

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Matea Ćurčić i Maja Lukić

**UTJECAJ AKUTNE BOLI NA OSMOTSKI TLAK I
KONCENTRACIJU KORTIZOLA U SUZAMA**

Zagreb, 2014.

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

Rad je izrađen u sklopu znanstvenog projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta: Hemoreološki poremećaji u kroničnim bolestima (134-0061245-0205).

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1. Anatomija oka	1
1.1.1. Očna jabučica, <i>bulbus oculi</i>	1
1.1.2. Vidni put, <i>tractus opticus</i>	2
1.1.3. Pomoćni aparat oka, <i>organa oculi accesoria</i>	2
1.2. Strukture koje sudjeluju u tvorbi, izlučivanju i odvodnji suza, <i>apparatus lacrimalis</i>	3
1.3. Biokemija suznog filma	4
1.3.1. Lipidni sloj	4
1.3.1.1. Funkcija lipidnog sloja	4
1.3.2. Vodeni sloj	4
1.3.2.1. Svojstva i funkcija vodenog sloja	4
1.3.3. Mukozni sloj	5
1.3.3.1. Svojstva i funkcija mukoznog sloja	6
1.3.4. Inervacija suzne žlijezde	6
1.4. Stres i tipovi stresa	7
1.4.1. Bol kao oblik stresa	8
1.4.2. Biljezi stresa	8

1.4.3. Kortizol	8
1.5. Mjerenje osmotskog tlaka	9
1.5.1. Definicija osmolarnosti i osmolalnosti	9
1.5.1.1. Osmolarnost u suzama	10
1.5.2. Definicija osmometrije	10
2. Opći i specifični ciljevi	11
3. Materijali i metode	12
3.1. Ispitanici	12
3.2. Uzorkovanje suza	12
3.2.1. Metoda uzorkovanja suza	12
3.2.2. Metoda odvajanja suza od filter papira	13
3.3. Određivanje koncentracije kortizola u suzama enzimimunoanalizom (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ; ELISA)	13
3.4. Mjerenje osmotskog tlaka u suzama	14
3.5. Statističke metode	15
4. Rezultati	17
4.1. Opisna statistika	17
4.2. Usporedba mjerenja prije i nakon akutne boli	18
4.3. Povezanost osmotske koncentracije i koncentracije kortizola	20
5. Rasprava	24

6. Zaključci	27
7. Zahvale	28
8. Popis literature	29
9. Sažetak	33
10. Summary	34
11. Životopis	35

Popis kratica

IgA, IgD, IgE, IgG, IgM - imunoglobulin A, D, E, G, M

LDH - laktat dehidrogenaza

PK - piruvat kinaza

MDH - malat dehidrogenaza

PTSP - posttraumatski stresni poremećaj

HHA-os - hipotalamusno- hipofizno- adrenalna os

DHEA - dehidroepiandrosteron

CRH - kortikotropin oslobađajući hormone

sIgA - sekretorni imunoglobulin A

ACTH - adrenokortikotropni hormon

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

IVD - *in vitro* dijagnostika (engl. *In Vitro Diagnostic*)

TMB - tetrametilbenzidin

A - uzorci suza prije akutne boli

B - uzorci suza nakon akutne boli

1. UVOD

1.1. Anatomija oka

Organ za vid, oko, smješten je u očnoj šupljini, *orbita*. Anatomija vidnog aparata može se podijeliti na tri dijela:

1. Očna jabučica, *bulbus oculi*
2. Vidni put, *tractus opticus*
3. Pomoćni aparat oka, *organa oculi accesoria*

1.1.1. Očna jabučica, *bulbus oculi*

Očnu jabučicu tvore ovojnice očne jabučice, očne sobice, leća, staklasto tijelo te očna vodica.

Slojevi (ovojnice) očne jabučice od izvana prema unutra:

- Vanjska očna ovojnica, *tunica fibrosa bulbi*
 - Bjeloočnica, *sclera*
 - Mrežnica, *retina*
- Srednja očna ovojnica, *tunica vasculosa bulbi*
 - Žilnica, *choroidea*
 - Zrakasto tijelo, *corpus ciliare*
 - Šarenica, *iris*
- Unutarnja očna ovojnica, *tunica interna bulbi* (Jalšovec, 2005).

Na prednjoj strani očne jabučice nalazi se prozirna rožnica, *cornea*, a iza nje leži leća. Ispred leće smještena je šarenica, *iris* koja u središtu ima otvor, zjenicu, *papilla*. Na stražnjoj strani, medijalno od optičke osi izlaze vidni živci, *n. opticus*.

Na oku razlikujemo tri prostora:

1. Prednju očnu sobicu koja je omeđena rožnicom, šarenicom i lećom
2. Kružni prostor između šarenice i leće, tj. stražnju očnu sobicu
3. Unutrašnjost oka koju ispunjava staklasto tijelo, *corpus vitreum* (Kahle, 1996).

Staklasto tijelo čini prostorno najveći dio očne jabučice. Nalazi se u stražnjem i središnjem dijelu očne jabučice. Staklasto tijelo je prozirna, gelatinozna tvorba, a čine je mreža niti, *stroma vitreum*, unutar tekućine staklastog tijela, *humor vitreus* (Jalšovec, 2005).

U obje očne sobice nalazi se očna vodica, *humor aquosus*. Očna vodica iz stražnje očne sobice prolazi procjepom između leće i šarenice u prednju očnu sobicu. Iz prednje očne sobice očna se

vodica resorbira u vensku krv kroz male otvore na prednjoj strani šarenice, te u području *angulus iridocornealis* (Jalšovec, 2005).

1.1.2. Vidni put, *tractus opticus*

Vidni put tvore tri neurona.

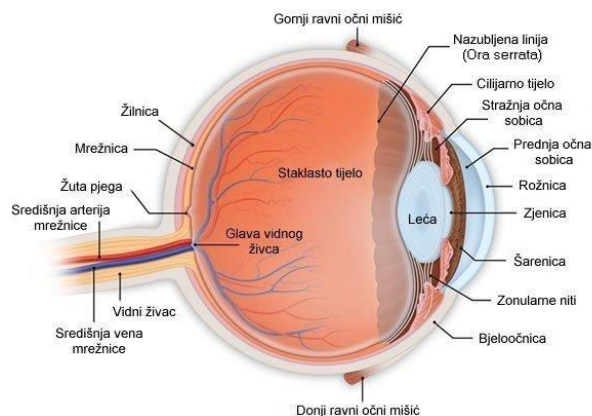
Prvi neuron čine bipolarne stanice mrežnice (*ganglion retinae*), koje živčane podražaje od štapića i čunjića provode do velikih ganglijskih mrežničnih stanica.

Drugi neuron oblikuju velike ganglijske stanice (*ganglion nervi optici*) i njihovi se aksoni spajaju u vidni živac te idu k primarnome vidnom centru (*nucleus geniculatus lateralis*).

Treći neuron čine stanice koljenastog tijela kojeg aksoni oblikuju radijacio optika i projiciraju se u vidnu koru mozga (*area striata*) (Kahle, 1996).

1.1.3. Pomoćni aparat oka, *organa oculi accesoria*

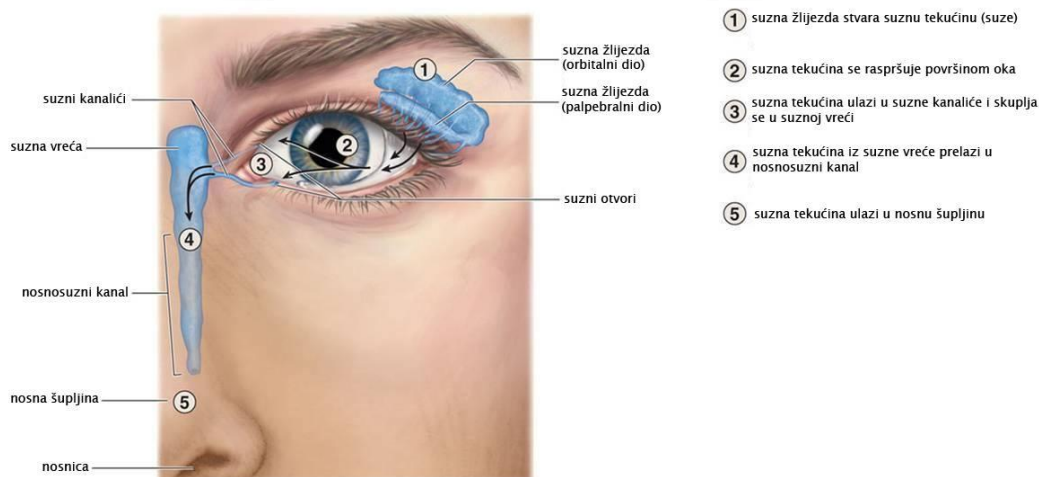
Sačinjavaju ga vjeđe (*palpebrae*), spojnica (*tunica conjunctiva*), mišići pokretači oka (*bulbomotori*), suzni aparat (*apparatus lacrimalis*), očna šupljina (*orbita*), krvne i limfne žile te živci.



Slika 1. Prikaz anatomije oka (preuzeto i modificirano s www.bilicvision.hr)

1.2. Strukture koje sudjeluju u tvorbi, izlučivanju i odvodnji suza, *apparatus lacrimalis*

Suzna žlijezda, *glandula lacrimalis*, je parni organ te je smještena u gornjem lateralnom dijelu orbite u koštanoj udubini orbitalnog dijela čeonke kosti, *fossa glandulae lacrimalis*. Izlučuje suze svojim vodovima koji se otvaraju u lateralnom dijelu gornjeg forniksa. Odatle suze, usmjerenom kontrakcijom palpebralog dijela kružnog mišića oka dospijevaju u suzno jezero, *lacus lacrimalis*. Suzno jezero je mjesto sakupljanja suza i ujedno mjesto odakle počinje put njihove odvodnje. U suznom jezeru suze prelaze kroz otvore, *puncta lacrimalia*, u suzne kanaliće, *canaliculi lacrimales*. Suzni kanalići, gornji i donji, početni su dio odvodnog sustava suza iz suznog jezera te spajaju suzno jezero sa suznom vrećom. Kanalići su smješteni u krajnjem medijalnom dijelu gornje i donje vjeđe, ispred lig. palpebrale mediale. U konačnici kanalići se, svaki zasebno ili se prethodno ujednivši, otvaraju u gornji medijalni dio suzne vreće, *saccus lacrimalis*. Suzna vreća je gornji dio nazolakrimalnog voda koji se nalazi iznad nazolakrimalnoga koštanog kanala. Iz suzne vreće suze prelaze u *ductus nasolacrimalis* kojim se odvođe u donji nosni hodnik (Jalšovec, 2005).



