. Dobivene vrijednosti koje nisu prema našim očekivanjima pripisujemo malom broju ispitanika, mogućim fiziološkim utjecajima pojedinaca (menstrualni ciklus, uzimanje OC, cirkardijalni ritam kortizola, trudnoća i sl.) niskim koncentracijama analiza zbog kojih i male analitičke pogreške mogu dovesti do značajnih pomaka u stvarnoj koncentraciji. Također, tumačenje rezultata dodatno je otežano nepostojanjem referentnih intervala ili postojanjem referentnih intervala koji se razlikuju među literaturnim podacima. Iako smo imali komercijalno priređene kitove za određivanje sAA i salivarnog kortizola u slini, kod određivanje sAA bilo je potrebno prethodno razrijeđivanje uzoraka 1 : 201 što dodatno može utjecati na točnost dobivenih rezultata ionako niskih koncentracija.

Ostala istraživanja uglavnom pokazuju negativnu korelaciju sAA i salivarnog kortizola, obrnuto su proporcionalni, što su i naši rezultati pokazali, ali ta korelacija nema statističku značajnost, a pretpostavka je da su razlog tomu premale skupine ispitanika.

Naš cilj bio je povezati psihološke pokazatelje putem dva upitnika koja su u konačnici bodovani i statistički obrađeni i povezani s biokemijskim pokazateljima stresa salivarnim kortizolom i sAA. Međutim, nismo dobili statistički značajnu povezanost iako smo očekivali korelaciju između tih parametara na temelju naše predodžbe o skupinama. Hipotetski, KS i OS bi trebali različito percipirati kvalitetu života i reagirati na stresne situacije kao što su fizički i psihički stres. Kronični stres u studenata kineziologije koji smo pretpostavili zbog snažne fizičke aktivnosti, hipotetski bio bi popraćen nižim vrijednostima kortizola, a višim vrijednostima amilaze u usporedbi s ostalim studentima koji nemaju intenzivne fizičke aktivnosti.

## 6. Zaključci

1. Utvrđena je slaba do umjerena negativna povezanost između koncentracija salivarnog kortizola i sAA, ali nije dokazana statistička značajnost. Podjednaka povezanost zapažena je kod svih studenata neovisno o fizičkoj aktivnosti.
2. Najbolja povezanost koncentracije kortizola i sAA i najčvršća statistička značajnost s pokazala se u skupini studenata koji imaju umjerne fizičke aktivnosti. Možda bi povezanost bila čvršća da je ispitivana skupina bila veća od 27 ispitanika.
3. Nema statistički značajne povezanosti između biokemijskih pokazatelja stresa i rezultata dobivenih metodom psihološkog testiranja. Aktivnije i pozitivnije suočavanje sa stresnim stanjima zapaženo je kod studenata kineziologije na temelju jedne domene psihološkog testiranja stilova suočavanja sa stresnim situacijama.
4. Usporedbom biokemijskih i psiholoških pokazatelja u odnosu na stres zaključujemo da su dvije skupine studenata izjednačene te da ne nalazimo objektivno uporište po kojem bismo mogli jednoj skupini pripisati kronični stres. Unatoč bitno različitim fizičkim aktivnostima nije utvrđena razlika između studentskih populacija.
5. Razine koncentracije kortizola i amilaze nisu se mogle ocijeniti u odnosu na referentne intervale jer istraživanja, iako mnogobrojna, daju različite rezultate za zdravu populaciju.

## **7. Zahvale**

Posebno zahvaljujemo našoj mentorici prof.dr.sc. Nadi Vrkić na uloženom trudu, strpljenju te brojnim korisnim savjetima pri pisanju ovog rada.

Zahvaljujemo zagrebačkim tvrtkama KEMOLAB d.o.o. i INEL - medicinska tehnika d.o.o. te tvrtki Euroimmun iz Njemačke koje su nam pomogle donacijama reagensa i pribora. Osobito zahvaljujemo magistrama iz navedenih tvrtki, Elviri Rajak i Terezi Maršić, koje su osobnim zalaganjem učinile da imamo reagense i provedemo ovo istraživanje.

