

Laboratorinė medicina.
2019, t. 21, Nr. 3(83), p. 138–145.

Steroidinių hormonų nustatymas plaukuose ir seilėse: tyrimo metodų apžvalga

Gabija Aleknavičiūtė
Eglė Mazgelytė
Asta Mažeikienė
Dovilė Karčiauskaitė
Zita Aušrelė Kučinskienė

Santrauka

Steroidiniai hormonai svarbūs daugeliui fiziologinių ir biocheminių procesų: jie reguliuoja medžiagų apykaitą, imuninės sistemos funkcijas, uždegimo reakcijų intensyvumą, yra reikalingi pirminių ir antrinių lytinių požymių formavimuisi, dalyvauja atsako į stresą reakcijose. Reikšmingi steroidinių hormonų koncentracijos pokyčiai gali sukelti tokius endokrininės sistemos sutrikimus kaip Kušingo sindromas, Adisono liga, hipogonadizmas, pirminis policistinių kiaušidžių sindromas. Dėl šių priežasčių steroidinių hormonų tyrimai svarbūs tiek kasdienėje klinikinėje praktikoje, tiek moksliniuose tyrimuose. Šiuo metu klinikinės diagnostikos laboratorijose steroidinių hormonų koncentracijos tiriamos kraujo serume ir šlapimo mėginiuose. Moksliniuose tyrimuose vis daugiau dėmesio skiriama šių hormonų tyrimams seilėse ir plaukuose. Tyrimai seilėse, kaip ir kraujo serume ar šlapime, yra svarbūs vertinant ūminius ar trumpalaikius steroidinių hormonų koncentracijos pokyčius. Be to, tiriant hormonus seilėse įvertinama tik laisvų, su baltymais nesusijusių, biologiškai aktyvių hormonų frakcija. Steroidinių hormonų tyrimai plaukuose atspindi ilgalaikius jų koncentracijos pokyčius, todėl atsiranda galimybė retrospektyviai įvertinti steroidinių hormonų koncentraciją 1–6 mėn. laikotarpiu iki tyrimo. Dėl didelio poreikio tirti steroidinius hormonus plaukuose ir seilėse siekiama patobulinti jau esamus ir kurti efektyvesnius mėginio paruošimo analizei ir steroidinių hormonų ekstrakcijos metodus. Taip pat daug dėmesio skiriama jautresniems bei specifiskesniems analizės metodams, pavyzdžiui, efektyviajai skysčių chromatografijai ir tandeminei masių spektrometrijai, kad būtų galima juos optimizuoti ir įdiegti į klinikinės diagnostikos bei mokslines laboratorijas. Pagrindinis šio straipsnio tikslas – apžvelgti šiuo metu taikomus ėminių paruošimo analizei etapus bei palyginti pagrindinius kiekybinio steroidinių hormonų nustatymo seilėse ir plaukuose analizės metodus.

Reikšminiai žodžiai: steroidiniai hormonai, efektyvioji skysčių chromatografija ir tandeminė masių spektrometrija, imunofermentinė analizė, streso tyrimai, endokrininės ligos.

IVADAS

Hormonai yra svarbūs daugeliui biologinių procesų, jų koncentracijos svyravimai organizmo vystymosi laikotarpiu gali sukelti negrįžtamus audinių ar organų pokyčius. Hormonų povei-

kis yra skirtingas: vieni sukuria trumpalaikį efektą, dėl kurio aktyvinami ar slopinami tam tikri fiziologiniai procesai, vyksta elgsenos pokyčiai, o kiti veikia nuolatos, pradedant vaisiaus vystymosi laikotarpiu, ir yra susiję su lyčių skirtumais postnataliniu perio-

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:
gabija.aleknaviciute@mf.stud.vu.lt

1 lentelė. Steroidinių hormonų koncentracijos matavimams naudojamų ėminių palyginimas [11]

Table 1. Comparison of different samples for steroid hormones concentration measurement [11]