Slika 2. Prikaz suznog aparata (preuzeto i modificirano s www.studyblue.com)

1.3. Biokemija suznog filma

Klasični opis strukture suznog filma opisuje ga kao trilaminarnu strukturu, koja se sastoji od gornjeg lipidnog, srednjeg vodenog te donjeg mucinskog sloja neposredno uz površinu oka (Holly, 1977).

1.3.1. Lipidni sloj

Lipidni sloj se nalazi na površini suznog filma te je relativno tanak ($\sim 1 \mu\text{m}$). Meibomove tubuloacinarne žlijezde koje se nalaze u tarzusu gornje i donje vjeđe proizvode najveći dio lipidnog sloja. Treptanje izaziva ekskreciju sekreta Meibomovih žlijezda. Sekrecija se postiže holokrinim mehanizmom, pri čemu se secernira cijela stanica zajedno sa svojim sadržajem (Sirigu P. Shen RL, 1992). Glavni sastojci Meibomovih lipida su nepolarni lipidi (voštani esteri, kolesterol i kolesterolski esteri) koji čine 60-70% lipida u suzama. Uz nepolarne lipide prisutni su i polarni (fosfolipidi, glikolipidi), a ostatak čine disteri, ugljikovodici, mono-, di- i trigliceridi, slobodne masne kiseline i alkohol (Gillan, 2010).

1.3.1.1. Funkcija lipidnog sloja

Funkcije lipidnog sloja su višestruke. Štiti vodenu komponentu suznog filma od evaporacije rasprostirući se iznad nje (Petriček, 2011). Sprječava kontaminaciju suznog filma s lipidima kože, s obzirom da se lipidi kože po svojem sastavu razlikuju od lipida suza te mogu destabilizirati suzni film (McDonald, 1968). Također lipidi sprječavaju prelijevanje suza preko rubova vjeđa (Norm, 1966).

1.3.2. Vodeni sloj

Vodeni sloj je najdeblji dio suznog filma ($\sim 6,5-7,5 \mu\text{m}$) (Mishima, 1965). Sadrži otopljene ione, proteine i metabolite. Secernira ga glavna suzna žlijezda te akcesorne Krauseove i Wolfringove suzne žlijezde (Milder, 1987).

1.3.2.1. Svojstva i funkcija vodenog sloja

Elektroliti koji se nalaze u vodenom dijelu suznog filma odgovorni su za osmolarnost suza (Bothelo, 1964). To su ioni natrija, kalija, magnezija, kalcija, klorida, bikarbonata i fosfata. Proteini u suznom filmu imaju ulogu u smanjenju površinske napetosti između suznog filma i

rožnice, transportu metala, antiinfektivnu ulogu te osmotsku i pufersku regulaciju. Izolirano je preko 60 različitih proteina iz suza (Petriček, 2011). Jedni od najvažnijih su:

1) Lizozim

Čini 20-40% ukupnih proteina suza. U suzama se nalazi u većoj koncentraciji nego u bilo kojoj drugoj tjelesnoj tekućini (Farris, 1985). Djeluje antibakterijski na način da kida glikozidne veze peptidoglikana koji su sastavni dio stanične stijenke bakterije.

2) Laktoferin

Protein koji djeluje bakteriostatski na način da veže željezo i onemogućava replikaciju bakterije (Petriček, 2011).

3) Lipokalin

Kiseli protein koji ima funkciju vezanja lipida. Pretpostavlja se da služi za stabilizaciju suznog filma stvarajući stabilne veze s lipidima iz vanjskog sloja suznog filma (Schoenwald, 1998).

4) Imunoglobulini

U suzama se nalaze svi tipovi imunoglobulina (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM), no u manjoj koncentraciji nego u serumu (Petriček, 2011).

5) Beta-lizin

Baktericidni protein koji djeluje na celularnu membranu bakterija. U suzama se nalazi u većoj koncentraciji nego u krvnoj plazmi (Ford, 1976).

6) Enzimi

U suzama je izolirano 12 enzima. Uz već navedeni lizozim, neki od enzima su laktat dehidrogenaza (LDH), piruvat kinaza (PK), malat dehidrogenaza (MDH) i amilaza.

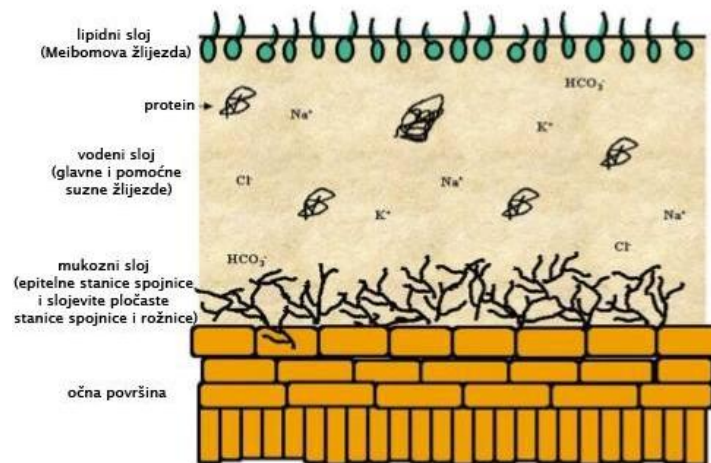
Metaboliti u suzama uključuju glukozu koja je u vrlo niskoj koncentraciji i ureu koja je u koncentraciji sličnoj onoj u plazmi (Petriček, 2011).

1.3.3. Mukozni sloj

Sadržaj mukoznog sloja luče vrčaste stanice spojnice i Henleove kripte u forniksima, ali i epitelne stanice spojnice koje sadrže ekskretorne vezikule (Dilly, 1986). Vrčaste stanice spojnice luče heterogenu skupinu proteina, dok epitelne stanice spojnice luče različite oblike mucina putem sekretornih vezikula (Petriček, 2011).

1.3.3.1. Svojstva i funkcije mukoznog sloja

Mukozni sloj je viskoelastičan, što mu omogućava da se širi površinom oka s ciljem prekrivanja bilo kakve površinske nepravilnosti ili oštećenja (Kaura,1986). Jedna od najvažnijih funkcija mukusa u suzama je podmazivanje što omogućava klizanje vjeđa preko bulbusa uz najmanje trenja. Također sudjeluje u zaštiti epitelnih površina tako da sluz brzo obavija strano tijelo kako ne bi oštetilo površinu oka (Petriček, 2011).

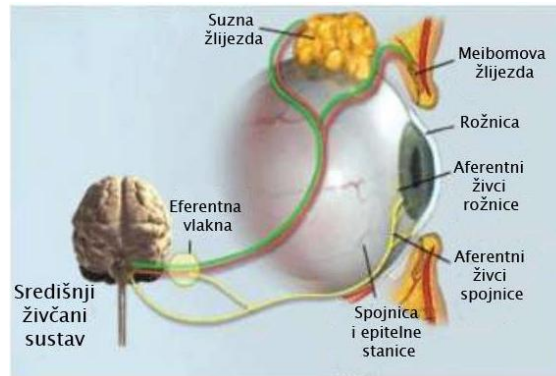


Slika 3. Prikaz suznog filma i dinamike (preuzeto i modificirano s www.slideshare.net)

1.3.4. Inervacija suzne žlijezde

Inervacijom suzne žlijezde potiče se lučenje suza koje je povezano s centralnim i autonomnim živčanim sustavom. Sekrecija je djelomice pod neuralnom i pod hormonalnom kontrolom. Aferentni (osjetni, senzorni) put koji dopire bazično iz rožnice ili spojnice oka provodi živčani signal posredstvom neurotransmitera *nervus trigeminusom* koji osjetnim neuronima ulazi u leđnu moždinu. Odgovor na osjetni podražaj zatvara luk do lakrimalne žlijezde- u nadležnosti je autonomnog eferentnog (motoričkog) puta koji facijalnim živcem u parasimptičkom odsječku posredstvom pterigopalatinskog gangliona provodi podražaj aksonima sve do lakrimalne žlijezde. Bazalno, inervacija je usmjerena na pomoćne lakrimalne žlijezde, a u refleksnom odgovoru neuralni refleksni luk usmjeren je na glavnu lakrimalnu žlijezdu. Homeostatska regulacija pretpostavlja konstantne razine neuralnih signala i sekreciju suza s fiziološkim sadržajem. Kraće, aferentni živci iz rožnice ili ostalih tkiva očne površine u odnosu su s centralnim živčanim sustavom čiji eferentni neuroni obuhvaćaju autonomnu inervaciju sekretornog tkiva za suze. I simpatički živčani sustav može utjecati na sekreciju suza

modulirajući krvni protok do žlijezde i unutar nje, ali i izravnim djelovanjem na tkivne jedinice koje izlučuju suze (Stern, 2004).



Slika 4. Prikaz neurološkog aspekta proizvodnje suza (preuzeto i modificirano s www.slideshare.net)

1.4. Stres i tipovi stresa

Stres možemo definirati kao stanje unutarnje neravnoteže i narušene homeostaze organizma, odnosno ekstremno fiziološko i emocionalno uzbuđenje koje osoba doživljava u prijetećoj situaciji i njen odgovor na tu neočekivanu promjenu i opasnost (Šupe, 2011).

Kada je izložen stresu, ljudski organizam preraspodjeljuje svoje energijske izvore u očekivanju nadolezeće opasnosti. Motorički i osjetilni sustavi aktiviraju se do krajnjih granica kako bi organizam bio spreman odgovoriti na moguću opasnost. U isto vrijeme sustavi koji nisu nužni u situaciji izravne opasnosti (probavni, imunološki i reproduktivni sustav) privremeno su prigušeni (Seefeldt, 1989; Stratakis, 1995).

Postoji nekoliko tipova stresa koji se po trajanju i učestalosti dijele na:

- a) *Akutni stres* - najčešći oblik koji proizlazi iz pritiska i zahtjeva iz neposredne prošlosti, aktualnih zahtjeva okoline te pritiska 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 i opasnost.
- b) *Epizodički akutni stres* - nastaje među osobama 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.
- c) *Kronični stres* - izloženost stresnim i iscrpljujućim situacijama tijekom dužeg razdoblja,

osobito na poslu ili obiteljskom miljeu. Često je povezan s lošim socioekonomskim statusom, društvenom izolacijom, nemogućnošću kontroliranja i utjecanja na događaje, padom samopouzdanja, suicidalnim mislima (Šupe, 2011).

d) *Postrumatski stresni poremećaj* (PTSP) – oblik je psiholoških posljedica izlaganja stresnim doživljajima, koji uključuju smrtnu opasnost, ozbiljne fizičke povrede ili prijetnju psihičkom ili fizičkom integritetu osobe koje ta osoba doživljava krajnje traumatično.