Zahvaljujemo prof. dr. sc. Tihani Žanić Grubišić što nam je omogućila korištenje laboratorija na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju, gdje smo proveli uzimanje uzoraka te prvu obradu faze uzoraka, odnosno centrifugiranje i pohranjivanje uzoraka. Također se zahvaljujemo tehničarkama, Suzani Hrajnik i Vesni Boričević, Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju, na pomoći oko obrade i pripreme uzoraka.

Zahvaljujemo se dipl. kliničkom psihologu Josipi Gelo, koja je odabrala i prilagodila psihološke testove za našu skupinu ispitanika, te nas je savjetovala u provođenju psihološkog testiranja i interpretaciji rezultata psihološkog testiranja.

Zahvaljujemo i svim našim ispitanicima bez kojih ovo istraživanje ne bi bilo moguće provesti.

## 8. Popis literature

1. Aardal E, Holm A. Cortisol in saliva – Reference ranges in relation to cortisol in serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1995;33:927-32.
2. Anđić J. Oralna homeostaza, Rijeka, Nauka; 2000, str. 2-14.
3. Arambašić L. Provjera nekih postavki Lazarusovog modela stresa i načina suočavanja sa stresom, Doktorska disertacija, Filozofski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 1994.
4. Arhakis A, Karagiannis V, Kalfas S. Salivary alpha-amylase activity and salivary flow rate in young adults. *Open Dent J.* 2013;7:7-15.
5. Axelsson P. Diagnosis and risk prediction of dental caries. Quintessence books. 2000.
6. Carver C, Scheier MF, Weintraub JK. Assessing coping strategies: A Theoretically Based Approach. *J Pers Soc Psychol.* 1989;56:267-283.
7. Dickmeis T. Glucocorticoids and the circadian clock. *J Endocrinol.* 2009;200:3-22.
8. Dorn LD, Lucke JF, Loucks TL, Berga SL. Salivary cortisol reflects serum cortisol: Analysis of circadian profiles. *Ann Clin Biochem.* 2007; 44: 281-84.
9. Endler NS, Parker JDA. Multidimensional assesment of coping : A critical evaluation. *J Pers Soc Psychol.* 1990;101:139-152.
10. Gröschl M. Current Status of Salivary Hormone Analysis. *Clin Chem.* 2008;54:11, 1759-1769.
11. Havelka M, Zdravstvena psihologija, Zagreb, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1995.
12. Hellhammer DH, Wust S, Kudielka BM. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrino.* 2009;34:163-71.
13. <http://cvi.asm.org/content/5/4/419.full> , pristupljeno 29.4.2014.
14. <http://www.zdravljeizprirode.hr/tema.php?id=19>, pristupljeno 25.04.2014.
15. Hudek-Knežević J, Kardum I. Psihosocijalne odrednice tjelesnog zdravlja, Stres i tjelesno zdravlje, Naklada Slap, Sveučilište u Rijeci, 2005.
16. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent.* 2001;85:162-169.
17. Kudielka BM, Hellhammer DH, Wüst S. Why do we respond so differently? Reviewing determinants of human salivary cortisol responses to challenge. *Psychoneuroendocrino.* 2009; 34: 2-18.
18. Lazarus RS. Psychological stress and coping process. New York: McGraw-Hill. 1996.

