

Laboratorinė medicina.
2018, t. 20, Nr. 2(78), p. 160–167.

Kortizolio koncentracijos plaukuose tyrimas ir jo reikšmė klinikinėje praktikoje bei moksliniuose tyrimuose

Eglė Mazgelytė
Dovilė Karčiauskaitė
Aušra Linkevičiūtė
Zita Aušrelė Kučinskienė

Santrauka

Kortizolis – pagrindinis gliukokortikoidas, sintetinamas iš cholesterolio antinksčių žievės pluoštinės zonos ląstelėse. Šio plačiu biologiniu poveikiu pasižymintio steroidinio hormono išsiskyrimas yra nespecifinių dirgiklių (pvz., fizinio ar psichologinio streso) sukeltos pogumburio-hipofizės-antinksčių (PHA) ašies aktyvacijos galutinis rezultatas. Kasdieniame klinikiniam darbe PHA ašies aktyvumui įvertinti atliekami tokie diagnostiniai tyrimai kaip deksametazono slopinimo testas, adrenokortikotropinio hormono (AKTH) koncentracijos nustatymas kraujo serume bei kortizolio koncentracijos tyrimas kraujo serume ar paros šlapime. Minėti tyrimai atspindi momentinę ar trumpalaikę kortizolio sekreciją, tačiau nesuteikia informacijos apie ilgalaikio PHA ašies aktyvumo pokyčius. Šiuo tikslu kaip tiriamoji medžiaga pradėti naudoti plaukai, pasižymintys unikalia savybe kaupti steroidinius hormonus ir kitas lipofilines medžiagas. Atliktų tyrimų duomenimis, kortizolio koncentracijos plaukuose nustatymo tyrimas gali būti naudingas Kušingo sindromui diagnozuoti, pakaitinės gliukokortikoidų terapijos stebėsenai atlikti, patiriamo lėtinio streso lygio bei kardiometabolinių ligų rizikai įvertinti. Nepaisant didžiulio mokslininkų susidomėjimo ir gausybės atliktų tyrimų, vis dar trūksta duomenų, apibūdinančių kitų su stresu susijusių veiksnių (plaukų spalvos ir augimo greičio, tiriamųjų lyties, amžiaus, etninės grupės) įtaką kortizolio koncentracijos plaukuose pokyčiams. Skirtingos įvairių autorių siūlomos mėginio paruošimo procedūros bei analizės metodai tampa dideliu iššūkiu siekiant tyrimą standartizuoti, įdiegti į klinikinę praktiką ir palyginti skirtingų tyrimų rezultatus. Pagrindinis šio straipsnio tikslas – apžvelgti kortizolio koncentracijos plaukuose nustatymo svarbą klinikinėje praktikoje ir moksliniuose tyrimuose bei išnagrinėti šiuo metu taikomus metodus minėto hormono kiekybinei analizei plaukų mėginiuose.

Reikšminiai žodžiai: kortizolio kiekis plaukuose, pogumburio-hipofizės-antinksčių ašis, lėtinis stresas, kardiometabolinės ligos, Kušingo sindromas, efektyvioji skysčių chromatografija.

ĮVADAS

Kortizolis – pagrindinis gliukokortikoidas, sintetinamas iš cholesterolio antinksčių žievės pluoštinės zonos ląstelėse [1]. Kortizolio išsiskyrimas yra nespecifinių dirgiklių (pvz., fizinio ar

psichinio streso) sukeltos pogumburio-hipofizės-antinksčių (PHA) ašies aktyvacijos rezultatas. Veikiant minėtiems dirgikliams nerviniai impulsai iš smegenų žievės pasiekia pogumburio prieskilvelinį branduolį (lot. *nucleus paraventricularis*) ir skatina ad-

Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedra

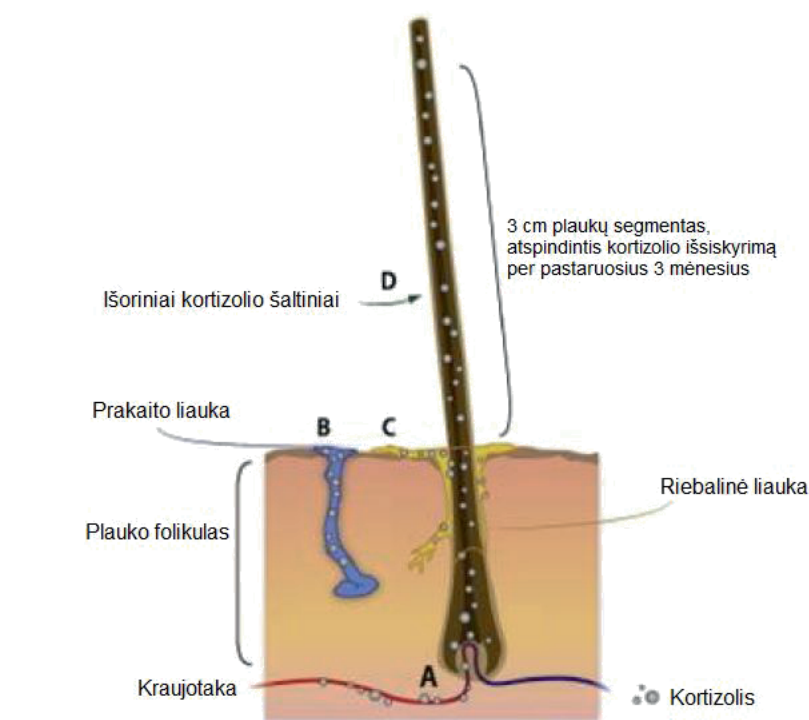
Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Vilnius University
El. paštas egle.mazgelyte@mf.vu.lt

renokortikotropiną atpalaiduojančio hormono sekreciją. Pastarasis jungiasi prie priekinėje hipofizės dalyje esančių receptorių ir aktyvina adrenokortikotropinio hormono (AKTH) sintezę. Veikiant AKTH skatinamas kortizolio išsiskyrimas iš antinksčių žievės ląstelių. Minėtus procesus reguliuoja neigiamas grįžtamasis ryšys, veikiantis visus PHA ašies komponentus: padidėjusi kortizolio koncentracija slopina adrenokortikotropiną atpalaiduojančio hormono, AKTH bei kortizolio sintezę pogumburyje, hipofizėje bei antinksčiuose [1–3].

Žinoma, jog PHA ašies ir jos reguliacinių mechanizmų sutrikimai pasireiškia tokiomis endokrininėmis ligomis kaip Kušingo sindromas ar Adisono liga, tačiau dėl plataus kortizolio biologinio ir fiziologinio poveikio literatūroje vis dažniau analizuojamas ryšys tarp padidėjusios kortizolio koncentracijos ir įvairių metabolinių, širdies ir kraujagyslių ligų išsivystymo, depresijos bei kitų psichikos ir elgesio sutrikimų [3–7]. PHA ašies aktyvumui įvertinti taikomi įvairūs diagnostiniai metodai: deksametazono slopinimo testas, AKTH koncentracijos tyrimas kraujo serume bei kortizolio koncentracijos nustatymas seilėse, kraujo serume bei paros šlapime. Taisant minėtus metodus įvertinamas momentinis arba trumpalaikis PHA ašies aktyvumas, nes rezultatams reikšmingą įtaką daro antinksčių žievės steroidiniams hormonams būdinga pulsinė sekrecija bei cirkadinis bioritmas [4, 8, 9]. Todėl pastarąjį dešimtmetį ilgalaikio PHA ašies aktyvumo stebėsenai kaip tiriamoji medžiaga pradėti naudoti plaukai, pasižymintys unikalios savybe kaupti steroidinius hormonus ir kitas lipofilines medžiagas [8].