1.4.1. Bol kao oblik stresa

Osjet boli ujedno je trenutak stresa koji u odgovor na bol uključuje i medijatore stresa. Pojava površinske oštre, štipajuće boli koja je precizno lokalizirana, prenose A δ -neuronska vlakna brzinom od 5– 15 m/s. Osjet boli iz lica prenose primarni osjetni neuroni u ganglion *nervusa trigemina*, a receptori boli sudjeluju u „aksonskom refleksu” tako da izazivaju vazodilataciju u okolini lokalne tkivne ozljede, a iz okolnih mastocita oslobađa se histamin, bradikinin, prostaglandin i K⁺ ioni (Guyton, 2003).

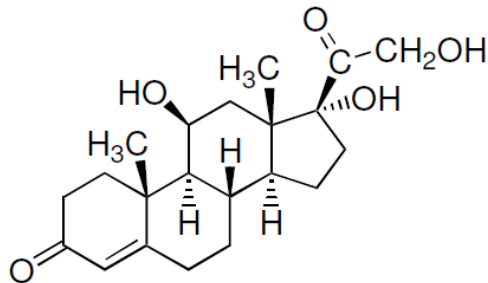
1.4.2. Biljezi stresa

U stresu je angažiran čitav niz neurotransmitera i hormona, preko ascedentnog monoaminergičkog sustava te preko hipotalamusno-hipofizne-adrenalne osi (HHA-os) (Šupe, 2011). Četiri primarna medijatora stresnog odgovora su glukokortikoidni hormon kortizol, steroidni hormon dehidroepiandrosteron (DHEA) i kateholamini adrenalin i noradrenalin (McEwen, 2000; Seeman, 1997). U stresni odgovor također su uključeni pepidi vazopresin, kortikotropni oslobađajući hormon (CRH), proopiomelanokortin, kolecistokinin i neuropeptid Y (Herbert, 1997), monoamini dopamin i serotonin, enzim α -amilaza (Nater, 2005; Bosch, 2003) te molekule imunog sustava sekretorni IgA (sIgA) (Hucklebridge, 1998; Evans, 1994) i citokini (Anisman, 2002).

1.4.3. Kortizol

Glavna komponenta stresnog odgovora je hipotalamusno-hipofizna-adrenalna os (HHA) . Sustav je sastavljen od hipotalamusa, hipofize, adrenalne žlijezde i hormona oslobođenih iz adrenalne žlijezde (Banbury, 2009). Bolni podražaji uzrokovani fizičkim stresom ili oštećenjem tkiva najprije se prenose prema gore kroz moždano deblo, a zatim u eminenciju medijanu

hipotalamusa. Hipotalamus oslobađa kortikotropin oslobađajući hormon (CRH) , a zatim se prenosi u adenohipofizu gdje potiče lučenje adrenokortikotropnog hormona (ACTH). ACTH stimulira adrenalnu žlijezdu na lučenje kortizola. Različiti oblici stresa su ključni za ekscitaciju hipotalamusa. Na taj način se aktivira cjelokupan sustav pa se kortizol brzo otpušta i zatim potiče niz metaboličkih zbivanja kojima se ublažavaju štetni učinci stresa. Kortizol povratnom spregom djeluje izravno na hipotalamus i adenohipofizu. Na taj način smanjuje koncentraciju kortizola u plazmi u vrijeme kad na organizam ne djeluje nikakav stres. Međutim, podražaji koji se pojavljuju pri stresu prevladavaju i uvijek mogu prekinuti izravno inhibicijsko djelovanje kortizola povratnom spregom (Guyton, 2003).



Slika 6. Prikaz strukture kortizola (hr.wikipedia.org)

1.5. Mjerenje osmotskog tlaka

Izmjena vode kroz membranu koja propušta samo vodu ovisi o razlici koncentracija različitih čestica (iona i molekula) na jednoj i drugoj strani membrane. Uz jednake masene koncentracije vrijedi: što su otopljene čestice veće (molekulska masa veća) to ih je manje u jedinici volumena i to manji je njihov osmotski učinak. Međutim, ako membrana osim vode propušta i male čestice izjednačit će se koncentracije na obje strane i tada važan faktor u prometu vode postaju velike molekule. Pri tumačenju raspodjele vode u tijelu bitno je shvatiti važnost slijedećih faktora:

- broja čestica u jedinici volumena
- koncentracijskog gradijenta kroz membranu
- odnosa između veličine čestica i propustljivosti membrane

1.5.1. Definicija osmolarnosti i osmolalnosti

Osmotska koncentracija može se izraziti na dva načina:

- kao osmolarnost, tj. u obliku broja mmola na litru otopine
- ili kao osmolalnost, tj. kao broj mmola na kilogram otapala

Kada su tvari otopljene u čistoj vodi u koncentracijama koje nalazimo u biološkim tekućinama, jedva ima brojčanih razlika između osmolarnosti i osmolalnosti (Zilva, 1992).

1.5.1.1. Osmolarnost u suzama

Osmolarnost suznog filma produkt je različitih koncentracija otopljenih tvari (proteini, lipidi i mucini) (Huth, 1981). Elektroliti suznog filma kao što su natrij, kalij, magnezij, kalcij, kloridni, bikarbonatni i fosfatni ioni također su uključeni u regulaciju osmolarnosti suznog filma (Botelho, 1964).

Normalna dinamika suznog filma uključuje distribuciju, drenažu, evaporaciju i apsorpciju suza, što osigurava adekvatnu produkciju suza, retenciju na površini oka i eliminaciju (Tomlinson, 2006). Mjerenja osmolarnosti suznog filma predstavljaju krajnji produkt promjena dinamike u suznom filmu (Mathers, 2000).

Kada su tvari otopljene u čistom otapalu, snižava se točka ledišta otapala, povećava se točka vrelišta i osmotski tlak te snižava tlak pare. Točka ledišta, točka vrelišta, osmotski tlak i tlak pare poznati su kao koligativna ili koncentracijska svojstva otapala. Kada je otopljena tvar dodana u otopinu, koligativna svojstva promjene se proporcionalno s koncentracijom otopljene tvari. Osmometri, instrumenti dizajnirani za detekciju i mjerenje promjena u jednom od ovih koligativnih svojstava, mjere koncentracije otopljenih čestica u otopini ili koncentracije pojedine otopine (User's Guide, 2005).

1.5.2. Definicija osmometrije

Osmometrija je metoda koja mjeri koncentraciju otopljene tvari. Razlikuje se od mjerenja molarnosti. Molarnost je mjera broja molova otopljene tvari u otopini, dok je osmometrija mjera broja čestica otopljene tvari u otopini. Osmometrija uzima u obzir ukupnu koncentraciju otopljenih čestica u otopini, bez obzira na njihovu veličinu, gustoću, molekularnu masu i električni naboj (Gilbard, 1978). Osmometrija se klinički primjenjuje za procjenu ravnoteže vode i elektrolita, ispitivanje hiponatrijemije, intoksikaciju (npr. metanol, etilen-glikol), diferencijalnu dijagnostiku kronične dijareje te procjenu povećane ili smanjene količine urina.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI

Cilj istraživanja je procijeniti primjenu suza u dijagnostici akutnog stresa mjerenjem koncentracije kortizola, jedne od glavnih stresnih molekula, a nakon provokacije akutne fizičke boli u nazalnom području. Istovremenim mjerenjem osmolarnosti procijenila bi se očuvanost osmotskog tlaka u odnosu na povećanu brzinu lučenja suza nakon stresa, što bi se moglo povezati s izmjerenim koncentracijama kortizola i moguće razjasniti izvore kortizola u suzama.

Specifični ciljevi

- Izmjeriti bazalnu osmolarnost i koncentraciju kortizola u suzama prikupljenim iz oba oka filter papirom bez provokacije.
- Izmjeriti osmolarnost i koncentraciju kortizola u suzama prikupljenim odmah nakon akutne nazalne boli (odstranjenje dlačice) iz oba oka filter papirom.
- Istražiti razlike između izmjerenih koncentracija prije i poslije provokacije boli.
- Istražiti je li osmotska koncentracija povezana s razinom kortizola.
- Zaključiti prema izmjerenim koncentracijama nakon podražaja boli postoji li konzistentni odgovor na akutni stres koji se može dijagnosticirati u suzama, kao i potvrda da se o funkciji glavnih lakrimalnih žlijezda može više doznati iz suza nakon stimulacije.

3. MATERIJALI I METODE

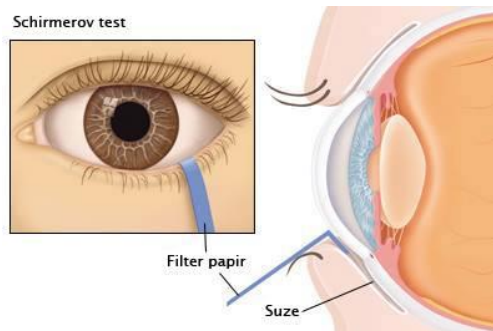
3.1. Ispitanici

U istraživanje je bilo uključeno 18 zdravih ispitanika studentske populacije (N=18). Ispitanici su bili usmeno i pismeno upoznati s ciljevima istraživanja te su potpisali informirani pristanak čime su dobrovoljno pristali na uzorkovanje suza prije i nakon provokacije akutne boli odstranjenjem nazalne dlačice. Ispitanicima je objašnjeno da nema po njih rizičnog postupka ni mogućnosti infekcije budući da su sterilni filter papiri, pakirani zasebno, uobičajeno sredstvo u dijagnostičkim postupcima u oftalmologiji. Skupina ispitanika bila je sastavljena od 10 žena i 8 muškaraca, u rasponu od 22 do 29 godina. Prvo uzorkovanje suza bilo je provedeno 2. travnja 2014. kada su suze uzorkovane desetorici ispitanika, drugo uzorkovanje suza bilo je 3. travnja 2014. kada su suze uzorkovane petorici ispitanika, treće uzorkovanje provedeno je 6. travnja 2014. kada su suze uzorkovane trojici ispitanika. Svim ispitanicima su u prvoj polovici dana, između 10 i 16 sati u KBC Sestre milosrdnice uzeti uzorci suza. Uzorci su bili obilježeni rednim brojem te imenom i prezimenom ispitanika. Međutim, jedini osobni podatak koji će se naći u radu bit će dob i spol ispitanika.