19. Lazarus RS. From psychological stress to the emotions. A history of changing outlooks. *Annual Review of Psychology*. 1993;44:1-21.
20. Marković M, Slina: uзорak u temeljnim i kliničkim istraživanjima, Zagreb, 2013.
21. Šupe S, Poljaković Z, Kondić Lj, Unušić L, Alvir D. Neurološke osnove stresa i rizik razvoja moždanog udara. *Neurol. Croat.* Vol. 60. 1. 2011; 21-28.
22. Belak Kovačević S. Stres i suočavanje kod ovisnika o opijatima, Zagreb, 2004.
23. Scannapieco FA, Torres G, Levine MJ. Salivary  $\alpha$ -amylase: Role in dental plaque and caries formation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4:301-7.
24. Schenkels LC, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1995;6:161-75.
25. Ten Cate AR. Oral histology: development, structure and function. Mosby-Year book;1998.
26. Uputstvo za upotrebu, EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Alpha-Amylase Saliva ELISA, REVISED 16 January 2012.
27. Uputstvo za upotrebu, EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Cortisol Saliva ELISA, REVISED 4 April 2012.
28. Van den Bos R, Taris R, Scheppink B, deHaan L, Verster JC. Salivary cortisol and alpha-amylase levels during an assessment procedure correlate differently with risk-taking measures in male and female police recruits. *Behav Neurosci*. 2014;7:1-10.
29. Vurnek-Živković M. Psihološki status i percepcija bolesti u bolesnika s melanomom. Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2011.
30. WHOQOL User Manual, Division of mental health and prevention of substance abuse, World health organisation 1998.
31. Wolf JM, Nicholls E, Chen E. Chronic stress, salivary cortisol, and  $\alpha$ -amylase in children with asthma and healthy children. *Biol Psychol*. 2008;78:20-8.
32. Yia TC, Mochhalab S. Mini-Review Article – Current Opinion on Salivary Biomarkers as a Measurement for Stress and Fatigue. *The Open Biomarkers Journal*. 2013;6: 9-14.
33. Hare AO, Wetherell MA, Smith MA. State anxiety and cortisol reactivity to skydiving in novice versus experienced skydivers. *Physiol Behav*. 2013; 118:40-44.
34. Van Stegeren A, Wolf OT, Kindt M. Salivary alpha amylase and cortisol responses to different stress tasks: Impact of sex. *Int J Psychophysiol*. 2008; 69:33-40.

35. Windle M, Windle RC. Coping strategies, drinking motives, and stressfull life events among middle Adolescents. *J Abnorm Psychol.* 1996; 105: 551-560.



## 9. Sažetak

Slina je tjelesna tekućina složenog sastava koja ima razne funkcije u usnoj šupljini. SŽS ima najznačajniju ulogu u regulaciji salivacije. Slina kao uzorak pogodna je zbog jednostavnosti uzorkovanja, a u njoj se analiti nalaze u slobodnom tj. aktivnom obliku. Stres je stanje u kojem je poremećena unutrašnja (psihofiziološka) ravnoteža organizma. Aktivira osovinu hipotalamus–hipofiza-kora nadbubrežne žlijezde pa je salivarni kortizol indikator slobodnog kortizola, dobro korelira sa serumskom vrijednošću i odražava slobodnu frakciju koja je biološki aktivna. Istovremeno, stresna stanja stimuliraju simpatički neuronski sustav što uzrokuje promjenu sekrecije sAA iz salivarnih žlijezda.

Hipoteza ovog istraživanja bila je da su studenti sa svakodnevnom intenzivnom fizičkom aktivnošću izloženi kroničnom stresu u odnosu na druge studente koji imaju minimalne fizičke aktivnosti. U istraživanje je bilo uključeno 54 zdravih dobrovoljaca (N = 54), studenata Sveučilišta u Zagrebu, podijeljenih u dvije skupine, jednu skupinu dobrovoljaca činili su fizički aktivni dobrovoljci (N = 27) sa Kineziološkog fakulteta - SK, a drugu skupinu činili su fizički neaktivni dobrovoljci (N = 27) sa ostalih fakulteta - OS. Skupina ispitanika bila je ujednačena po spolu, u prvoj skupini fizički aktivnih ispitanika bilo je 15 muškaraca i 12 žena, a u drugoj skupini fizički neaktivnih ispitanika bilo je 14 muškaraca i 13 žena, u dobi od 19 do 26 godina.