KORTIZOLIO KONCENTRACIJOS PLAUKUOSE IR KITOSE ORGANIZMO TERPĖSE NUSTATYMAS

Kortizolio koncentracija seilėse, kraujo serume bei šlapime atspindi kortizolio išsiskyrimą per paskutines minutes ar valandas, nes reikšmingą įtaką matavimų rezultatams daro ne tik chronobiologiniai mechanizmai, bet ir ūminis stresas, rūkymas, alkoholio vartojimas, intensyvus fizinis krūvis [1, 4, 8]. Siekiant įvertinti ilgalaikį PHA ašies aktyvumą kaip tiriamąją medžiagą naudojant seiles, kraujo serumą ar paros šlapimą, reikalingos dažnos ėminių paėmimo procedūros, kurias sudėtinga standartizuoti [3, 7].



1 pav. Galimi kortizolio patekimo į plauką mechanizmai.

Hormonas į plauką patenka iš kraujotakos per plauko folikule esančius kapiliarus (A), iš prakaito (B) ir riebalinių (C) liaukų sekreto bei išorinių kortizolio šaltinių (D) [14].

Fig 1. A proposed mechanism of cortisol incorporation into hair.

Cortisol may be incorporated into hair from blood capillary (A), sweat (B), sebum (C), and from external cortisol sources (D) [14].

Nustatyta, jog plaukai per mėnesį paauga apie 1 cm, todėl pasirinkus atitinkamą plaukų ėminio ilgį, galima nustatyti kortizolio kiekį, išsiskyrusį 1–9 mėnesių laikotarpiu, o atskirai analizuojant skirtingus plaukų segmentus galima vertinti gydymo hidrokortizonu efektyvumą, stebėti ligos (pavyzdžiui, Kušingo sindromo) eigą bei palyginti kortizolio koncentraciją plaukuose prieš stresą sukūlusį įvykį ir po jo [6, 9–12]. Svarbu pažymėti ir tai, kad plaukų ėminio paėmimo procedūra yra mažiau invazyvi, ėminys yra pakankamai stabilus, o jo transportavimui ir saugojimui nereikalingos ypatingos sąlygos [3, 13].

Kortizolis – nedidelės molekulinės masės, hidrofobinėmis savybėmis pasižymintis steroidinis hormonas, todėl manoma, jog į plauką kortizolis patenka pasyvios difuzijos būdu iš kraujotakos per plauko folikule esančius kapiliarus, taip pat iš riebalinių ir prakaito liaukų sekreto bei egzogeninių kortizolio šaltinių (pvz., vaistinių gliukokortikoidų preparatų) (1 pav.) [13, 14]. Todėl tiriant kortizolio kiekį plaukuose, priešingai nei kraujo serume, išmatuojama tik laisvo, biologiškai aktyvaus hormono koncentracija, kuri nepriklauso nuo kortizoli sujungiančių baltymų kiekio kraujyje [7, 13].

B. Sauve su kolegomis [15] atliktas tyrimas patvirtino, jog kortizolio kon-

centracija, išmatuota skirtingose organizmo terpėse, atspindi momentinį (seilėse ir kraujo serume) arba ilgalaikį (plaukuose) PHA ašies aktyvumą, todėl skirtingą informaciją suteikiantys rezultatai nekoreliuoja tarpusavyje. Tyrimo metu 39 asmenims buvo ištirta kortizolio koncentracija plaukuose, kraujo serume bei seilėse. Mokslininkai nustatė statistiškai reikšmingą ryšį tarp kortizolio koncentracijos seilėse ir kraujo serume ($r = 0,58$, $p = 0,0016$), tačiau statistiškai reikšmingų sąsajų tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir kraujo serume ar seilėse tyrėjams nustatyti nepavyko ($r = 0,064$, $p = 0,695$ ir $r = 0,306$, $p = 0,119$).

KORTIZOLIO KONCENTRACIJOS PLAUKUOSE NUSTATYMO SVARBA KLINIKINĖJE PRAKTIKOJE IR MOKSLINIuose TYRIMUOSE

PHA ašies aktyvumo ar reguliacinių mechanizmų pokyčiai ir dėl to sumažėjusi ar padidėjusi kortizolio koncentracija plaukuose yra susijusi su kai kurių somatinių ir psichinių ligų išsivystymu bei fizinį ar psichinį stresą sukeliančių veiksnių poveikiu (žr.

lentele). Todėl kortizolio koncentracijos plaukuose tyrimas galėtų būti taikomas Kušingo sindromui ir psichikos sutrikimams diagnozuoti, pakaitinės gliukokortikoidų terapijos stebėsenai atlikti, patiriamo lėtinio streso lygiui ir kardiometabolinių ligų rizikai įvertinti [4].

Kušingo sindromo diagnostika

Daugelio tyrimų duomenimis, Kušingo sindromu sergantiems pacientams būdinga padidėjusi kortizolio koncentracija plaukuose lyginant su sveikais tiriamaisiais [4, 16, 17]. L. Manenschijs ir bendraautorų tyrimai [4, 17] parodė, kad minėto tyrimo jautrumas diagnozuojant Kušingo sindromą yra 86 %, o specifiskumas – 98 %. Todėl galima teigti, jog kortizolio koncentracijos plaukuose tyrimas yra ne mažiau informatyvus nei tradiciniai Kušingo sindromo diagnostikai taikomi metodai: mažų dozių deksametazono slopinimo testas, laisvo kortizolio kiekio nustatymas paros šlapime bei kortizolio koncentracijos tyrimas kraujo serume. Taip pat žinoma, kad Kušingo sindromu sergančių pacientų kortizolio sekrecijos ritmas yra nereguliarus, todėl daugumai pacientų kartojant tyrimus gaunamas bent vienas normalus laisvo kortizolio koncentracijos paros šlapime bei mažų dozių deksametazono slopinimo testo rezultatas [4]. Tačiau kortizolio koncentracijos plaukuose tyrimas atspindi ilgalaikę kortizolio sekreciją ir pakartotiniai tyrimai nėra būtini [3, 4].