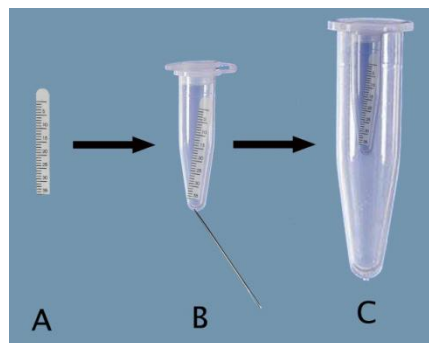
3.2. Uzorkovanje suza

3.2.1. Metoda uzorkovanja suza

Uzorkovanje se izvodi sa Schirmerovim trakama (sterilni filter papir) duljine 35 mm, širine 5 mm. Na jednom kraju se traka presavije 5 mm. Ispitanik usmjeri pogled prema gore, zatim se povuče temporalni dio donje vjeđe i u lateralni dio spojnične vrećice stavi se kraći presavinuti dio trake. Odmah se postavi traka i na drugo oko. Ispitanik potom sklopi oči te traka izaziva lagani osjećaj nelagode u očima pri čemu se potakne produkcija suza. Svim ispitanicima uzet je iz svakog oka sadržaj suza. Nakon 15 minuta ispitanicima je pincetom iščupana dlačica iz nosa. Postupak je izazvao kratkotrajnu bol nakon čega su sakupljene suze iz oba oka istim postupkom sa Schirmer trakama. Uzorci filter papira natopljeni suzama umetnuti su u mini epruvete probušene na dnu, a one potom u veće epruvete.



Slika 7. Schirmerov test (preuzeto i modificirano s www.drugs.com)



Slika 8. A) Schirmerova traka; B) Schirmerova traka stavljena u epruvetu kojoj je probušeno dno; C) Manja epruveta stavljena u veću te zatim podvrgnuta centrifugiranju

3.2.2. Metoda odvajanja suza od filter papira

Duple epruvete podvrgnute su centrifugiranju, 5 minuta na $13\times g$. Centrifugiranje je prouzročilo odvajanje tekućine (suza) od filter-papira kroz otvor na dnu manje epruvete. Veće epruvete u koje su izdvojene samo nativne suze, pohranjene su u hladnjak na $+4$ do $+8$ °C kroz najviše 7 dana nakon čega je analizirana koncentracija kortizola i osmolarnost. Dobiveni uzorci suza prije analize razrijeđeni su s destiliranom vodom 1:5 te su u kasnijem izračunu množeni s faktorom 5.

3.3. Određivanje koncentracije kortizola u suzama enzimimunoanalizom (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*; ELISA)

Koncentraciju kortizola u suzama određivali smo komercijalnim testom Cortisol Saliva ELISA koji je unaprijed sadržavao sve reagense i standardne otopine te koji je priređen po IVD (engl. *In Vitro Diagnostic*) direktivi namjenjen upravo određivanju kortizola u humanim uzorcima. U radu smo se pridržavali svih uputa proizvođača (Uputstvo za upotrebu: EUROIMMUN, Rev.2012). ELISA test kit predstavlja kvantitativni *in vitro* test za slobodni kortizol u humanim uzorcima. Prvi reakcijski korak uključuje pipetiranje razrijeđenih uzoraka ispitanika ($50\mu\text{L}$), kalibratora ($50\mu\text{L}$) i kontrola ($50\mu\text{L}$) u jažice mikrotitarskih pločica. Na stijenkama jažica mikrotitarske pločice nalazi se vezana definirana količina antitijela, koja specifično prepoznaje antigen (kortizol). Dodatkom $100\mu\text{L}$ enzima, kortizol obilježena peroksidaza i inkubiranjem na $18-25$ °C, uz stalno protresanje na električnoj tresalici (~ 400 ok/min) u trajanju od 90 minuta, dolazi do

kompeticije za vezna mjesta između kortizola koji želimo odrediti i kortizola koji je obilježen preoksidazom. Nakon inkubacije dolazi do specifičnog vezanja antigen-antitijelo. Automatskim ispiranjem tri puta sa po 450 μL pufera za ispiranje uklanja se suvišak slobodnog antigena (kortizola). Svaki ciklus ispiranja traje 30-60 sekundi. Nakon ispiranja mikrotitarska pločica se prislanja na apsorbirajuću podlogu koja upija suvišak antitijela i antigena. Nakon uklanjanja suviška dodaje se 100 μL kromogen supstrata (TMB/ H_2O_2) te inkubira 15 minuta na sobnoj temperaturi (18-25 $^\circ\text{C}$) bez prisutnosti svjetla. Dodatkom supstrata, peroksidaza katalizira oksidaciju tetrametilbenzidina (TMB) i formira obojeni kompleks. Nastankom obojenog kompleksa dodaje se 100 μL „Stop otopine“ odnosno otopine za zaustavljanje enzimske reakcije koja sadrži 0,5 M H_2SO_4 . Dodatkom „Stop otopine“ razvijena plava boja prelazi u žutu. Količina stvorenog obojenog kompleksa nakon dodatka „Stop otopine“ određuje se očitanjem apsorbanacija u mikrotitarskoj pločici na automatskom fotometru Humareader prilagođenom za mikrotitarske pločice (Human, Njemačka) uz valnu duljinu 450 nm i sekundarnu korekcijsku valnu duljinu od 630 nm.

3.4. Mjerenje osmotskog tlaka u suzama

Osmotski tlak u suzama određivali smo krioskopskim osmometrom (Gonotec OSMOMAT Model 030 Cryoscopic Osmometer). To je neinvazivni *in-vitro* dijagnostički sustav za mjerenje ukupne osmolarnosti u humanim uzorcima. Osmometar indirektno iskazuje broj otopljenih čestica u tekućini.

Uzorak otopine hladi se pomoću Peltier-ovog sustava hlađenja, dok se temperatura elektronički prati. Kada uzorak otopine dosegne specifičnu temperaturu ispod točke ledišta, injektira se iglom od nehrđajućeg čelika što dovodi do automatske kristalizacije. Igla predstavlja sekundarni sustav hlađenja koji se sastoji od malih kristala leda koji potječu od vlage zraka. Kada kristalizacija započne, spontano se formira led. Zatim temperatura sustava spontano raste što dovodi do porasta temperature uzorka do točke ledišta. Nakon kompletne kristalizacije temperatura se ponovno snižava (Uputstvo za upotrebu: Cryoscopic Osmometer, 2007).



Slika 9. Prikaz krioskopskog osmometra (preuzeto i modificirano s www.pintertrade.com)

3.5. 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). Značajke skupova podataka prikazane su metodom deskriptivne analize, Kolmogorov-Smirnovljevim statističkim testom ispitana je normalnost raspodjele, a χ^2 -testom frekvencija spolova. Za usporedbu normalno distribuiranih rezultata mjerenja prije i poslije akutne boli korišten je parametrijski parni t-test.

Tablica 1. Tumačenje koeficijenta korelacije r prema Coltonu

KOEFICIJENT KORELACIJE (r)	POVEZANOST
0 do $\pm 0,25$	nema povezanosti
$\pm 0,26$ do $\pm 0,50$	slaba povezanost
$\pm 0,51$ do $\pm 0,75$	umjereno do dobra povezanost
$\pm 0,76$ do ± 1	dobra do izvrsna povezanost

Za ispitivanje povezanosti varijabli korišten je parametrijski statistički postupak po Pearsonu za ona mjerenja koja su slijedila normalnu raspodjelu. Povezanost varijabli ocijenjena je sa

pripadajućim koeficijentom korelacije r i njegovom statističkom značajnošću P . Koeficijenti korelacije tumačeni su prema Coltonu (Tablica 1.). Modelom linearne regresije procijenjena je predikcijska vrijednost modela na razini statističke značajnosti $P < 0,05$. Koeficijentom determinacije (R^2) utvrđivali smo u kojoj je mjeri matematički model primjenjiv za predviđanje ovisne varijable uz naznačene granice pouzdanosti od 95% i granice prediktivnih vrijednosti od 95%. Svi rezultati interpretirat će se na razini statističke značajnosti $P < 0,05$.

4. Rezultati

4.1. Opisna statistika

U istraživanje je bila uključena skupina dobrovoljaca koja se sastojala od 10 žena i 8 muškaraca životne dobi od 22 do 29 godina ($23 \pm 1,7$). Distribucija životne dobi slijedila je normalnu raspodjelu ($P=0,251$). Obilježja skupine prikazana su u Tablici 2.

Tablica 2. Opisna statistika istraživanih skupina i rezultata mjerenja kortizola osmotske koncentracije

			Kortizol (ng/ml)		Osmotska konc. (mOsmol/L)	
		Dob (godine)	A	B	A	B
Spol, N	18	18	18	18	17	17
Ž (%)	(55,5%)	(55,5%)	(55,5%)	(55,5%)	(58,8%)	(58,8%)
M (%)	(44,5%)	(44,5%)	(44,5%)	(44,5%)	(41,2%)	(41,2%)
Srednja vrijednost		23,7	8,3	5,1	396	312
SD		1,69	8,41	4,91	108,0	48,6
Medijan		23	5,2	3,4	380	304
Minumum		22	0,8	0,4	244	248
Maksimum		29	32,0	17,2	568	412
P*	0,814				0,494	
P**		0,251	0,234	0,366	0,825	0,543
P***			0,0502		0,0013	

A- uzorci suza prije akutne boli; B –uzorci suza nakon akutne boli; Ž- ženski ispitanici; M- muški ispitanici; N- broj ispitanika; SD- standardna devijacija; P* - χ^2 - test; P** - Kolmogorov-Smirnovljev test; P*** - parni t-test; testiranje je provedeno na stupnju značajnosti $P < 0,05$

Skupina je imala ujednačen udio žena i muškaraca ($\check{Z}=10$, $M=8$). Frekvencija spola testirana je χ^2 - testom ($P=0,814$). Ispitivanoj skupini uzimane su suze prije akutne boli (mjerenja A) te nakon kratkotrajne oštre boli. Bol je izazvana čupanjem nazalne dlačice, a 5 minuta nakon čupanja uzete su suze (mjerenja B). U oba mjerenja određivana je koncentracija kortizola i

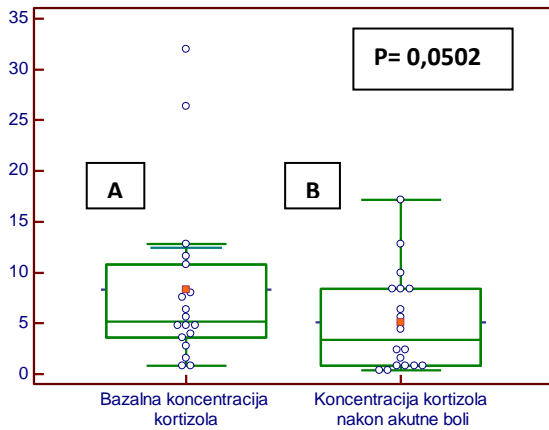
osmotskog tlaka čije su vrijednosti prikazane u Tablici 2. Sva mjerenja kortizola pokazala su normalnu Gaussovu raspodjelu (A: $8,3 \pm 8,41$ ng/ml, $P= 0,234$ i B: $5,1 \pm 4,91$ ng/ml, $P= 0,366$), kao i mjerenja osmotske koncentracije (A: $396 \pm 108,0$ mOsmol/L, $P= 0,825$ i B: $314 \pm 48,6$ mOsmol/L, $P= 0,543$). Normalnost raspodjele testirana je s Kolmogorov-Smirnovljevim testom, a usporedba prije i poslije podražaja parametrijskim parnim t-testom budući da su mjerenja pokazala normalnu raspodjelu.