Utvrđena je slaba do umjerena negativna povezanost između koncentracija salivarnog kortizola i sAA, ali nije dokazana statistička značajnost. Podjednaka povezanost zapažena je kod svih studenata neovisno o fizičkoj aktivnosti. Najbolja povezanost koncentracije kortizola i sAA i najčvršća statistička značajnost pokazala se u skupini studenata koji imaju umjerene fizičke aktivnosti. Nije utvrđena statistički značajna povezanost između biokemijskih pokazatelja stresa i rezultata dobivenih metodom psihološkog testiranja. Aktivnije i pozitivnije suočavanje sa stresnim stanjima zapaženo je kod studenata kineziologije na temelju jedne domene psihološkog testiranja stilova suočavanja sa stresnim situacijama. Usporedbom biokemijskih i psiholoških pokazatelja u odnosu na stres zaključujemo da su dvije skupine studenata izjednačene te da ne nalazimo objektivno uporište po kojem bismo mogli jednoj skupini pripisati kronični stres. Unatoč bitno različitim fizičkim aktivnostima nije utvrđena razlika između studentskih populacija.

Ključne riječi: slina, stres, kortizol, amilaza, psihološko testiranje

## 10. Summary

Saliva is a oral fluid of complex composition that has a variety of functions in the oral cavity. CNS has the most important role in the regulation of salivation. Saliva as a sample is suitable for easy sampling and analytes are found in free, active form. Stress is a condition in which is disturbed inner (psychophysiological) balance of the organism. Activates the hypothalamic - pituitary - adrenal cortex and salivary cortisol is an indicator of free cortisol, correlates well with serum free value and the reflected fraction is biologically active. At the same time, stressful situation stimulate the sympathetic neural system which causes a change in the secretion of salivary gland sAA.

The hypothesis of this study was that students with intensive daily physical activity are exposed to chronic stress compared to other students who have a minimum of physical activity. The study included 54 healthy volunteers (N = 54), students of the University of Zagreb, divided into two groups, one group of volunteers is consisted from physically active volunteers (N = 27) with the Faculty of Kinesiology - SK and the second group is consisted from physically inactive volunteers (N = 27) with other faculties - OS. A group of respondents was balanced by gender and the first group of physically active subjects included 15 men and 12 women, while the second group of physically inactive respondents composed of 14 men and 13 women, aged 19 - 26 years.

There was a weak to moderate negative correlation between the concentration of salivary cortisol and sAA, but not statistically significant. Equal correlation was observed for all students regardless of physical activity. The best correlation between cortisol and sAA and the strongest statistical significance showed a group of students who have moderate physical activity. There was no statistically significant correlation between biochemical indicators of stress and results obtained using psychological testing. Actively and positively coping with stressful situations is observed in physical education students on the basis of a single domain, psychological testing, coping with stressful situations. A comparison of biochemical and physiological parameters in relation to stress, we conclude that the two groups of students equal and that we find no objective basis on which we could be attributed to one group of chronic stress. Despite the very different physical activities no difference between student population.

Key words : saliva, stress, amilase, cortisol, psychological testing

## **11. Životopis**

**Renata Lipovec** – rođena sam 8. svibnja 1989. godine u Varaždinu. Završila sam IV. Osnovnu školu u Varaždinu 2004. godine. Srednju Medicinsku školu Varaždin, smjer zdravstveno-laboratorijski tehničar završila sam 2008. godine te iste godine upisala Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu, smjer Medicinska biokemija. Sudjelovala sam na simpoziju FARMEBS 2012. i 2013. godine u Zagrebu, stručnom usavršavanju Paratiroideja – multidisciplinarni pristup u dijagnostici, praćenju uspješnosti operacije i terapije 2013. godine u Zagrebu te na studentskom međunarodnom znanstvenom kongresu CROSS 10 2014. godine.