Literatūros duomenimis, skirtingų plaukų segmentų analizės rezultatus derinant su paciento klinikiniais simptomais, atsiranda galimybė nustatyti Kušingo sindromo išsivystymo pradžią bei stebėti ligos eigą [4, 16, 17]. L. Manenschijs ir bendra autoriai [18], atlikę Kušingo sindromu sergančių pacientų plaukų segmentų analizę, nustatė, jog kortizolio koncentracija plaukuose reikšmingai sumažėjo pradėjus medikamentinį gydymą ketokonazoliu ir pritaikius chirurginį hipofizės mikroadenomos transsfenoidinį gydymą. V. L. Wester su kolegomis [19] atliktas atvejo ir kontrolės tyrimas atskleidė, jog optimali kortizolio koncentracijos plaukuose ribinė vertė (nustatyta ELISA metodu) diagnozuojant Kušingo sindromą yra 31,1 pg/mg (jautrumas – 93 %, specifiskumas – 90 %, plotas po ROC kreive – 0,958). Minėtų mokslininkų tyrimų [18, 19] duomenimis, pacientams, kuriems diagnozuotas ektozinis Kušingo sindromas, kortizolio koncentracija plaukuose reikšmingai padidėja 3–6 mėne-

Lentelė. Veiksniai, susiję su padidėjusia ar sumažėjusia kortizolio koncentracija plaukuose [4]

Table. Factors associated with higher or lower hair cortisol levels [4]

	Padidėjusi kortizolio koncentracija plaukuose	Sumažėjusi kortizolio koncentracija plaukuose
Somatiniai veiksniai	Kušingo sindromas Hidrokortizono vartojimas Nutukimas Metabolinis sindromas Cukrinis diabetas Širdies ir kraujagyslių ligos Sunkus širdies nepakankamumas Nesenai įvykęs miokardo infarktas	Įkvėpiamųjų gliukokortikoidų vartojimas nuo astmos
Stresą sukeliantys veiksniai (stresoriai)	Intensyvus aerobinis fizinis krūvis Traumos Gyvenimiški įvykiai Nedarbas Pamaininis darbas Lėtinis skausmas	Trauminė patirtis
Psichikos sutrikimai	Potrauminis streso sutrikimas* Depresija Bipolinis afektinis sutrikimas	Potrauminis streso sutrikimas* Generalizuotas nerimo sutrikimas Panikos sutrikimas

*Pastaba: Potrauminio streso sutrikimas susijęs tiek su padidėjusia, tiek su sumažėjusia kortizolio koncentracija plaukuose, priklausomai nuo trauminio įvykio, tiriamo ėminio charakteristikų bei laikotarpio tarp patirto trauminio įvykio ir kortizolio koncentracijos plaukuose tyrimo.

siais anksčiau, nei pasireiškia klinikiniai ligos požymiai. Taigi, kitose šalyse atliktų tyrimų rezultatai patvirtina kortizolio koncentracijos plaukuose nustatymo svarbą Kušingo sindromo laboratorinei diagnostikai, tačiau būtina toliau tirti kitų, mažiau literatūroje išnagrinėtų veiksnių (pvz., tiriamųjų etninės grupės, amžiaus, lyties, plaukų spalvos ir augimo greičio) įtaką kortizolio koncentracijos plaukuose pokyčiams.

Pakaitinės gliukokortikoidų terapijos stebėseną

Klinikinėje praktikoje lėtinio ar ūminio antinksčių nepakankamumu sergantiems pacientams paprastai yra skiriamas kortizoliui chemiškai identiškas gliukokortikoidas hidrokortizonas [20, 21]. Įprastinė pakaitinės terapijos geriamojo gliukokortikoidų preparato dozė yra 15–25 mg per parą [20]. Tačiau dėl pacientams būdingo įvairaus hidrokortizono absorbcijos greičio ir individualių metabolizmo ypatumų pastebėtas skirtingas kiekvieno paciento klinikinis atsakas į tą pačią hidrokortizono dozę [21]. Hidrokortizono biologinio poveikio stiprumas priklauso ir nuo paciento jautrumo preparatui, kurį lemia polimorfizmai gliukokortikoidų receptorių koduojančiuose genuose [20]. Gliukokortikoidų preparatų dozavimo svarbą patvirtina ir klinikinių tyrimų rezultatai: nustatyta, jog hidrokortizono perdozavimas yra susijęs su padidėjusia širdies ir kraujagyslių ligų išsivystymo bei mirtingumo rizika pacien-

tams, sergantiems pirminiu ar antriniu antinksčių nepakankamumu [21].

S. M. Staufenbiel su kolegomis [20] vykdymo tyrimo rezultatai parodė, jog pacientams, gydomiems hidrokortizonu, būdinga didesnė kortizolio koncentracijos plaukuose mediana nei sveikiems, gliukokortikoidų nevartojantiems asmenims (33,89 pg/mg *vs* 10,07 pg/mg, $p < 0,001$). Tačiau R. Gow ir bendraautorų [21] publikuoti duomenys rodo skirtingą pakaitinės gliukokortikoidų terapijos poveikį vyrams ir moterims: tyrėjai nustatė statistiškai reikšmingus kortizolio koncentracijos plaukuose medianų skirtumus tarp gliukokortikoidus vartojančių ir nevartojančių vyrų (241,6 ng/g *vs* 196,8 ng/g, $p = 0,048$), tačiau moterų grupėje reikšmingų skirtumų nepastebėta ($p = 0,076$). Minėtuose tyrimuose [20, 21] nustatyti statistiškai reikšmingi ryšiai ($r = 0,18$, $p = 0,04$ ir $r = 0,3$, $p < 0,01$) tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir pacientams skiriamos hidrokortizono dozės, todėl autoriai daro prielaidą, jog kortizolio koncentracijos tyrimas galėtų būti naudingas nustatant perdozavimo hidrokortizonu epizodus ir taip koreguojant paciento individualų gydymo planą.

Kardiometabolinių ligų rizikos įvertinimas

Žinoma, jog dėl pakaitinės gliukokortikoidų terapijos ar Kušingo sindromo išsivystęs hiperkortizolizmas yra susijęs su tokiais kardiometabolinių ligų rizikos veiksniais kaip nutukimas,

dislipidemija, angliavandenių apykaitos sutrikimai bei hipertenzija [3, 4, 7, 9, 22, 23]. Tačiau kortizolio koncentracijos nustatymas organizmo skysčiuose (kraujo serume, seilėse, šlapime) suteikia per mažai informacijos siekiant įvertinti nedidelių, fiziologiškai normalių kortizolio koncentracijos pokyčių svarbą minėtų rizikos veiksnių pasireiškimui [4]. Daugelyje atliktų tyrimų nustatyti reikšmingi ryšiai tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir padidėjusios cukrinio diabeto, širdies ir kraujagyslių ligų bei metabolinio sindromo išsivystymo rizikos [8–10].

Kortizolio, kaip ir kitų gliukokortikoidų, biologinis poveikis pasireiškia atsparumo insulinui išsivystymu ir gliukoneogenezės aktyvinimu kepenyse, todėl ilgą laiką padidėjusi kortizolio koncentracija veikia diabetogeniškai. J. G. Abell ir bendraautorių [9] atliktame kohortiniame tyrime kortizolio koncentracija plaukuose nustatyta 3507-iems 59–83 metų asmenims. Išanalizavus tyrimo rezultatus paaiškėjo, jog pacientams, sergantiems II tipo cukriniu diabetu, būdingos statistiškai reikšmingai ($p = 0,007$) didesnės kortizolio koncentracijos plaukuose vertės, palyginti su sveikais tiriamaisiais (procentinis vidurkių skirtumas: 21,1 (95 % PI [9,9; 33,4])) ir atsižvelgus į tokius veiksnus kaip lytis, amžius, etninė grupė, plaukų spalva ir jų plvimimo dažnis bei vartojami vaistai.