4.2. Usporedba mjerenja prije i nakon akutne boli

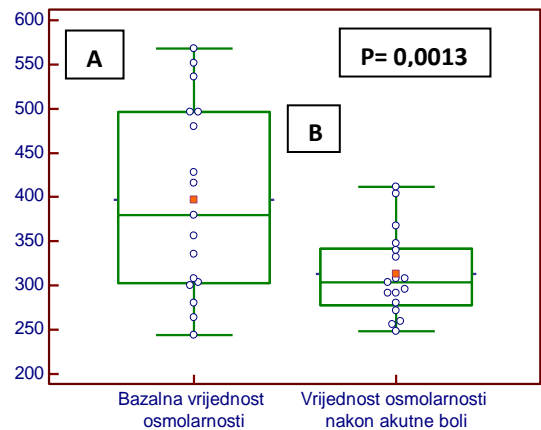
Na Slikama od 10. – 15. prikazane su usporedbe izmjerenih veličina u suzama prije podražaja (A) te nakon izazvane akutne boli čupanjem nazalnih dlačica (B). Sve izmjerene veličine slijedile su normalnu raspodjelu te je primjenjen parametrijski parni t-test.

Na Slici 10. prikazana je usporedba koncentracija kortizola prije i nakon podražaja. U ovoj statističkoj obradi nisu odvajani spolovi ($N=18$). Rezultati su pokazali značajne razlike u koncentraciji kortizola. Bazalne vrijednosti značajno su više ($P=0,0502$) od vrijednosti nakon akutne boli. Slične značajke uočene su i kod mjerenja osmolarnosti kako se može vidjeti na Slici 11. ($396 \pm 108,0$ mOsmol/L; $P=0,0013$).

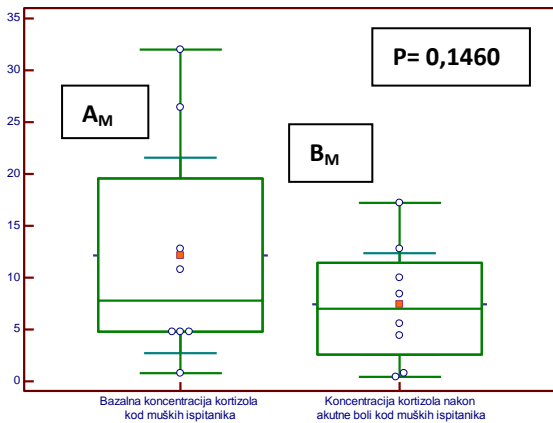
Izdvajanjem uzoraka prema spolu (A_M , $A_{\bar{z}}$ - bazalna mjerenja u muškaraca, odnosno žena; B_M , $B_{\bar{z}}$ - mjerenja nakon akutne boli u muškaraca, odnosno žena) dobiveni su rezultati koji su prikazani na Slikama 12. - 15. Muškarci su pokazali da nakon akutne boli (B_M) imaju niže koncentracije kortizola i osmolarnosti, ali bez statističke značajnosti ($N=8$; za kortizol $7,4 \pm 5,83$ ng/ml, $P= 0,1460$; za osmolarnost $291,4 \pm 29,88$ mOsmol/L, $P=0,0753$). Ženski udio populacije pokazao je istovjetne značajke za koncentraciju kortizola ($3,2 \pm 3,22$ ng/ml; $P=0,2209$), dok su se snižene vrijednosti osmolarnosti nakon akutne boli pokazale statistički značajnim ($328 \pm 54,68$ mOsmol/L; $P=0,0117$).



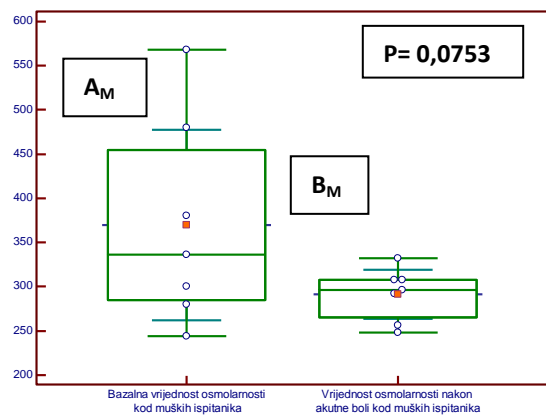
Slika 10. Prikaz koncentracije kortizola prije (A) i nakon akutne boli (B)



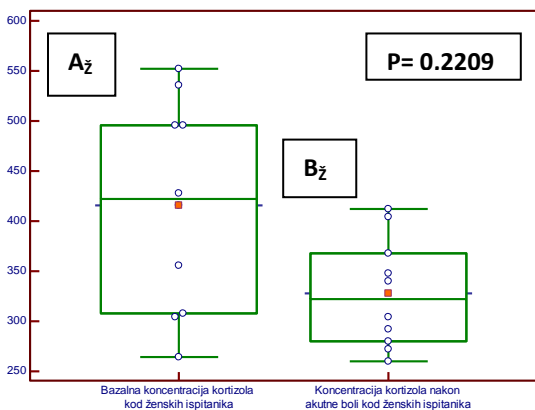
Slika 11. Prikaz vrijednosti osmolarnosti prije (A) i nakon akutne boli (B)



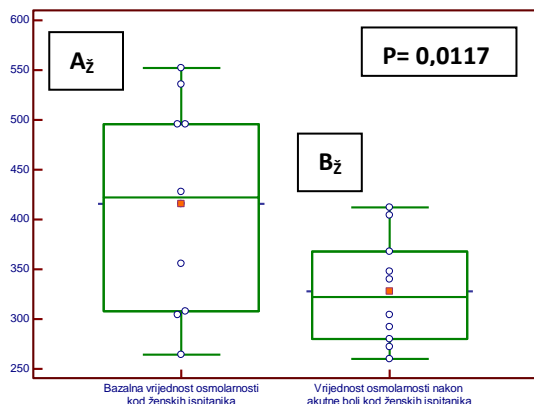
Slika 12. Prikaz koncentracije kortizola prije (A_M) i nakon akutne boli (B_M) kod muških ispitanika



Slika 13. Prikaz vrijednosti osmolarnosti prije (A_M) i nakon akutne boli (B_M) kod muških ispitanika



Slika 14. Prikaz koncentracije kortizola prije (A_z) i nakon akutne boli (B_z) kod ženskih ispitanika



Slika 15. Prikaz vrijednosti osmolarnosti prije (A_z) i nakon akutne boli (B_z) kod ženskih ispitanika

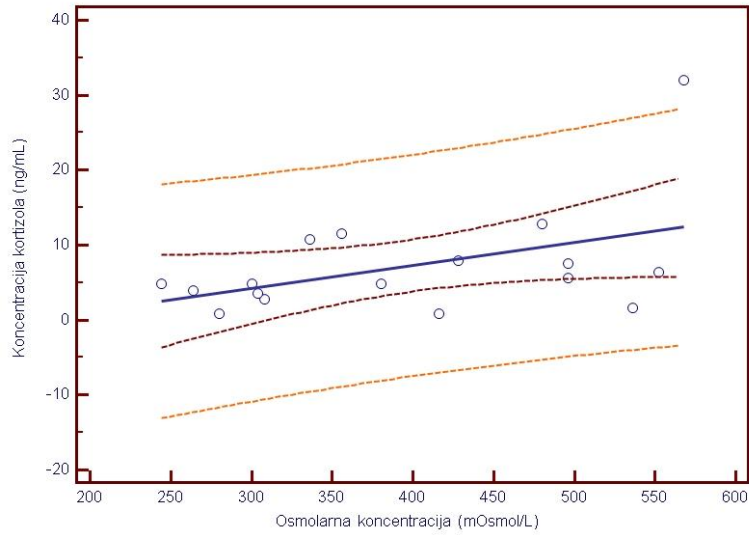
4.3. Povezanost osmotske koncentracije i koncentracije kortizola

Primjenom statističke metode korelacije utvrđen je stupanj povezanosti između kortizola i osmolarnosti kako je prikazano na Tablici 3. Prvo ispitivanje povezanosti provedeno je na svim uzorcima neovisno o tome jesu li uzeti prije ili nakon podražaja (N=34), raspodjela obje varijable pratila je Gaussovu raspodjelu (P=0,159; P=0,140). Pokazana je slaba korelacija (r=0,445), iako je ta povezanost bila statistički značajna (P=0,0084).

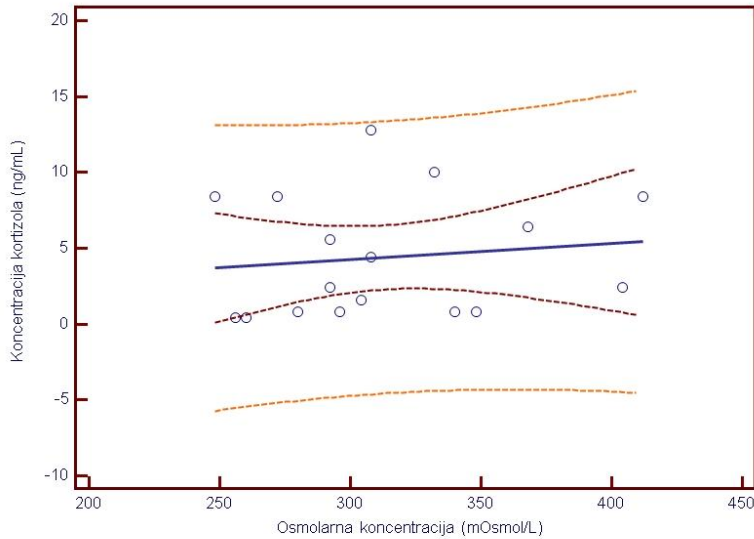
Tablica 3. Prikaz korelacije između koncentracije kortizola i osmotske koncentracije

KOR vs. OSMO	N	R	R ²	P
A + B	34	0,445	0,198	0,0084
A	17	0,453	0,205	0,0678
B	17	0,130	0,017	0,619
A_ž	10	0,0732	0,005	0,841
B_ž	10	0,321	0,103	0,366
A_M	7	0,815	0,772	0,0254
B_M	7	0,432	0,147	0,333