Ėminys	Ėminio laikymo ir gabenimo reikalavimai	Ėminio paėmimo invaziškumas	Retrospektyvus hormonų koncentracijos įvertinimas	Surinkimo metodas	Įvertinimo laikotarpis	Cirkadinio ritmo poveikis	Trumpalaikių koncentracijos pokyčių įvertinimas
Kraujo serumas	Tyrimas atliekamas nedelsiant arba ėminys užšaldomas -20 °C temperatūroje	Labai invazinis	Negalimas	Venos punkcija	Minutės	Yra	Galimas
Seilės	Tyrimas atliekamas nedelsiant arba ėminys užšaldomas -20 °C temperatūroje	Neinvazinis, gali sukelti diskomfortą	Negalimas	Seilės surenkamos į specialius plastikinius mėgintuvėlius su viduje esančiu perforuotu vidiniu mėgintuvėliu ir vatos tamponėliu	Minutės	Yra	Galimas
Šlapimas	Tyrimas atliekamas nedelsiant arba ėminys užšaldomas -80 °C temperatūroje	Neinvazinis, tačiau kai kuriems tiriamiesiems ėminio paėmimo procedūra gali būti sudėtinga	Negalimas	24 val. (paros) šlapimas surenkamas į specialų vienkartinį plastikinį indelį	Para	Nėra	Negalimas
Plaukai	Tamsoje, kambario temperatūroje	Neskausmingas, neinvazinis	Galimas	Kerpama nedidelė plaukų sruoga nuo viršugalvio užpakalinės dalies kuo arčiau galvos odos	Savaitės ar mėnesiai	Nėra	Negalimas

du [1]. Steroidiniai hormonai – kortizolis, kortizonas, dehidroepiandrosteronas (DHEA) bei jo sulfatas (DHEA-S), testosteronas, estradiolis, yra reikšmingi organizmo reakcijoms ir fizinius ar psichologinius stresorius, medžiagų apykaitos bei imuninės sistemos funkcijų reguliavimui, pirminių ir antrinių lytinių požymių formavimuisi [2]. Dėl šių priežasčių steroidinių hormonų tyrimai svarbūs ne tik klinikinėje praktikoje, bet ir tarpdisciplininuose moksliniuose tyrimuose [3]. Steroidinių hormonų koncentracijai nustatyti paprastai naudojami kraujo serumo ar šlapimo mėginiai, tačiau pastarąjį dešimtmetį vis daugiau dėmesio skiriama šių analizių tyrimui plaukų ir seilių ėminiuose. Steroidinių hormonų plaukuose tyrimai svarbūs vertinant ilgalaikius šių hormonų koncentracijos pokyčius organizme. Iki šiol atliktuose tyrimuose dažniausiai plaukų ėminiai naudojami gliukokortikoidų kiekybiniam vertinimui, todėl plaukai tapo puikia tiriamąja medžiaga psichiatrijos, endokrinologijos ir su stresu susijusių tyrimų srityse [4]. Trumpalaikiams steroidinių hormonų koncentracijos svyravimams organizme įvertinti, pavyzdžiui, atsakui į ūminį stresą tirti, kontraceptinių vaistų ar kitų sintetinių steroidinių hormonų preparatų vartojimo sukeltų pokyčių stebėsenai, vis dažniau pasirenkami seilių ėminiai [5]. Tiek plaukai, tiek seilės yra sudėtingos terpės steroidinių hormonų tyrimams, todėl daug dėmesio skiriama efektyvesnėms mėginio paruo-

šimo analizei procedūroms bei didesniu jautrumu ir specifiskumu pasižymintiems analizės metodams kurti [6].

PLAUKŲ IR SEILIŲ ĖMINIŲ PRANAŠUMAI IR TRŪKUMAI LYGINANT SU TRADICINIAIS ĖMINIAIS

Šiuo metu klinikinėse diagnostikos laboratorijose steroidinių hormonų koncentracijai įvertinti naudojami kraujo serumo ir šlapimo ėminiai, tačiau moksliniuose tyrimuose vis daugiau dėmesio skiriama hormonų kiekiui nustatyti seilėse bei plaukuose [7, 8]. Seilių surinkimo, priešingai nei kraujo paėmimo, procedūra yra neinvazinė, nesudėtinga, ėminį paprasta laikyti ir gabenti, seilių surinkimo procedūrą tiriamasis gali atlikti savarankiškai bet kuriuo paros metu, taip pat galima dažnai surinkti pakartotinius ėminius [5, 7]. Atliktų tyrimų rezultatų parodė, kad androstendiono, kortizolio, testosterono koncentracijas seilėse ir kraujo plazmoje sieja tiesinė priklausomybė (atitinkamai $r = 0,92$, $r = 0,78$, $r = 0,97$), todėl steroidinių hormonų tyrimai seilėse galėtų būti gera alternatyva tyrimams kraujyje [5, 8]. Nepaisant minėtų privalumų, yra ir keletas trūkumų: seilių ėminys gali būti užterštas krauju, gleivėmis ar maisto likučiais, netinkamas ėminio surinkimas gali daryti neigiamą įtaką tiksliai steroidinių hormonų

koncentracijos įvertinimui [5, 7]. Be to, seilėse steroidinių hormonų koncentracija yra mažesnė nei kraujo serume, todėl būtina taikyti didesniu jautrumu pasižyminčius analizės metodus [8]. Tiriant kraujo serumo ar seilių mėginius įvertinami tik trumpalaikiai steroidinių hormonų koncentracijos svyravimai, todėl, siekiant nustatyti ilgalaikius hormonų koncentracijos pokyčius, naudojami plaukai [5] (1 lentelė).