**Marija Radiček**- rođena sam 13. siječnja 1990. godine u Koprivnici. Završila sam osnovnu školu Kalnik 2004. godine u Kalniku. Po završetku osnovne škole upisala sam Opću gimnaziju Ivana Zakmardija Dijankovečkoga u Križevcima. Završetkom gimnazije 2008. godine upisala sam Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu, studij medicinske biokemije. Sudjelovala sam u akademskoj godini 2012./2013. na studentskom simpoziju FARMEBS te na stručnom usavršavanju Paratireoideja-multidisciplinarni pristup u dijagnostici, praćenju uspješnosti operacije i terapije. U akademskoj godini 2013./2014. sudjelovala sam na studentskom međunarodnom znanstvenom kongresu CROSS 10. U tijeku studiranja stekla sam status stipendistice Zaklade Hrvatske gospodarske komore odsjeka u Koprivnici.

## 12. Prilozi

### 12.1. Prilog 1: Upitnik stilova suočavanja sa stresnim situacijama

#### UPITNIK STILOVA SUOČAVANJA SA STRESNIM SITUACIJAMA

ZANIMA NAS ŠTO LJUDI OBIČNO ČINE I ŠTO DOŽIVLJAVAJU KADA SE SUOČAVAJU SA STRESNIM SITUACIJAMA U SVAKODNEVNOM ŽIVOTU. Molimo Vas da razmislite o različitim neugodnim – stresnim situacijama u kojima ste Vi u sukobu ili sa samim sobom ili sa ljudima oko Vas i o Vašim **najčešćim reakcijama** na takve situacije.

Na svaku tvrdnju odgovorite tako da zaokružite jedan od pet ponuđenih odgovora. Molimo vas da odgovorite na svaku tvrdnju posebno. Neke tvrdnje su slične, pa ipak odgovorite na svaku od njih. Ovdje nema «dobrih» i «loših» odgovora, odaberite onaj koji je za Vas najtočniji, a ne onaj koji je po Vašem mišljenju točan za «većinu ljudi».

#### OZNAČITE ŠTO VI OBIČNO ČINITE I PROŽIVLJATE U KONFLIKTNIM STRESNIM SITUACIJAMA!

	NIKADA se tako ne ponašam	KATKADA se tako ponašam	OBIČNO se tako ponašam	ČESTO se tako ponašam	UVIJEK se tako ponašam
1. Takve situacije nastojim iskoristiti kao vrijedna životna iskustva.	0	1	2	3	4
2. Uznemiren/a sam i otvoreno iskazujem svoje osjećaje.	0	1	2	3	4
3. obraćam se nekome za savjet o tome što da radim.	0	1	2	3	4
4. Svom snagom pokušavam učiniti nešto u vezi s tim problemima.	0	1	2	3	4
5. Sam/a sebe uvjeravam sa to nije istina, da to nije moguće.	0	1	2	3	4
6. Uzdam se u Boga.	0	1	2	3	4
7. Nastojim pronaći šaljivu stranu takvih situacija.	0	1	2	3	4
8. Priznajem si da to ne mogu riješiti, pa prestajem pokušavati.	0	1	2	3	4