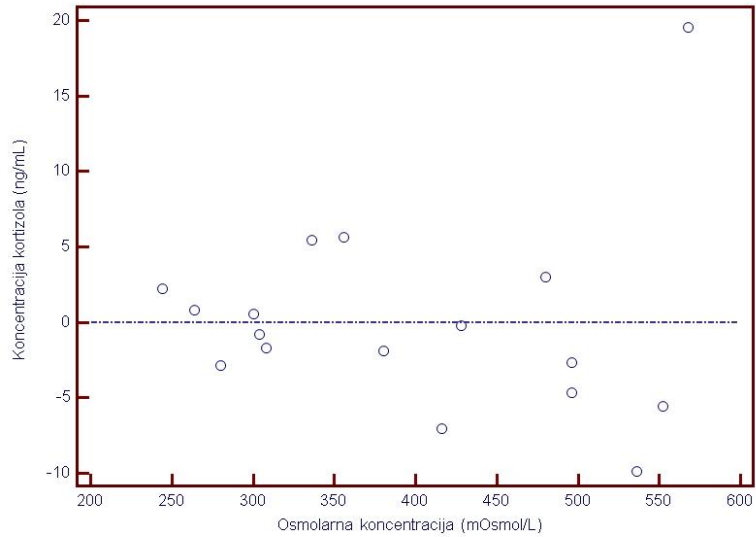
N- broj mjerenja; r- koeficijent korelacije; R²- koeficijent determinacije; P- testiranje značajnosti koeficijenta korelacije; KOR– kortizol (ng/ml) ; OSMO– osmotska koncentracija (mOsmol/L); A- uzorci suza prije akutne boli; B– mjerenja u suzama nakon akutne boli; A_ž- uzorci suza prije akutne boli kod ženskih ispitanika; B_ž- mjerenja u suzama nakon akutne boli kod ženskih ispitanika; A_M- uzorci suza prije akutne boli kod muških ispitanika; B_M- mjerenja u suzama nakon akutne boli kod muških ispitanika; testiranje je provedeno na stupnju značajnosti P<0,05



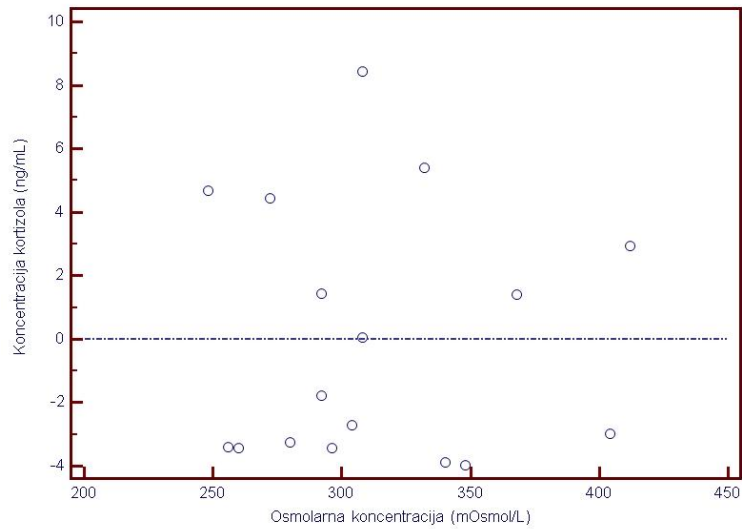
Slika16 . Prikaz regresijskog pravca (plava linija), intervala pouzdanosti (narančasta iscrtkana linija) i prediktivnog interval (ljubičasta iscrtkana linija) kod bazalnih mjerenja (A); $r=0,453$, $P=0,0678$



Slika 17 . Prikaz regresijskog pravca (plava linija), intervala pouzdanosti (narančasta iscrtkana linija) i prediktivnog intervala (ljubičasta iscrtkana linija) nakon mjerenja akutne boli (B); $r= 0,130$, $P= 0,619$



Slika 18. Rezidualni dijagram koji prikazuje razlike između prediktivnih vrijednosti (plava iscrtkana linija) i izmjerenih vrijednosti (plavi kružići) kod bazalnih mjerenja (A); $r=0,453$, $P=0,0678$



Slika 19. Rezidualni dijagram koji prikazuje razlike između prediktivnih vrijednosti (plava iscrtkana linija) i izmjerenih vrijednosti (plavi kružići) nakon mjerenja akutne boli (B); $r=0,130$, $P=0,619$

Dodatnim statističkim analizama ispitane su sljedeće povezanosti kortizola i osmolarnosti: **a)** u uzorcima suza prije podražaja (A); **b)** u uzorcima suza poslije podražaja (B); **c)** u uzorcima suza prije podražaja kod žena ($A_{\text{ž}}$); **d)** u uzorcima suza nakon podražaja kod žena ($B_{\text{ž}}$); **e)** u uzorcima suza prije podražaja kod muškaraca (A_{M}); **f)** u uzorcima suza nakon podražaja kod muškaraca (B_{M}). Povezanosti u slučajevima a) i b) pokazale su se vrlo slabima i statistički neznačajnim ($r=0,453$; $P=0,0678$ i $r=0,130$; $P=0,619$).

Analizom povezanosti prema spolu utvrđeno je da ženski udio ne doprinosi ukupnoj povezanosti kortizola i osmolarnosti ($r=0,0732$, $P=0,841$; $r=0,321$, $P=0,366$). Suprotno tomu, muškarci pokazuju snažnu i statistički značajnu povezanost koncentracija kortizola i osmolarnosti u bazalnim vrijednostima ($r=0,815$; $P=0,0254$). Nakon podražaja akutne boli povezanost se gubi u sličnim proporcijama kao kod žena ($r=0,423$; $P=0,333$).

Slikama od 16. – 19. prikazani su regresijski modeli povezanosti kortizola i osmolarnosti u uzorcima A i uzorcima B neovisno o spolu. Povezanost u uzorcima A slaba je i na granici je statističke značajnosti, dok se u uzorcima B i ta slaba povezanost u potpunosti gubi.

Može se zaključiti da udio muškaraca u najvećoj mjeri pridonosi umjerenj povezanosti unutar skupine A ($r=0,445$; $P=0,0084$), budući da kod žena nije zabilježena značajna povezanost ($r=0,0732$; $P=0,841$). Koeficijent determinacije $R^2=0,205$ za skupinu A pokazuje da je modelom regresije moguće objasniti tek oko 20% odnosa kortizola i osmolarnosti (Slika 16. i 17.). Nakon podražaja akutnom boli nisu nađene povezanosti ni kod muškaraca ni kod žena.

5. RASPRAVA

Suze, tjelesna tekućina od vitalne važnosti za zaštitu očne površine i održavanje optimalnog oćnog zdravlja i jasnoće vida koja ima primjenu i kao dijagnostička tekućina. Također, čine se vrlo atraktivnim acelularim medijem zbog bogatstva sadržaja, a lake dostupnosti. Analitička je pak teškoća zbog vrlo malog volumena. Schirmerov test i kapilarno uzorkovanje su metode koje se obično primjenjuju za uzorkovanje i znanstveno istraživanje suza. U literaturi postoje kontroverze o utjecaju i korisnosti ovih metoda. Neki autori smatraju da je uzorkovanje kapilarnom manje invazivna metoda od Schirmerovog testa koji uzrokuje iritaciju i povećanje protoka tekućine (Choy, 2001). Dok drugi smatraju da je Schirmerov test brža, preciznija, jednostavnija i lakša metoda nego kapilarno uzorkovanje. Za kapilarno uzorkovanje potrebna je veća vještina (Posa, 2013) te je rizičnija za nastanak ozljeda.

U ovom istraživanju suze su uzorkovane Schirmerovim testom koji daje iznimno malu količinu uzorka. Zbog malog volumena najčešće se mora pribjegavati razrjeđenju. No, spajanjem uzoraka oba oka i metodom centrifugiranja dobiven je najveći mogući volumen. Prije samog postupka uzorkovanja suza na ispitanicima baždarena je metoda umjetnim suzama. Baždarenje je provedeno umjerenom pipetom pri čemu je ustanovljeno da potpuno napunjena površina filter papira (od početka do kraja skale) s minimalnom količinom volumena odgovara 40 μL . Po tome se već moglo zaključiti s kojom se količinom uzorka može raspolagati, ali pravi volumen ustanovljen je tek nakon centrifugiranja. Obradom uzoraka dobiven je volumen od $\sim 40 \mu\text{L}$ suza prije podražaja i do 100 μL podražajnih. Ohrabreni literaturnim podacima o sjeljivosti metode pribjeglo se razrjeđenju 1:5 koje je omogućilo dovoljan volumen za određivanje koncentracije kortizola i osmolarnosti. Donja granica osjetljivosti korištenog ELISA testa za određivanje koncentracije kortizola iznosi 0,15 ng/ml. U odnosu na podatke iz literature (Banbury, 2009) očekivane su više vrijednosti kortizola određivanog metodom ELISA. Dobivena vrijednost kortizola u literaturi je $14,1 \pm 5,6$ ng/ml, dok je u ovom istraživanju dobivena vrijednost $8,3 \pm 8,41$ ng/ml (Tablica 2). U znanstvenoj zajednici vrlo je malo radova koji su mjerili kortizol u suzama. Stoga je usporedba s drugim istraživanjima nemoguća. Puno je više podataka za mjerenje osmolarnosti. Razlog je tom primjena mikrometode uređajima koji izravno na površini rožnice mjere osmolarnost (www.tlc.tearlab.com).

Među ispitanicima najviše odstupa koncentracija kortizola samo jedne ispitanice (A=33 ng/ml; B=21,5 ng/ml) za razliku od ostalih koji nisu i u A i u B prelazili 16 ng/ml. Ovo iznimno odstupanje može se povezati sa slučajnim nepredviđenim događajem. U početku mjerenja bazalnog uzorka neočekivano je naišla majka njenog mladića. Bio je to prvi njihov susret koji možemo okarakterizirati akutnim psihološkim stresom. Budući da je ispitanica u potpunosti imala iste karakteristike kao i ostali, može se pripisati dodatnom stresu. S druge strane akutna fizička bol izazvala je kod nje isti stupanj smanjenja koncentracije kortizola što upućuje na zaključak da je taj psihološki akutni stres izazvao dugotrajniji i jači nadražaj nego li kratka fizička bol, kao i na zaključak da su ova dva mehanizma neovisna, odnosno da se adiraju.. Isključenje ispitanice iz statističke analize nije promijenilo rezultate usporedbe A i B uzorka, korelacijske odnose. Stoga su i njezini rezultati uključeni.