Skirtingų klinikinių ir epidemiologinių tyrimų duomenimis, širdies ir kraujagyslių ligų patogenezėje reikšmingas ne tik oksidacinis ar hemodinaminis, bet ir psichosocialinis stresas [24]. Manoma, jog lėtinis stresas, patirtas įvairiais amžiaus tarpsniais, yra susijęs su 40–60 % padidėjusia širdies ir kraujagyslių sistemos ligų rizika [25]. Biologinio streso žymens kortizolio koncentracijos plaukuose tyrimas leidžia mokslininkams įvertinti ryšį tarp patiriamo lėtinio streso lygio ir rizikos sirgti širdies ir kraujagyslių ligomis [4]. L. Manenshijn ir bendraautoriai [8] ištyrė 283 vyresnio amžiaus asmenų (65–85 metai) kortizolio koncentraciją plaukuose ir nustatė statistiškai reikšmingai didesnę riziką sirgti širdies ir kraujagyslių ligomis (kronarinė širdies liga, insultas, periferinių arterijų liga) pacientams, kurių kortizolio koncentracija plaukuose patenka į ketvirtąjį kvartilį, palyginti su tiriamaisiais, kurių minėto hormono koncentracijų plaukuose vertės yra pirmajame kvartilyje ($\bar{S}S = 2,7$, $p = 0,01$).

Metabolinis sindromas – medžiagų apykaitos sutrikimas, kuriam būdingi požymiai yra centrinio tipo nutuki-

mas, hipertenzija, hiperglikemija ir dislipidemija. Manoma, jog pakitęs PHA ašies aktyvumas ir intensyvi gliukokortikoidų sekrecija lemia padidėjusią metabolinio sindromo išsivystymo riziką, nes kortizolio biologinis poveikis pasireiškia lipidų ir angliavandenių apykaitos reguliacija, o padidėjęs šio hormono kiekis yra susijęs su centrinio tipo nutukimu, atsparumu insulinui ir hiperglikemija, hipertenzija bei dislipidemija [26–29]. Siekdami išsamiau išnagrinėti ryšį tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir metabolinio sindromo išsivystymo rizikos T. Stalder ir bendraautoriai [26] ištyrė 1258-ių asmenų (16–64 metų amžiaus, 24 % diagnozuotas metabolinis sindromas), dirbančių Vokietijos aviacijos kompanijoje, plaukų ėminius. Atsižvelgę į tiriamųjų lytį, amžių, rūkymo įpročius bei -glutamilttransferazės aktyvumo kraujo serume vertes, tyrėjai nustatė, jog didesnė kortizolio koncentracija plaukuose susijusi su padidėjusia metabolinio sindromo išsivystymo rizika.

Lėtinio streso įvertinimas

Ūminiam ir trumpalaikiam stresui įvertinti kortizolio koncentracija nustatoma serume, seilėse ir šlapime [30, 31], tačiau analizuojant patiriamo lėtinio fizinio arba psichologinio streso lygį tiriami plaukų mėginiai arba naudojamos lėtinio streso lygį įvertinančiais psichologiniais testais (pacientų individualiai pildomais klausimynais) [32]. Literatūros duomenimis, vienas iš dažniausiai naudojamų testų yra subjektyviai suvokiamo streso skalė PSS (angl. *Perceived Stress Scale*), įvertinanti bendrą destruktivaus streso lygį ir individo gebėjimą įveikti stresą [6]. Lėtinio streso tyrimams taikomas ir Triero lėtinio streso testas TICS (angl. *Trier Inventory for Chronic Stress*). Šis klausimynas sudarytas iš 9 dalių: darbo perkova, socialinė perkova, įtampa darbe, nepasitenkinimas darbu, netinkami darbo reikalavimai, socialinis pripažinimas, socialinė įtampa, socialinė izoliacija ir lėtinis nerimas. Atlikdami TICS respondentai kiekvienoje klausimyno dalyje pateiktus teiginius vertina pagal 5 balų Likerto skalę (0 – niekada, 1 – retai, 2 – kartais, 3 – dažnai, 4 – labai dažnai) [32]. Nors atlikta nemažai tyrimų, kuriuose nagrinėtas ryšys tarp tiriamųjų subjektyviai įvertinto patiriamo lėtinio streso lygio ir kortizolio koncentracijos plaukuose verčių, gauti rezultatai yra prieštaringi [6, 7, 10, 34].

S. M. Staufenbiel su kolegomis [7] sudarytoje sisteminėje literatūros ap-

žvalgoje analizuotas ryšys tarp PSS įverčio ir kortizolio koncentracijos plaukuose. Iš 19-os apžvalgoje nagrinėtų publikacijų 11-oje tyrimų naudotas PSS klausimynas: 4-iose tyrimuose nustatyta tiesioginė arba atvirkštinė priklausomybė tarp PSS taškų ir kortizolio koncentracijos plaukuose, o 7-iose tyrimuose ryšio tarp šių kintamųjų nerasta. Pastarieji rezultatai aiškinami tuo, kad respondentų pildytas klausimynas sudarytas taip, kad įvertintas tik per paskutinį mėnesį patirto streso lygis, o tirtų plaukų ilgis pasirinktas toks, kad įtakos rezultatams galėjo turėti paciento psichologinės ir emocinės būklės pokyčiai vieno, dviejų, trijų ar net devynių mėnesių laikotarpiu. Kitoje S. M. Staufenbiel ir bendraautorių parengtoje publikacijoje išanalizuoti rezultatai tų tyrimų, kuriuose lėtiniam stresui įvertinti naudotas TICS, tačiau statistiškai reikšminga tiesioginė priklausomybė nustatyta tik tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir socialinę perkovą įvertinančios klausimyno dalies įverčių balais [6].

Taigi minėti tyrėjai [6, 7] padarė išvadą, jog tiriamųjų pildomi streso vertinimo klausimynų rezultatai ne visada koreliuoja su objektyviai išmatuojamų biocheminių rodiklių (pvz., kortizolio koncentracija plaukuose) vertėmis. Tokias tendencijas galima paaiškinti dvejopai: ribotomis klausimynų galimybėmis objektyviai įvertinti patiriamo streso lygį bei kitų, su stresu nesusijusių veiksnių, lemiančių kortizolio koncentracijos pokyčius organizme, įtaką. Todėl sąsajoms tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir patiriamo lėtinio streso lygio įvertinti reikalingi papildomi moksliniai tyrimai.

KORTIZOLIO KONCENTRACIJOS PLAUKUOSE NUSTATYMAS

Kortizolio koncentracijos plaukuose tyrimas susideda iš kelių etapų: plaukų ėminio surinkimo ir paruošimo analizei bei kiekybinio kortizolio koncentracijos plaukuose įvertinimo taikant imunofermentinius (IFA), skysčių chromatografijos ir masių spektrometrijos (SCH-MS) ar kitus metodus [19, 35–37].

Plaukų ėminio surinkimas

Kortizolio koncentracijos nustatymo tyrimams naudojami plaukai kerpami nuo viršugalvio užpakalinės dalies kuo arčiau galvos odos, o tiriamų plaukų pluoštelio ilgis svyruoja nuo 1 cm iki 6 cm. 80 % iki šiol atliktų tyrimų

buvo naudojami 2–3 cm ilgio plaukų ėminiai. Nustatyta, jog kortizolio koncentracija plaukuose mažėja tolstant nuo distalinės (arčiau galvos odos) link proksimalinės plaukų pluoštelio dalies (pasireiškia „išplovimo“ efektas), todėl nerekomenduojama naudoti ilgesnių nei 6 cm ilgio plaukų [13, 19, 33, 36, 38]. Kai kuriuose tyrimuose „išplovimo“ efektas neparodytas, tačiau šiuose tyrimuose mėginio paruošimo etape praleistas plaukų plovimo etapas ir įtaką rezultatams galėjo daryti egzogeninės kilmės gliukokortikoidai [4, 13]. Analizei naudojamas plaukų kiekis siekia 10–100 mg, o surinkti plaukų ėminiai turi būti saugomi sausoje ir tamsioje aplinkoje kambario temperatūroje. Ėminių laikymas šaldytuve ar šaldiklyje gali lemti plaukų struktūros pokyčius ir steroidinių hormonų praradimą, dėl kurio gaunama sumažėjusi minėtų hormonų koncentracija. Jei surinkti ėminiai yra drėgni, rekomenduojama prieš analizę ar ilgalaikį saugojimą juos išdžiovinti [35–37].