9. Trudim se da ne reagiram prebrzo.	0	1	2	3	4
10. Razgovaram sa nekim o svojim osjećajima.	0	1	2	3	4
11. Popijem alkoholno piće, pilule za smirenje ili uzmem drogu kako bih se bolje osjećao/la.	0	1	2	3	4
12. Pokušavam se priviknuti na nastale situacije.	0	1	2	3	4
13. Razgovaram sa nekim kako bih se bolje snašao/la.	0	1	2	3	4
14. Nastojim sa me ne ometaju misli i aktivnosti koje nisu u vezi s tim situacijama.	0	1	2	3	4
15. Maštam o drugim stvarima.	0	1	2	3	4
16. Nadam se božjoj pomoći.	0	1	2	3	4
17. Planiram različite postupke kojima bih uspio/la riješiti te probleme.	0	1	2	3	4
18. Prihvaćam da se to dogodilo ( događa) i da se ne može promijeniti.	0	1	2	3	4
19. Ne činim ništa dok to situacije ne dozvole	0	1	2	3	4
20. Pokušavam dobiti emocionalnu podršku od rodbine i prijatelja.	0	1	2	3	4
21. Jednostavno odustajem od pokušaja da ostvarim svoje ciljeve.	0	1	2	3	4
22. Probleme pokušavam riješiti na druge načine	0	1	2	3	4
23. Pokušavam se opustiti pa popijem piće, neku pilulu za smirenje ili uzmem drogu.	0	1	2	3	4
24. Jednostavno odbijam vjerovati da se to dogodilo	0	1	2	3	4
25. Otvoreno iskazujem svoja osjećanja.	0	1	2	3	4
26. Pokušavam takve događaje sagledati u drugom svijetlu i učiniti da izgledaju povoljnije.	0	1	2	3	4
27. Pokušavam smisliti kako se ti problemi mogu riješiti na druge načine.	0	1	2	3	4
28. Koncentriram se na rješavanje tih problema i, ako je to potrebno, druge stvari ostavljam postrani.	0	1	2	3	4
29. Tražim od nekog suosjećanje i razumijevanje.	0	1	2	3	4

30. Pijem alkohol, uzimam pilule za smirenje ili drogu kako bih o tim situacijama što manje razmišljao/la.	0	1	2	3	4
31. Šalim se na račun toga	0	1	2	3	4
32. Odustajem od pokušaja da postignem ono što želim	0	1	2	3	4
33. Pokušavam sagledati bolju stranu takvih situacija	0	1	2	3	4
34. Razmišljam kako na najbolji način mogu riješiti te probleme.	0	1	2	3	4
35. Pravim se kao da se ništa nije dogodilo.	0	1	2	3	4
36. Ne reagiram prenamo da probleme još više ne otežam.	0	1	2	3	4
37. Trudim se da me druge stvari ne ometaju pri rješavanju tih problema.	0	1	2	3	4
38. Idem u kino ili gledam TV kako bih što manje o tome razmišljao/la.	0	1	2	3	4
39. Prihvaćam realnosti takvih situacija.	0	1	2	3	4
40. Pitam ljude sa sličnim iskustvima što bi oni u takvim situacijama učinili.	0	1	2	3	4
41. Teško mi je i to jasno pokazujem.	0	1	2	3	4
42. Utjehu pronalazim u religiji.	0	1	2	3	4
43. Čekam pravi trenutak da nešto u vezi s tim problemom uradim.	0	1	2	3	4
44. Ismijavam te situacije.	0	1	2	3	4
45. Sve se manje trudim oko rješavanja tih problema.	0	1	2	3	4
46. Pričam s nekim ljudima o tome kako se osjećam.	0	1	2	3	4
47. Posežem za alkoholom, pilulama ili drogom koje mi pomažu da prebrodim te probleme.	0	1	2	3	4
48. Učim se živjeti sa tim problemima.	0	1	2	3	4
49. Ostavljam po strani sve druge aktivnosti i usmjeravam se na te probleme.	0	1	2	3	4
50. Razmišljam o koracima koje valja poduzeti kako	0	1	2	3	4