Daugumoje atliktų tyrimų plaukų mėginiai imami kortizolio koncentracijai įvertinti, tačiau taikant itin jautrius ir specifiskus analizės metodus galima išmatuoti ir testosterono, estradiolio, progesterono, kortizono, DHEA koncentracijas [9]. Plaukų ėminių surinkimo procedūra yra nesudėtinga, ėminius lengva gabenti, nereikalingos specialios jų laikymo sąlygos, analizei pakanka nedidelio plaukų ėminio kiekio (~ 10 mg). Plaukų surinkimo procedūra yra neinvazinė, nesukelia skausmo, nėra infekcijų plitimo rizikos. Svarbu tai, kad plaukai pasižymi „ilgalaike atmintimi“ ir analizės metu gauti rezultatai atspindi ilgalaikius pokyčius, o ne momentinę hormonų koncentraciją ar trumpalaikius koncentracijos svyravimus [10, 11], todėl plaukai yra netinkami per paskutines minutes ar valandas iki tyrimo įvykusiems ūminiams pokyčiams vertinti [12] (1 lentelė). Siekiant nustatyti ilgalaikius pokyčius, svarbu atsižvelgti į tyrimui parenkamo plaukų ėminio ilgį. Kiekvieno žmogaus plaukų augimo greitis yra skirtingas, ta-

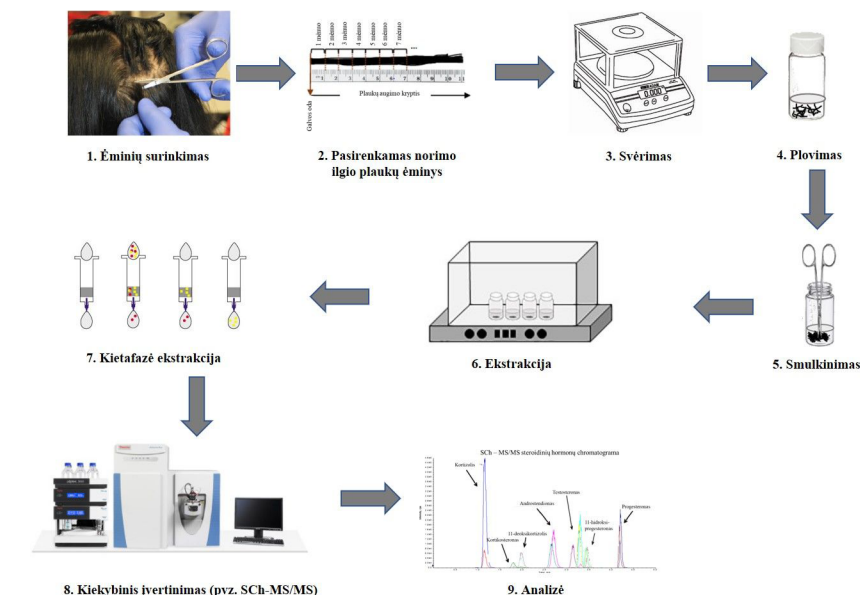
čiau vidutiniškai per mėnesį plaukai paauga ~ 1 cm. Dėl plaukų „išplovimo“ efekto tinkamiausi tyrimui yra ne ilgesni nei 6 cm plaukai, t. y. maksimaliai galima įvertinti steroidinių hormonų sekreciją 6 mėn. laikotarpiu iki tyrimo [13]. Taip yra dėl to, kad labiausiai nuo galvos odos nutolę plaukai yra intensyviau ir ilgiau veikiami ultravioletinės spinduliuotės, dažnai plaunant plaukus ar juos veikiant cheminėmis priemonėmis steroidiniai hormonai gali būti „išplaunami“, t. y. pašalinami iš plauko vidinių struktūrų [14]. Dar vienas svarbus aspektas – galima išorinė plauko tarša dėl aplinkos poveikio, fizinio kontakto su cheminėmis medžiagomis ar kremų bei tepalų, kurių sudėtyje yra steroidinių hormonų, naudojimo [15]. J. G. Abell ir bendraautorai teigia [16], kad steroidinių hormonų koncentracijos pokyčiams įtaką gali daryti lytis, amžius, išoriniai veiksniai, pavyzdžiui, plaukų priežiūros priemonės (plaukų dažai, šampūnai, cheminis apdorojimas) [16]. G. Noppe nustatė [17], kad dažnas galvos odos ir plaukų plovimas, plaukų priežiūros produktų naudojimas ar plaukų tipas neturi įtakos kortizolio koncentracijos pokyčiams (atitinkamai $p = 0,33$, $p = 0,73$ ir $p = 0,22$). Taip pat tyrimo rezultatai parodė, jog kortizolio koncentracija plaukuose nepriklauso nuo tiriamojo plaukų spalvos ar galvos odos prakaito liaukų aktyvumo (atitinkamai $p = 0,72$ ir $p = 0,25$). Minėtame tyrime autoriams atsižvelgus į amžių rezultatai nepasikeitė [17].