Plaukų ėminio paruošimas analizei

Daugumoje tyrimų plaukų ėminio paruošimas analizei pradedamas ėminio plovimo procedūra, kuri reikalinga siekiant sumažinti pašalinių medžiagų (plaukų priežiūros priemonių, prakaito ir riebalinių liaukų sekreto) įtaką gaunamiems rezultatams bei išvengti su egzogeniniais gliukokortikoidų šaltiniais susijusios taršos. Plaukų plovimui naudojami skirtingi tirpikliai: chloroformas, metileno chloridas, metanolis ir izopropanolis. Vis dėlto manoma, jog tinkamiausi plovimui yra nedideliu poliškumu pasižymintys organiniai tirpikliai, pavyzdžiui, izopropanolis ir metileno chloridas [36, 38, 39]. Minėti tirpikliai nepakeisdami plauko struktūros puikiai pašalina egzogenines medžiagas ir „neišplaua“ iš kraujotakos į plauko folikulą patekusių steroidinių hormonų [36, 38]. Skirtingų tyrėjų sudarytose metodikose nurodoma atlikti vieną arba dvi plovimo procedūras, trunkančias 2–10 min. [4, 39, 40]. Pastarosios procedūros svarbą šalinant egzogeninės kilmės gliukokortikoidus patvirtina ir eksperimentiniai duomenys: nustatyta, jog du kartus po 3 min. plaunant plaukus izopropanoliu nustatoma 27 % mažesnė kortizolio koncentracija, palyginti su prieš analizę neplautais ėminiais, o trečias ėminio plovimas sumažina kortizolio koncentraciją dar 7 % [4].

Siekiant padidinti ekstrakcijos efektyvumą plaukai paprastai yra su-

smulkinami, tačiau vis daugėja duomenų, jog ši procedūra nėra būtina [4, 33, 36, 40]. Pagrindinis minėtos procedūros trūkumas – tikimybė smulkinti metu prarasti dalį pradinio ėminio kiekio. Taip pat naudojant nesmulkintus plaukus sutrumpėja mėginio paruošimo analizei etapas, o tai ypač svarbu tiriant didelį kiekį mėginių [36].

Kitas svarbus mėginio paruošimo analizei etapas yra ekstrakcija. Steroidinių hormonų ekstrakcijai iš plaukų ėminio paprastai naudojami Sorenso buferinis tirpalas, druskos rūgštis arba metanolis, tap pat šiame etape papildomai pridedama vidinio standarto [33, 36, 40]. Literatūros duomenimis, ekstrakcija paprastai vykdoma 12–18 val. Dažniausiai ekstrakcijai naudojamas hidrofilinėmis savybėmis pasižymintis ir lengvai į plauko vidines struktūras įsiskverbiantis metanolis, kuris ištirpina neutralias, hidrofilines ar vidutiniškai lipofilines medžiagas, todėl puikiai tinka steroidinių hormonų ekstrakcijai [36, 38]. Nepaisant minėtų privalumų svarbu pažymėti ir tai, jog su metanolio ekstrakta patenka ir analizei nepageidaujamų, analitės signalą slopinančių medžiagų, todėl po ekstrakcijos reikalingos papildomos procedūros: skysčių-skysčių ekstrakcija arba kietafazė ekstrakcija (KFE). Dirbant su plaukų mėginiais tolesniam ekstrakto gryninimui dažniausiai naudojama KFE [36]. Kai kurių autorių aprašytose metodikose ekstrakto gryninimui KFE nenaudojama, o gautas ekstraktas nugarinamas azoto dujų sraute iki sausos liekanos, kuri ištirpinama atitinkamame buferiniame (dažniausiai fosfatiname) tirpale [4, 38].

Šiuo metu rankinį KFE metodą vis dažniau keičia pusiau arba visiškai automatizuoti metodai, pasižymintys geresniu atkuriamumu ir mažesne mėginių užteršimo tikimybe. Naudojantis automatizuotais KFE metodais sumažinama ekstrakcijos trukmė ir atsiranda galimybė vienu metu vykdyti didelio kiekio skirtingų mėginių ekstrakciją [39].

Kiekybinis kortizolio koncentracijos plaukuose įvertinimas

Kortizolio koncentracijai plaukuose nustatyti naudojami chemiluminescenciniai, radioimuniniai, imunofermentiniai (IFA), dujų chromatografijos ir masių spektrometrijos (DCh-MS) bei efektyviosios skysčių chromatografijos ir masių spektrometrijos (ESCh-MS) metodai [35, 36, 41].

Imunofermentiniai metodai yra santykinai jautrūs, nesudėtingi ir greitai atliekami, tačiau nepakankamai specifiški. Mažas specifiskumas aiškinamas kryžminėmis reakcijomis, vykstančiomis su kitomis plauko matricoje esančiomis medžiagomis (steroidais ir kitais lipidais). Dėl nedidelio imunofermentinių metodų specifiskumo gaunamos klaidingai didesnės tiriamos analitės koncentracijos [35, 36, 41]. Kitas imunofermentinių metodų trūkumas – ribotas dinaminis matavimų intervalas. IFA metodai nėra tinkami labai mažoms kortizolio koncentracijoms nustatyti, o tai ypač svarbu tiriant sudėtingos matricos biologinius mėginius (pvz., plaukus). Verta paminėti ir tai, jog naudojant komercinius IFA rinkinius vieno tyrimo metu galima nustatyti tik vienos analitės koncentraciją [36, 41].

Dujų chromatografijos ir masių spektrometrijos metodas pasižymi dideliu specifiskumu ir yra sėkmingai pritaikytas tiriant androgenus, estrogenus, progestinus, kortikoidus ir steroidus plaukų mėginiuose. Tačiau pagrindinis metodo trūkumas yra sąlyginai ilga analizės trukmė ir neišvengiama analizių derivatizacijos procedūra [36, 39, 41]. Efektyviosios skysčių chromatografijos su fluorescenciniu detektoriumi metodas taip pat pasižymi aukštomis specifiskumo vertėmis, bet analizei reikalingas didelis mėginio kiekis, sudėtingos ir ilgai trunkančios mėginio paruošimo bei analitės derivatizacijos procedūros [36, 41].

Literatūros duomenimis, tinkamiausias metodas kortizolio koncentracijai plaukuose nustatyti yra efektyvioji skysčių chromatografija su masių spektrometriniu detektoriumi. Šis metodas pasižymi dideliu jautrumu ir specifiskumu, sąlyginai nesudėtinga mėginio paruošimo analizei procedūra bei galimybe analizuoti didelį kiekį mėginių per gana trumpą laiką [36].