bi se ti problemi riješili.					
51. Ponašam se kao da se to nije ni dogodilo.	0	1	2	3	4
52. Postepeno radim ono što mislim da treba učiniti u vezi s tim problemima.	0	1	2	3	4
53. Učim iz iskustva.	0	1	2	3	4
54. Molim se Bogu više nego obično.	0	1	2	3	4
55. Pojačano se bavim fizičkim aktivnostima.	0	1	2	3	4
56. Ulažem dodatni napor da riješim te probleme.	0	1	2	3	4
57. Glumim sigurnost i smirenost.	0	1	2	3	4
58. Povlačim se u sebe.	0	1	2	3	4
59. Tražim novi izlaz iz tih problema.	0	1	2	3	4
60. Suzdržavam svoje osjećaje.	0	1	2	3	4
61. Izbjegavam društvo i razgovore kako bih razmislio/la o tom problemu.	0	1	2	3	4
62. Želim biti sam/a.	0	1	2	3	4
63. Pitam ljude što bi učinili na mome mjestu.	0	1	2	3	4
64. Pušim više nego obično ne bi li se smirio/la.	0	1	2	3	4
65. Radim sve samo da ne razmišljam o tom problemu.	0	1	2	3	4
66. Bavim se bilo kakvim aktivnostima samo da bih se rastresao/la.	0	1	2	3	4
67. Skrivam svoje osjećaje.	0	1	2	3	4
68. Pravim se kao da mi sve to ništa ne znači.	0	1	2	3	4
69. Šećem po svježem zraku.	0	1	2	3	4
70. Izbjegavam kontakte s drugim ljudima.	0	1	2	3	4
71. Nadam se da će netko drugi riješiti tu situaciju.	0	1	2	3	4

## 12.2. Prilog 2: Upitnik kvalitete života

### UPITNIK KVALITETE ŽIVOTA (WHOQOL – BREF)

Sljedeća pitanja odnose se na vaš osjećaj kvalitete života, zdravlja i drugih područja u vašem životu. Molim vas izaberite odgovor koji se najviše odnosi na vas. Ako niste sigurni koji odgovor dati, obično je prvi odgovor najbolji. Molimo vas da imate na umu vaše standarde u životu, nade, zadovoljstva i brige.

Što mislite o svom životu unatrag zadnja 4 tjedna.

Sljedeća pitanja odnose se na to kako ste doživjeli određene stvari u protekla 4 tjedna...

		Uopće ne	Malo	Osrednje	Puno	Izrazito puno
WH1	Do koje mjere osjećate da vas fizička bol sprečava u stvarima koje trebate obaviti?	1	2	3	4	5
WH2	Koliko vam je potrebno medicinsko liječenje da možete funkcionirati u svakodnevnom životu?	1	2	3	4	5
WH3	Koliko uživate u životu?	1	2	3	4	5
WH4	Do koje mjere doživljavate svoj život smislenim?	1	2	3	4	5
WH5	Koliko dobro se uspijevate koncentrirati?	1	2	3	4	5
WH6	Koliko se osjećate sigurni u svom svakodnevnom životu?	1	2	3	4	5
WH7	Koliko je zdravo vaše fizičko okruženje?	1	2	3	4	5
WH8	Imate li dovoljno energije za svoj svakodnevni život?	1	2	3	4	5
	Jeste li u stanju prihvatiti vaš izgled tijela?	1	2	3	4	5
	Imate li dovoljno novaca za svoje potrebe?	1	2	3	4	5
	Koliko su vam dostupne informacije u svakodnevnom životu?	1	2	3	4	5
	Do koje mjere imate mogućnosti za aktivnosti u slobodnom vremenu?	1	2	3	4	5