Bazalne vrijednosti osmotske koncentracije pokazale su se višima od očekivanih, dok su nakon podražaja te vrijednosti bile značajno niže. Dobivena viša vrijednost osmolarnosti možda se može pripisati filter papiru odnosno utjecaju mikročestica filter papira koje se možda otkidaju u procesu centrifugiranja. Također ulazak filter papira na meniskus može predstaviti stanoviti podražaj koji je možda mogao unijeti zabunu u nepouzdanost rezultata. No, budući da su uvjeti uzorkovanja prije i nakon akutne boli bili podjednaki, bilo je moguće uspješno pratiti razlike i usporedbe rezultata. Rezultati bazalnih osmotskih koncentracija u ovom istraživanju bili su $396 \pm 108,0$ mOsmol/L, a nakon podražaja $312 \pm 48,6$ mOsmol/L, dok su u drugim istraživanjima od 297 do 318 mOsmol/L (Nichols, 2006; Benjamin, 1983; Khanal, 2008). Mjerenje osmolarnosti u razrijeđenim uzorcima seruma i urina ispitani su prije istraživanja i utvrđena je dobra osjetljivost instrumenta. Štoviše, razrjeđenje 5 i 10 puta pokazalo je dobre rezultate (uzorci serum/urin: 287 ± 5 mOsmol/L / 381 ± 7 mOsmol/L; razrijeđeni uzorci 5x: 281 ± 5 mOsmol/L / 388 ± 8 mOsmol/L; razrijeđeni uzorci 10x: 271 ± 8 mOsmol/L / 390 ± 8 mOsmol/L). To još više potkrepljuje zaključak da su dobivene povišene vrijednosti mogle biti uzrokom čestica filter papira izazvanih brzinom centrifugiranja ($13 \times g$). Moguće je da bi se centrifugiranjem na manjoj brzini kroz 10 minuta dobili bolji rezultati.

Mehanizam akutne boli izazvane čupanjem nazalne dlačice temelji se na odgovoru na osjetni podražaj. Osjetni podražaj zatvara luk do lakrimalne žlijezde - u nadležnosti je autonomnog eferentnog (motoričkog) puta koji facijalnim živcem u parasimptičkom odsječku posredstvom pterigopalatinskog ganglionu provodi podražaj aksonima sve do lakrimalne žlijezde. Bol je oštra,

ali kratkotrajna te je moguće da podražaj prestaje u toku uzimanja suza. Nadražaj uz korijen dlačice aktivira simpatikus koji također potiče lučenje glavne suzne žlijezde.

Parametrijskim parnim t-testom provedena je usporedba mjerenja prije i nakon akutne boli. Rezultati usporedbe koncentracije kortizola prije i nakon podražaja u ukupnim uzorcima pokazali su da su vrijednosti u bazalnim uzorcima više ($P=0,0502$) od onih nakon akutne boli. Također, slični rezultati utvrđeni su i kod osmolarnosti ($P=0,0013$). Rasčlanjivanjem uzoraka prema spolu, statistički značajnim pokazale su se snižene vrijednosti osmolarnosti nakon akutnog podražaja kod žena.

U ukupnosti svih mjerenja ustanovljena je slaba korelacija ($r=0,445$), no ta povezanost pokazala je statističku značajnost ($P=0,0084$). Izdvajanje bazalnih uzoraka od ukupnih također je pokazalo slabu korelaciju ($r=0,453$; $P=0,0678$). Daljnjim rasčlanjivanjem, na muškarce i žene, utvrđeno je da ženski udio ne doprinosi ukupnoj povezanosti kortizola i osmolarnosti (A: $r=0,0732$; $P=0,841$ i B: $r=0,321$; $P=0,366$). Suprotno tome, utvrđeno je da muškarci pokazuju povezanost koja je statistički značajna u bazalnim uzorcima ($r=0,815$; $P=0,0254$). Prema tome, upravo muškarci u najvećoj mjeri doprinose umjerenj povezanosti u bazalnim uzorcima. Rasčlanjivanjem na muškarce i žene, broj uzoraka je premali, stoga rezultate treba provjeriti na većem broju uzoraka. U odnosu na umjerenu povezanost u bazalnim uzorcima, nakon podražaja akutnom boli nije ustanovljena povezanost ni kod muškaraca ni kod žena. Nakon bolnog podražaja, suze su uzorkovane u roku 5 minuta budući da osjetilni podražaj prenose A δ -neuronska vlakna brzinom 5-15m/s. Stoga je to sigurno bilo dovoljno vrijeme da se podražaj iz leđne moždine preko ganglionu vrati i direktno inervira glavnu suznu žlijezdu. Glavna žlijezda odgovorna je za brzo lučenje vode, a po našim rezultatima lako je moguće zaključiti da osim vode izlučuje i neke druge molekule.

Osjet boli s lica prenose primarni osjetni neuroni u ganglion nervusa trigeminusa, a receptori boli sudjeluju u „aksonskom refleksu“ tako da izazivaju vazodilataciju u okolini lokalne tkivne ozljede, dok se iz lokalnih mastocita oslobađa histamin, bradikinin, prostaglandin i K^+ ioni. Moguće je da upravo vazodilatacija, koja se događa u nekoliko sekundi, propušta kortizol koji onda u tom slučaju gubi korelaciju. Budući da u literaturi nisu pronađeni podaci, preostaje nam promišljati da su muškarci osjetljiviji na bolni podražaj, odnosno stres. Kao i da imaju jače podražaje kojim se onda svi mehanizmi povezani s akutnom boli kod njih više izražavaju (Susarla, 2014).

6. ZAKLJUČCI

1. Schirmerovim testom moguće je dobiti dovoljan volumen suza za ispitivanje koncentracije kortizola i osmotske koncentracije.
2. ELISA metodom izmjerena je koncentracija kortizola u suzama koja je usporediva s rezultatima u drugim istraživanjima.
3. Parametrijski parni t-test pokazuje da su se vrijednosti kortizola i osmolarnosti snizile kod svih ispitanika neovisno o spolu nakon podražaja akutne nazalne boli. Razdvajanjem u podskupine po spolu uočeno je da samo žene imaju statistički značajnu sniženu osmolarnost, ali ne i kortizol. Razlog gubitku statističke značajnosti zapažene u cjelokupnoj skupini (N=17), najvjerojatnije je mali broj ispitanika (N=7; N=10)
4. Sniženje koncentracije kortizola i osmotske koncentracije nakon akutne boli upućuje na povećano lučenje vode iz glavne žlijezde.
5. Analiza korelacije osmolarnosti i kortizola pokazuje umjerenu povezanost prije bolnog podražaja, koja se potpuno gubi nakon podražaja. Ta činjenica upućuje na mogućnost da žlijezda osim vode izlučuje još neke molekule pa možda i kortizol. Podražaj boli uz korijen dlačice aktivira simpatikus te je moguć njegov utjecaj na sekreciju žlijezde.
6. Muškarci pokazuju dobru korelaciju kortizola s osmolarnosti prije podražaja, dok se korelacija gubi nakon podražaja što možda upućuje na to da su osjetljiviji na bol odnosno da imaju jači neurovegetativni odgovor.

7. ZAHVALE

Posebno zahvaljujemo našoj mentorici izv. prof. dr. sc. Nadi Vrkić na uloženom trudu, strpljenju te na znanstvenim i stručnim savjetima koji su oblikovali ideju i pomogli nam u izradi ovog rada.

Zahvaljujemo i dr. Marinu Belaku, dr. med. spec. oftamologije na korisnim savjetima i pomoći u izradi praktičnog dijela rada.

Zahvaljujemo i djelatnicima Kliničkog zavoda za kemiju KBC Sestre milosrdnice na pomoći u izradi praktičnog dijela rada.

Zahvaljujemo i Krešimiru Bariću na uloženom trudu u obradi slika i grafike.

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

8. POPIS LITERATURE

1. Anisman H, Merali Z. Cytokines, stress, and depressive illness. *Brain Behav Immun*, 2002; 16: 513-24.
2. Banbury LK. Stress biomarkers in the tear film. Southern Cross University, 2009; 10, 65.
3. Benjamin WJ, Hill RM. Human tears: osmotic characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1983; 24:1624-6.
4. Bosch JA, De Geus EJC, Veerman ECI, Hoogstraten J, Amerongen AVN. Innate secretory immunity in response to laboratory stressors that evoke distinct patterns of cardiac autonomic activity. *Psychosom Med*, 2003; 65: 245-58.
5. Botelho SY. Tears and the Lacrimal Gland. *Sci Am*. 1964;211:78-86.
6. Choy CK, Cho P, Chung WY, Benzie IFF. Water-soluble antioxidants in human tears: effect of the collection method. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001; 42, 3130–134.
7. Dilly PN. Subsurface vesicles and tear film mucus. U *The Preocular Tear Film in Health, Disease and Contact Lens Wear*. Lubbock, Dry Eye Institute; 1986; 677-89.
8. Evans P, Bristow M, Hucklebridge FH, Clow A, Pang FY. Stress, arousal, cortisol and secretory immunoglobulin A in students undergoing assessment. *Brit J Clin Psychol*, 1994; 33: 575-6.
9. Farris RL. Tear analysis in contact lens wearers. *Trans Am Ophthalmol Soc*1985;83:501-45.
10. Ford LC, DeLange RJ, Petty RW. Identification of non-lysozymal bactericidal factor (beta lysin) in human tears and aqueous humor. *Am J Ophthalmol* 1976; 81: 30-3
11. Gilbard JP, Farris RL, Santamaria J, 2nd. Osmolarity of tear microvolumes in keratoconjunctivitis sicca. *Arch Ophthalmol*. 1978; 96:677-81.
12. Gillan WDH. Tear biochemistry: a review. *S Afr Optom* 2010; 69: 100-6.
13. Guyton AC, Hall JE. *Medicinska fiziologija*. X. izdanje, Zagreb: Medicinska naklada, 2003; 875-80.
14. Herbert J. Stress, the brain, and mental illness. *Brit Med J*, 1997; 315: 530-5.
15. Holly FJ, Lemp MA. Tear physiology and dry eyes. *Surv Ophthalmol* 1977; 22: 69-87.

16. Hucklebridge F, Clow A, Evans P. The relationship between salivary secretory immunoglobulin A and cortisol:neuroendocrine response to awakening and the diurnal cycle. *Int J Psychophysiol*, 1998; 31: 69-76.
17. Huth SW, Miller MJ, Leopold IH. Calcium and protein in tears: diurnal variation. *Arch Ophthalmol*. 1981;99:1628-33.
18. <http://hr.wikipedia.org/wiki/Kortizol>, pristupljeno 25. ožujka 2014.
19. <http://tlc.tearlab.com/?sec=doctors&cat=300&res=80>, pristupljeno 24. travnja 2014.
20. <http://www.bilicvision.hr/ofthalmologija/edukacija/anatomija-oka-interaktivni-prikaz>, pristupljeno 21. travnja 2014.
21. <http://www.drugs.com/health-guide/dry-eye-syndrome.html>, pristupljeno 21. travnja 2014.
22. <http://www.pintertrade.com/download/Brochure/Gonotec/Osmometer%20Brochure.pdf>, pristupljeno 25. ožujka 2014.
23. <http://www.slideshare.net/vijayjoshi311/tear-film-dynamics>, pristupljeno 30. ožujka 2014.
24. <http://www.studyblue.com/notes/note/n/special-senses/deck/8435478>, pristupljeno 21. travnja 2014.
25. Jalšovec D. Sustavna i topografska anatomija čovjeka, Zagreb: Školska knjiga, 2005; 134-135; 743-744; 750.
26. Kahle W, Leonhardt H, Platzer W. Živčani sustav i osjetila, Zagreb: Medicinska naklada, 1996; 316; 328.
27. Kaura R, Tiffany JM. The role of mucous glycoproteins. U *The Preocular Tear Film in Health, Disease and Contact Lens Wear*. Lubbock, Dry Eye Institute; 1986; 728-32.
28. Khanal S, Tomlinson A, McFadyen A, et al. Dry eye diagnosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:1407-14.
29. Mathers WD. Why the eye becomes dry: a cornea and lacrimal gland feedback model. *Clao J*. 2000; 26:159-65.
30. McDonald JE. Surface phenomena of tear films. *Trans Am Ophthalmol Soc*1968; 66: 905-09.
31. McEwen BS. Allostasis and allostatic load: Implications for neuropsychopharmacology *Neuropsychopharmacol*, 2000; 22: 108-24.