Paprastai kortizolio koncentracijai plaukuose nustatyti taikomas atvirkščią fazių ESCh metodas naudojant C18 (oktadecilu modifikuotas silikagelis) kolonėlę [36, 39, 42–44]. Naudojant MS detektorių vidiniu standartu paprastai imami 2H ir 13C izotopais papildyti analizių analogai, todėl pagerinamas analizių kiekybinio nustatymo tikslumas [39, 41]. Daugumoje protokolų kaip judri fazė naudojami organinių ir vandeninių tirpiklių mišiniai (sudaryti iš metanolio/vandens ar acetonitrilo/vandens), papildomai įdedama buferinių tirpalų (pvz., amonio acetato) [36, 39, 41, 44]. Kai kuriose metodikose nurodoma judrios fazės pH vertė svyruoja tarp 2,6 ir 4,5 [36, 41]. Naudojant būtent

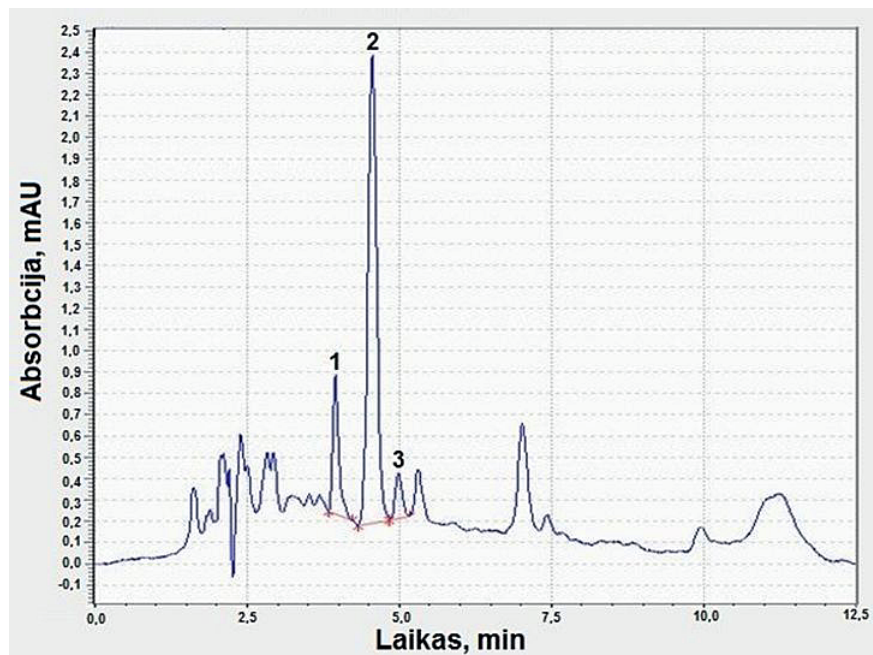
tokias judrias fazes pasiekiamas gesnis analizės jautrumas, atskyrimo atrankumas ir sutrumpinamas atskyrimo laikas.

E. Russel su kolegomis [35] palygino kortizolio koncentracijos plaukuose analizės rezultatus, gautus keturiose skirtingose laboratorijose naudojant skirtingų gamintojų prietaisus, reagentus ir (ar) taikant skirtingus metodus (ELISA ir ESCh-MS). Gauti rezultatai parodė stiprius statistiškai reikšmingus ryšius tarp keturių skirtingų imunofermentinių metodų (r^2 tarp 0,92 ir 0,97, $p < 0,0001$) bei tarp visų minėtų imunofermentinių ir dviejų ESCh-MS (r^2 tarp 0,88 ir 0,97, $p < 0,0001$) metodų. Dviem skirtingose laboratorijose naudojamais ESCh-MS metodais gauti beveik identiški analizės rezultatai ($r^2 = 0,9829$, $p = 0,0001$). Svarbu pažymėti ir tai, kad tyrimo metu imunofermentiniais metodais gautos kortizolio koncentracijos plaukuose vertės buvo 2,5–20 kartų didesnės, nei gautos taikant ESCh-MS metodus. Tokius rezultatus galima paaiškinti jau minėta ir iki šiol neišspręsta imunofermentinių metodų kryžminio reaktyvumo problema.

KORTIZOLIO KONCENTRACIJOS PLAUKUOSE NUSTATYMAS ESCH METODU SU ULTRAVIOLETINIO BEI MATOMO (UV/VIS) SPEKTRO ABSORBCIJOS DETEKTORIUMI

Kortizolio koncentracijos plaukuose tyrimas atliktas Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedroje pagal Jean-Sébastien Raul su kolegomis 2004 metais [40] ir Elio F. De Palo su bendraautorais 2009 metais [45] publikuotas metodikas. Mėginio paruošimo chromatografinė analizei etape atliktos plovimo bei kietafazės ekstrakcijos procedūros, o kortizoliui atskirti ir nustatyti taikytas efektyviosios skysčių chromatografijos metodas su ultravioletinio bei matomo (UV/VIS) spektro absorbcijos detektoriumi.

Tyrimui gauti plaukų ėminiai buvo patrumpinti iki 3 cm ilgio (matuojant nuo arčiau galvos odos buvusios ėminio dalies) ir susmulkinti žirkklėmis į nedidelius (1–2 mm) pluoštelius. Analizinėmis svarstyklėmis (Scaltec, JAV) pasverta 20–50 mg ėminio ir jis perkeltas į paruoštą vakuuminę filtravimo sistemą (Schott Duran, Restek, Vokietija) bei 2 kartus plautas 3 ml izo-



2 pav. Plaukų mėginio ekstrakto, gauto KFE metodu, chromatograma.

Smailės: 1 – kortizolis, 2 – kortizonas, 3 – 6- metilprednizolonas

Fig 2. Chromatogram of hair extract obtained using solid-phase extraction method.

Peak assignments: 1 – cortisol, 2 – cortisone, 3 – 6- methylprednisolone

propanolio (99,9 % grynumo, Sigma-Aldrich, Vokietija). Plaukų mėginiai papildomai nusausinti azoto dujų sraute ir perkelti į sterilius mikromėgintuvėlius (Eppendorf, Vokietija). Tuomet į mėginį įterpta 2 ml Sorenso buferinio tirpalo (0,133 M, pH = 7,6) ir 10 l g/ml vidinio standarto (6- metilprednizolono, 98 % grynumo, Sigma-Aldrich, Vokietija). Taip paruoštas mėginys inkubuotas termostate (BioSan, Latvija) 16 val. 40 C temperatūroje. Po inkubacijos vykdyta kietafazės ekstrakcijos procedūra analizių desorbcijai naudojant skirtingus tirpiklius ar jų mišinius pagal Elio F. De Palo su bendraautorais [45] publikuotą metodiką. Paskutinės frakcijos eliuatas sukonzentruotas azoto dujų sraute iki sauso liekanos, kuri ištirpinta 100 l acetono tirale ir vandens mišinyje (1:1, v/v). Tuomet mėginys perkeltas į chromatografinį buteliuką ir analizuotas ESCh metodu.