		Jako loše	Loše	Ni loše ni dobre	Dobro	Jako dobro
	Koliko dobro se snalazite općenito u životu?	1	2	3	4	5
	Kako biste odredili Vašu kvalitetu života?	1	2	3	4	5
<b>Sljedeće pitanje odnosi se na to koliko ste često osjetili ili iskusili određene stvari u proteklih 4 tjedna...</b>						
		Nikad	Rijetko	Prilično često	Vrlo često	Uvijek
	Koliko često imate negativne osjećaje poput neraspoloženja, očaja, tjeskobe ili depresije?	1	2	3	4	5
		Izrazito nezadovoljan	Nezadovoljan	Niti zadovoljan niti nezadovoljan	Zadovoljan	Izrazito zadovoljan
	Koliko ste zadovoljni svojim zdravljem?	1	2	3	4	5
	Koliko ste zadovoljni kako spavate?	1	2	3	4	5
	Koliko ste zadovoljni svojom mogućnosti da provedete svakodnevne aktivnosti?	1	2	3	4	5
	Koliko ste zadovoljni svojim kapacitetima za rad?	1	2	3	4	5
	Koliko ste zadovoljni sobom?	1	2	3	4	5
	Koliko ste zadovoljni svojim odnosima i vezama?	1	2	3	4	5
	Koliko ste zadovoljni svojim seksualnim životom?	1	2	3	4	5
	Koliko ste zadovoljni podrškom koju dobivate od prijatelja?	1	2	3	4	5
	Koliko ste zadovoljni uvjetima svog životnog prostora?	1	2	3	4	5
	Koliko ste zadovoljni pristupom zdravstvenim uslugama?	1	2	3	4	5

### 12.3. . Prilog 3: Način bodovanja upitnika o kavaliteti života

Iz originalnog upitnika koji ima 26 pitanja izbačeno je pitanje br. 25 - o prometu. Ispred pitanja su navedeni brojevi i ukoliko se po tim brojevima zbrajaju rezultati, konačni skor bi trebao biti točan. Boduje se percepcija kvalitete života u svakoj od 4 domene upitnika

posebno (fizičko zdravlje, psihološko stanje, socijalni odnosi, te okoliš), pri čemu je skala usmjerena pozitivno, što znači da veći broj bodova predstavlja veću kvalitetu života.

3	Do koje mjere osjećate da vas fizička bol sprečava u stvarima koje trebate obaviti?
4	Koliko vam je potrebno medicinsko liječenje da možete funkcionirati u svakodnevnom životu?
5	Koliko uživate u životu?
6	Do koje mjere doživljavate svoj život smislenim?
7	Koliko dobro se uspijevate koncentrirati?
8	Koliko se osjećate sigurni u svom svakodnevnom životu?
9	Koliko je zdravo vaše fizičko okruženje?
10	Imate li dovoljno energije za svoj svakodnevni život?
11	Jeste li u stanju prihvatiti vaš izgled tijela?
12	Imate li dovoljno novaca za svoje potrebe?
13	Koliko su vam dostupne informacije u svakodnevnom životu?
14	Do koje mjere imate mogućnosti za aktivnosti u slobodnom vremenu?
15	Koliko dobro se snalazite općenito u životu?
1	Kako biste odredili Vašu kvalitetu života?

26	Koliko često imate negativne osjećaje poput neraspoloženja, očaja, tjeskobe ili depresije?
2	Koliko ste zadovoljni svojim zdravljem?
16	Koliko ste zadovoljni kako spavate?
17	Koliko ste zadovoljni svojom mogućnosti da provedete svakodnevne aktivnosti?
18	Koliko ste zadovoljni svojim kapacitetima za rad?
19	Koliko ste zadovoljni sobom?
20	Koliko ste zadovoljni svojim odnosima i vezama?
21	Koliko ste zadovoljni svojim seksualnim životom?
22	Koliko ste zadovoljni podrškom koju dobivate od prijatelja?
23	Koliko ste zadovoljni uvjetima svog životnog prostora?
24	Koliko ste zadovoljni pristupom zdravstvenim uslugama?

<b>Domain 1</b> <b>Fizičko zdravlje</b>	Q3 + Q4 + Q10 + Q15 + Q16 + Q17 + Q18
<b>Domain 2</b> <b>Psihičko zdravlje</b>	Q5 + Q6 + Q7 + Q11 + Q19 + Q26
<b>Domain 3</b> <b>Socijalni odnosi</b>	Q20 + Q21 + Q22
<b>Domain 4</b> <b>Okolina</b>	Q8 + Q9 + Q12 + Q13 + Q14 + Q23 + Q24