32. Milder B. The lacrimal apparatus. U Adler's Physiology of the Eye, 8ed, St Louis, Mosby; 1987; 15-35.
33. Mishima S. Some physiological aspects of the precorneal tear film. Arch Ophthalmol 1965; 73: 233-41.
34. Nater UM, Rohleder N, Gaab J, Berger S, Jud A, Kirschbaum C, Ehlert U. Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm. International J Psychophysiol, 2005; 55: 333-42.
35. Nichols JJ, Sinnott LT. Tear film, contact lens, and patient-related factors associated with contact lens-related dry eye. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006;47:1319-28.
36. Norn MS. The conjunctival fluid. Its height, volume, density of cells, and flow. Acta Ophthalmol 1966; 44: 212-22.
37. Petriček I. Utjecaj suznog filma na vidnu funkciju, Doktorska disertacija. Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2011; 13-8.
38. Posa A, Bräuer L, Schicht M, Garreis F, Beileke S, Paulsen F. Schirmer strip vs. capillary tube method: non-invasive methods of obtaining proteins from tear fluid. Ann Anat. 2013; 195:137-42.
39. Schoenwald RD, Vidvauns S, Wurster DE et al. The role of tear proteins in tear film stability in the dry eye patient and in the rabbit. Adv Exp Med Biol 1998; 438: 391-400.
40. Seefeldt D. Stress. pp. Leipzig: Urania-Verlag, 1989.
41. Seeman TE, Singer BH, Rowe JW, Horwitz RJ, McEwen BS. Price of adaptationalostatic load and health consequences: MacArthur studies of successful aging. Arch Intern Med, 1997; 157: 2259-68.
42. Sirigu P, Shen RL, Pinto da Silva P. Human meibomian glands: the ultrastructure of acinar cells as viewed by thin section and freeze-fracture transmission electron microscopies. Invest Ophthalmol Vis Sci 1992; 33: 2284-92.
43. Stern, Gao, Siemasko et al. Exp Eye Res, 2004.
44. Stratakis CA, Chrousos GP. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. Ann N Y Acad Sci. 1995; 771:1-18.
45. Susarla R, Liu L, Walker EA, Bujalska IJ, Alsalem J, Williams GP, Sreekantam S, Taylor AE, Tallouzi M, Southworth HS, Murray PI, Wallace GR, Rauz S. Cortisol biosynthesis in the human ocular surface innate immune response, 2014.

46. Šupe S, Poljaković Z, Kondić Lj, Unušić L, Alvir D. Neurološke osnove stresa i rizik razvoja moždanog udara, *Neurol. Croat.* Vol. 60, 1, 2011; 22.
47. Tomlinson A, Khanal S, Ramaesh K, et al. Tear film osmolarity: determination of a referent for dry eye diagnosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47:4309-15.
48. The Advanced® Tear Osmometer Model 3100 User's Guide: Advanced Instruments, Inc.; 2005.
49. Uputstvo za upotrebu, Cryoscopic Osmometer OSMOMAT® 030 model, 2007; Version 1.3
50. Uputstvo za upotrebu, EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Cortisol Saliva ELISA, REVISED 4 April 2012.
51. Zilva JF, Pannal PR, Mayne PD. Klinička kemija u dijagnostici i terapiji. III. prerađeno izdanje, Zagreb: Školska knjiga, 1992;. 30-4.

9. SAŽETAK

Suza nije samo kapljica vode na površini našeg oka, već je to složena tekućina čija tri sloja moraju biti u pravilnom omjeru da bi zaštitila naše oko na prikladan način. Neophodne su za podmazivanje, prehranu, održavanje zdravlja i optičke funkcije prednje površine oka, te jasan vid. Osim toga, smanjuju mogućnost infekcije, ispiru strana tijela iz oka i zadržavaju površinu očiju glatkom i čistom. Lučenje suza povezano je s centralnim i autonomnim živčanim sustavom. Bazalno, inervacija je usmjerena na pomoćne lakrimalne žlijezde, a u refleksnom odgovoru neuralni refleksni luk usmjeren je na glavnu lakrimalnu žlijezdu. Ispitivana je primjena suza u dijagnostici akutnog stresa. Osjet boli ujedno je trenutak stresa koji u odgovor na bol uključuje i medijatore stresa. Kortizol je, uz DHEA, adrenalin i noradrenalin, jedan od 4 osnovna posrednika u odgovoru na stres. Izvori kortizola u suzama još nisu razjašnjeni te postoji mogućnost da ih luči sama lakrimalna žlijezda. Osmolarnost suznog filma produkt je različitih koncentracija otopljenih tvari. Mjerenje osmolarnosti suznog filma predstavlja krajnji produkt promjene dinamike u suznom filmu. Cilj istraživanja bio je procijeniti koncentraciju kortizola i osmotsku koncentraciju u suzama prije i nakon podražaja te utvrditi postoji li konzistentni odgovor na akutni stres koji se može dijagnosticirati u suzama.

Ispitivana skupina sastojala se od 18 zdravih dobrovoljaca, od 10 žena i 8 muškaraca kojima su u KBC Sestre Milosrdnice uzorkovane suze iz oba oka. U radu korištena je ELISA metoda za određivanje koncentracije kortizola, dok je za određivanje osmotske koncentracije korištena metoda osmometrije.

Zaključno, muškarci su pokazali dobru korelaciju kortizola s osmolarnosti prije podražaja. Nakon akutnog stresa ta korelacija se gubi, što moguće upućuje na to da su muškarci osjetljiviji na bol. Podražaj boli posredstvom autonomnog živčanog sustava podražao je glavnu suznu žlijezdu koja je izlučivala veću količinu vode i prouzročila razrjeđenje te time izazvala sniženje koncentracije kortizola i osmotske koncentracije nakon podražaja. Analiza korelacije osmolarnosti i kortizola pokazuje umjerenu povezanost prije bolnog podražaja, koja se potpuno gubi nakon podražaja. Ta činjenica upućuje na mogućnost da žlijezda osim vode izlučuje još neke molekule pa možda i kortizol. Podražaj boli uz korijen dlačice aktivira simpatikus te je moguć njegov utjecaj na sekreciju žlijezde

Ključne riječi: suze, akutni stres, kortizol, osmolarnost, korelacija

10. SUMMARY

Tears are far more than just a fluid on the surface of our eyes. Consisting of three distinct layers, they are essential for eye protection, lubrication and nourishment as well as maintaining health of the eyes and optical function of their surface and for providing clear vision. Furthermore, tears prevent eye infections continually removing foreign matter and thus, keeping the surface of the eyes smooth and clear. Tear production is controlled both by the central and autonomic nervous system. While basal tears production is under control of the accessory lacrimal glands, reflex lacrimation is mediated by the neural reflex arc that stimulates the secretion of the main lacrimal glands. In this study, the applicability of tears in the diagnostics of acute stress was evaluated. Pain causes stress to the organism and therefore, production of stress mediators is stimulated. Cortisol is, along with DHEA, adrenalin and noradrenalin, one of the four main stress mediators. Although the origin of cortisol in tears is not known yet, it is assumed it might derive from the lacrimal gland. Various dissolved particles contribute to the osmolarity of the lacrimal fluid. The terminal product of the dynamic changes of the lacrimal fluid is determined by measuring the osmolarity of the lacrimal fluid. The main objectives of the study were to evaluate cortisol values and osmotic concentration in tears before and after stimulus and whether a consistent answer to stress which can be diagnosed in tears exists.

The study included 18 volunteers (10 women and 8 men) whose tears were collected and analyzed at the Clinical Hospital Center 'Sestre Milosrdnice'. The concentration of cortisol was measured using ELISA while osmometry was used as a method to determine the osmolar concentration.

In conclusion, male basal cortisol values showed good correlation with osmolarity in tears. After acute stress, the correlation in male samples was lost, which can be due to the higher sensitivity to pain in men. A pain trigger caused the stimulation of the main lacrimal gland via the autonomic nervous system. After stimulus, cortisol and osmolar concentration decreased due to the dilution caused by tear production. Correlation osmolarity and cortisol showed a moderate correlation before the painful stimulus, which is completely lost after the stimulus. This fact suggests the possibility that the gland secretes more than water molecules and maybe some cortisol. Pain stimulus to the root hairs activates the sympathetic nervous system and its possible effect on the secretion of glands.

Keywords: tears, acute stress, cortisol, osmolarity, correlation

11. ŽIVOTOPIS

Matea Ćurčić- rođena sam 11. listopada 1990. godine u Splitu. Završila sam Osnovnu školu Mejaši u Splitu 2005. godine. Srednju zdravstvenu školu, smjer fizioterapija završila sam 2009. godine te iste godine upisala Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu, smjer medicinska biokemija. Sudjelovala sam na 6. ISABS kongresu 2009. godine u Splitu te na Twin projektu 2013. godine (tema projekta: Dijagnostika malignih oboljenja) u Beogradu.

Maja Lukić- rođena sam 09. veljače 1988. godine u Osijeku. Završila sam Osnovnu školu „Dobriša Cesarić“ u Osijeku 2003. godine. 2007. godine završila sam Isusovačku klasičnu gimnaziju u Osijeku te iste godine upisala Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu, smjer medicinska biokemija. Sudjelovala sam na Twin projektima 2013. godine (tema projekta: Dijagnostika malignih oboljenja) u Beogradu, 2013. godine (tema projekta: Medicinski biokemičar 21. stoljeća- Farmakogenetika) u Zagrebu, 2014. godine (tema projekta: Medicinski biokemičar 21. stoljeća- Toksikologija i bromatologija) u Beogradu, na simpoziju FARMEBS 2013. godine u Zagrebu i na tečaju trajne edukacije 2013. godine u Zagrebu (tema projekta: Paratireoideja – multidisciplinarni pristup u dijagnostici, praćenju uspješnosti operacije i terapije).