ESCh tyrimai buvo atliekami „Shimadzu Nexera X2“ (Shimadzu, Japonija) chromatografu, sukomplektuotu iš aukšto slėgio dviejų kanalų gradientinio siurblio (sudaryto iš dviejų izokratinų siurblių su tirpiklių pasirinkimo galimybe ir maišymo kamera), automatinės mėginio įterpimo sistemos, kolonėlių termostato ir UV/VIS detektoriaus. Analizei atskirti naudota „Zorbax Eclipse XDGB-C8“ (4,6×150 mm, 5,0 μm) kolonėlė (Agilent, JAV). Chromatografinė kolonėlė buvo termostatuojama 22 C tempera-

tūroje. ESCh metu įterpto mėginio tūris – 10 l. Judri fazė buvo formuojama iš dviejų eluentų: acetonitrilo ir dejonizuoto vandens, santykiu 40:60, v/v. Judrios fazės srauto greitis – 1,0 ml/min. Analizės trukmė – 20 min. Kortizolio absorbcijos signalas registruotas esant 245 nm bangos ilgiui, o nustatomos analitės sulaikymo trukmė – 4,12 min.

Gauti matavimų duomenys apdorojami „LabSolutions“ programine įranga. Programos integruoti ir apskaičiuoti smailių plotai buvo naudojami kortizolio koncentracijai apskaičiuoti pagal kalibracinę kreivę. Plaukų mėginio ekstrakto, gauto KFE metodu, chromatogramos pavyzdys pateikiamas 2 paveiksle. Kortizolio kalibracinės kreivės tiesiškumo intervalas buvo matuojamas naudojant septynias skirtingas analitės koncentracijas intervale nuo 5 ng/ml iki 150 ng/ml. Apskaičiuotas koreliacijos koeficientas (r^2) kortizoliui lygus 0,9998, aptikimo riba – 15,6 ng/ml, o nustatymo riba – 47,2 ng/ml.

IŠVADOS IR TOLESNIŲ TYRIMŲ KRYPTYS

Pateikti duomenys rodo, jog kortizolio koncentracijos plaukuose tyrimas gali būti sėkmingai pritaikytas tiek kasdienėje klinikinėje praktikoje, pavyzdžiui, Kušingo sindromui diagnozuoti, pakaitinės gliukokortikoidų terapijos stebėsenai atlikti, kardiometabolinių

ligų rizikai įvertinti, tiek moksliniuose tyrimuose nagrinėjant patiriamo lėtinio streso įtaką visuomenės sveikatai. Tradiciniai kortizolio kiekio tyrimai seilėse, kraujo serume ar paros šlapime atspindi ūminį ar trumpalaikį PHA aktyvumą, o kortizolio koncentracijos nustatymas plaukuose suteikia informacijos apie ilgalaikį PHA aktyvumą ir taip papildo minėtus tradicinius tyrimus.

Šiuo metu atiekama nemažai tyrimų, kuriose analizuojami ryšiai tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir

patiriamo lėtinio psichosocialinio streso lygio, tačiau mokslininkų gaunami rezultatai yra priešaringi. Todėl reikšmingą įtaką PHA aktyvumui darančių kitų veiksnių paieška galėtų būti tolesnių mokslinių tyrimų objektas. Taip pat reikalingi papildomi tyrimai, nagrinėjantys kortizolio patekimo į plauko vidines struktūras mechanizmus. Moksliniai tyrimai parodė, jog kortizolis į plauką patenka ne tik per plauko folikule esančius kapiliarus pasyviosios difuzijos būdu, bet gali būti sintetinas ir pačiame

plauko folikule. Tokios prielaidos sunkina kortizolio koncentracijos plaukuose tyrimo rezultatų interpretavimą ir mažina taikymo klinikinėje praktikoje galimybes. Kortizolio koncentracijos plaukuose analizei reikalingi itin jautrūs ir specifiški metodai, todėl šiuo metu auksinio standarto metodas yra skysčių chromatografija ir tandeminė masių spektrometrija (LC-MS/MS). ♦

Gauta: 2018 05 11
Priimta spaudai: 2018 06 28

Summary

THE SIGNIFICANCE OF HAIR CORTISOL ANALYSIS IN CLINICAL PRACTICE AND RESEARCH

Eglė Mazgelytė, Dovilė Karčiauskaitė, Aušra Linkevičiūtė, Zita Aušrelė Kučinskienė

Cortisol is the main glucocorticoid synthesized from cholesterol in adrenal *zona fasciculata* cells. Nonspecific stimuli such as physical or psychological stress results in hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activation and secretion of cortisol which has a wide spectrum of biological effects. Therefore, different diagnostic tests are used to evaluate HPA axis activity in routine clinical practice, e.g. dexamethasone suppression test, determination of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in blood serum and cortisol concentration measurement in both blood serum and 24-hour urine samples. How-

ever, these measurement strategies reflect only momentary or short-term cortisol secretion but cannot provide the information about long-term integrated cortisol exposure. In this context, there is a growing number of evidence that endogenous cortisol concentrations can be measured in scalp hair which has a unique property to incorporate steroid hormones and other lipophilic substances into growing hair. It was showed that determination of hair cortisol concentration is a promising tool for Cushing's syndrome diagnostics, hydrocortisone replacement therapy monitoring, cardiometabolic status assessment and

chronic stress evaluation. Despite a lot of scientific effort put into hair cortisol research, data about the other factors which could affect the results of hair testing such as hair growth rate, hair colour, gender, age, ethnic group is insufficient. Also, the use of various hair sample preparation procedures and analytical methods becomes a challenge for assay standardisation, implementation in clinical practice and comparison of findings from different studies. The main purpose of this article is to review the importance of hair cortisol concentration measurements, the possibility of adopting this test in clinical practice and research, and to report different methods for quantitative hair cortisol analysis.

Keywords: hair cortisol levels, hypothalamus-pituitary-adrenal axis, chronic stress, cardiometabolic disorders, Cushing's syndrome, high-performance liquid chromatography.

LITERATŪRA

- Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Corticosteroids. *Rheum Dis Clin N Am* 2016; 42: 15–31.
- Stankus A, Slušnienė A. Kortizolis ir streso pasekmės. *Literatūros apžvalga. Biologinė psichiatrija ir psichofarmakologija* 2009; 11(1): 9–20.
- Wosu AC, Valdimarsdóttir U, Shields AE, Williams DR, Williams MA. Correlates of cortisol in human hair: implications for epidemiologic studies on health effects of chronic stress. *Ann Epidemiol* 2013; 23(12): 797–811.
- Wester VL, van Rossum EFC. Clinical applications of cortisol measurements in hair. *Eur J Endocrinol* 2015; 4(173): 1–10.
- Gidlow CJ, Randall J, Gillman J, Silk S, Jones MV. Hair cortisol and self-reported stress in healthy, working adults. *Psychoneuroendocrinology* 2016; 44: 163–9.
- Staufenbiel SM, Penninx BWJH, Spijker AT, Elzinga M, van Rossum EFC. Hair cortisol, stress exposure, and mental health in humans: A systematic review. *Psychoneuroendocrinology* 2013; 38(8): 1220–35.
- Staufenbiel SM, Penninx BWJH, de Rijke YB, van den Akker ELT, van Rossum EFC. Determinants of hair cortisol and hair cortisone concentrations in adults. *Psychoneuroendocrinology* 2015; 60: 182–94.
- Manenschijn L, Schaap L, van Schoor NM, van der Pas S, Peeters GM, Lips P, et al. High long-term cortisol levels, measured in scalp hair, are associated with a history of cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 2078–83.
- Abell JG, Stalder T, Ferrie JE, Shipley MJ, Kirschbaum C, Kivimäki M, et al. Assessing cortisol from hair samples in a large observational cohort: The Whitehall II study. *Psychoneuroendocrinology* 2016; 73: 148–56.
- Feller S, Vigl M, Bergmann MM, Boeing H, Kirschbaum C, Stalder T. Predictors of hair cortisol concentrations in older adults. *Psychoneuroendocrinology* 2014; 39: 132–40.
- Incollingo Rodriguez AC, Epel ES, White ML, Standen EC, Seckl JR, Tomiyama AJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and cortisol activity in obesity: A systematic review. *Psychoneuroendocrinology* 2015; 62: 301–18.
- Meyer JS, Novak MA. Minireview: hair cortisol: a novel biomarker of hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity. *Endocrinology* 2012; 153(9): 4120–7.
- Russell E, Koren G, Rieder M, van Uum S. Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology* 2012; 37(5): 589–601.
- Lee DY. Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. *BMB Rep* 2015; 48(4): 209–16.
- Sauvé B, Koren G, Walsh G, Tokmakejian S, van Uum SHM. Measurement of cortisol in human hair as a biomarker of systemic exposure. *Clin Invest Med* 2007; 30(5): 183–92.
- van Rossum EFC, Manenschijn L, Felders RA. Measuring cortisol levels in hair: potential clinical applications in Cushing's syndrome. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2014; 7(2): 123–5.
- Manenschijn L, Koper JW, van den Akker ELT, de Heide LJ, Geerdink EA, de Jong FH, et al. A novel tool in the diagnosis and follow-up of (cyclic) Cush-

- ing's syndrome: measurement of long-term cortisol in scalp hair. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(10): 1836–43.
18. Manenschijn L, Koper JW, Lamberts SWJ, van Rossum EFC. Evaluation of a method to measure long term cortisol levels. *Steroids* 2011; 76: 1032–6.
 19. Wester VL, Reincke M, Koper JW, van den Akker EL, Manenschijn L, Berr CM, et al. Scalp hair cortisol for diagnosis of Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol* 2017; 176(6): 695–703.
 20. Staufenbiel SM, Andela CD, Manenschijn L, Pereira AM, van Rossum EFC, Biermasz NR. Increased hair cortisol concentrations and BMI in patients with pituitary-adrenal disease on hydrocortisone replacement. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100(6): 2456–62.
 21. Gow R, Koren G, Rieder M, van Uum S. Hair cortisol content in patients with adrenal insufficiency on hydrocortisone replacement therapy. *Clin Endocrinol* 2011; 74: 687–93.
 22. Goodwin JE, Geller DS. Glucocorticoid-induced hypertension. *Pediatr Nephrol* 2012; 27: 1059–66.
 23. Baid S, Nieman LK. Glucocorticoid excess and hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2004; 6: 493–9.
 24. Inoue N. Stress and atherosclerotic cardiovascular disease. *J Atheroscler Thromb* 2014; 21(5): 391–401.
 25. Steptoe A, Kivim M. Stress and cardiovascular disease: an update on current knowledge. *Int Angiol* 2015; 66(1): 5–7.
 26. Stalder T, Kirschbaum C, Alexander N, Bornstein SR, Gao W, Miller R, et al. Cortisol in hair and the metabolic syndrome. *Endocr Res* 2013; 98(6): 2573–80.
 27. Arnaldi G, Scandali VM, Trementino L, Cardinaletti M, Appolloni G, Boscaro M. Pathophysiology of dyslipidemia in Cushing's syndrome. *Neuroendocrinology* 2010; 92(1): 86–90.
 28. van Rossum EFC. Obesity and cortisol: new perspectives on an old theme. *Obesity* 2017; 25(3): 500–1.
 29. Geer EB. The Hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and disease. New York: Springer, 2017.
 30. Giannoglou GD, Koskinas KC. Mental stress and cardiovascular disease: growing evidence into the complex interrelation between mind and heart. *Int Angiol* 2015; 66(1): 5–7.
 31. Kristenson M, Kučinskienė Z, Bergdahl B, Calkauskas H, Urmonas V, Gomer KO. Increased psychosocial strain in Lithuanian versus Swedish men: the LiVicordia study. *Psychosom Med* 1998; 60(3): 277–82.
 32. Petrowski K, Paul S, Albani C, Brähler E. Factor structure and psychometric properties of the Trier inventory for chronic stress (TICS) in a representative German sample. *BMC Med Res Methodol* 2012; 12(42): 1–10.
 33. Gow R, Thomson S, Rieder M, van Uum S, Koren G. An assessment of cortisol analysis in hair and its clinical applications. *Forensic Sci Int* 2010; 196: 32–7.
 34. Noser E, Fischer S, Ruppen J, Ehlert U. Psychobiological stress in vital exhaustion. Findings from the Men Stress 40+ study. *J Psychosom Res* 2018; 105: 14–20.
 35. Russell E, Kirschbaum C, Laudenslager ML, Stalder T, de Rijke Y, van Rossum EF, et al. Toward standardization of hair cortisol measurement: results of the first international interlaboratory round robin. *Ther Drug Monit* 2015; 37(1): 71–5.
 36. Gao W, Kirschbaum C, Grass J, Stalder T. LC-MS based analysis of endogenous steroid hormones in human hair. *J Steroid Biochem Mol* 2016; 162: 92–9.
 37. Albar WF, Russell EW, Koren G, Rieder MJ, van Uum SH. Human hair cortisol analysis: comparison of the internationally-reported ELISA methods. *Clin Invest Med* 2013; 36(6): 312–6.
 38. Meyer J, Novak M, Hamel A, Rosenberg K. Extraction and analysis of cortisol from human and monkey hair. *J Vis Exp* 2014; 83: 1–6.
 39. Quinete N, Bertram J, Reska M, Lang J, Kraus T. Highly selective and automated online SPE LC-MS³ method for determination of cortisol and cortisone in human hair as biomarker for stress related diseases. *Talanta* 2015; 134: 310–6.
 40. Raul JS, Cirimele V, Ludes B, Kintz P. Detection of physiological concentrations of cortisol and cortisone in human hair. *Clin Biochem* 2004; 37(12): 1105–11.
 41. Gao W, Stalder T, Foley P, Rauh M, Deng H, Kirschbaum C. Quantitative analysis of steroid hormones in human hair using a column-switching LC-APCI-MS/MS assay. *J Chromatogr B* 2013; 928: 1–8.
 42. Binz TM, Braun U, Baumgartner MR, Kraemer T. Development of an LC-MS/MS method for the determination of endogenous cortisol in hair using (13)C3-labeled cortisol as surrogate analyte. *J Chromatogr B* 2016; 1034: 65–72.
 43. Vanaelst B, Rivet N, Huybrechts I, Ludes B, De Henauw S, Raul JS. Measurement of cortisol and cortisone in children's hair using ultra performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Anal Methods* 2013; 5: 2074–82.
 44. Gaudl A, Kratzsch J, Bae YJ, Kiess W, Thierry J, Ceglarek U. Liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry for quantitative steroid hormone analysis in plasma, urine, saliva and hair. *J Chromatogr A* 2016; 1464: 64–71.
 45. de Palo EF, Antonelli G, Benetazzo A, Prearo M, Gatti R. Human saliva cortisone and cortisol simultaneous analysis using reverse phase HPLC technique. *Clin Chim Acta* 2009; 405: 60–5.