STEROIDINIŲ HORMONŲ NUSTATYMO PLAUKUOSE IR SEILĖSE METODIKŲ ANALIZĖ

Steroidinių hormonų pernaša į seiles ar plaukus

Steroidinių hormonų patekimas į seiles aiškinamas keliais pagrindiniais mechanizmais. Dažniausiai minima pasyvioji difuzija per acino ląsteles, todėl steroidinių hormonų koncentracija nepriklauso nuo seilių srauto greičio. Taip pat manoma, jog šie hormonai į seiles gali patekti iš kraujo per burnos gleivinę [8].

Tikslūs mechanizmai, kuriais steroidiniai hormonai iš kraujotakos patenka į plauko vidines struktūras, dar nėra gerai žinomi, tačiau manoma, jog hormonai į plauką patenka pasyviosios difuzijos būdu iš kraujo kapiliarų į augančias plauko folikulo ląsteles (šerdi), taip pat per prakaito ar



Pav. Steroidinių hormonų koncentracijos kiekybinio įvertinimo plaukuose tyrimo eiga [11]

Fig. Overview of the experimental process for the quantitative determination of steroid hormones concentration in human hair samples [11]

riebalų liaukas [18]. Alternatyvus mechanizmas – lokali pogumburio-hipofizės-antinksčių (PHA) ašies aktyvacija plauko folikule, kai aktyvintos plauko folikulo ląstelės pačios geba sintetinti kortizolį [17]. Todėl renkant plaukų ėminius patartina plaukus kirpti kuo arčiau galvos odos vengiant plauko folikulo patekimo, nes tai lemia klaidingai nustatomas didesnes steroidinių hormonų koncentracijas [15].

Ėminių surinkimas ir laikymas

Plaukų sruoga yra kerpama nuo viršugalvio užpakalinės dalies, kuo arčiau galvos odos (žr. pav.) [4]. Sauve ir kolegų nustatė [13], kad ėminių, paimtų iš skirtingų galvos odos sričių, analizės rezultatai pasižymėjo dideliu variacijos koeficientu (30,5 %), lyginant su tais ėminiais, kurie buvo paimti nuo viršugalvio užpakalinės dalies (15,3 %). Surinkti ėminiai dedami į foliją ir atitinkamai paženklunami [13]. Plaukų ėminiai gali būti ilgai laikomi kambario temperatūroje, vengiant tiesioginio UV spinduliuotės poveikio, kuris mažina kortizolio ir kortizono bei didina progesterono ir DHEA koncentraciją plaukuose. Iki šiol nėra atlikta tyrimų, kuriuose būtų vertintas UV spinduliuotės poveikis estrogeno ar testosterono koncentracijoms plaukų mėginiuose [9, 11].

Seilių mėginiai surenkami į specialius plastikinius mėgintuvėlius su viduje esančiu perforuotu vidiniu mėgintuvėliu ir vatos tamponėliu („Sali-

vette“). Surinkti ėminiai laikomi –20 °C temperatūroje šaldiklyje [3].

PLAUKŲ ĖMINIO PARUOŠIMAS ANALIZEI

Plaukų svėrimo ir plovimo etapas

Pirmiausia pasirinkto ilgio plaukų ėminiai perkeliama į stiklinius buteliukus ir pasveriami (žr. pav.). Daugumoje literatūroje aprašomų metodikų prieš analizę yra atliekami vienas ar keli plaukų plovimo etapai, kurie trunka nuo 2 iki 10 min, priklausomai nuo ėminio užterštumo [19, 20]. Jie būtini tam, kad būtų pašalintos analizei trukdančios medžiagos: plaukų priežiūros priemonės, prakaito ir riebalinių liaukų išskyros ar kitos plauko paviršiuje aptinkamos medžiagos (odos ląstelės, kūno skysčiai). Taip pat plaukų plovimo procedūra padeda išvengti galimo plaukų užteršimo sintetiniais steroidiniais preparatais. Plaukų plovimui naudojami tirpikliai yra chloroformas, metileno chloridas, metanolis, izopropanolis (2 lentelė). Svarbu tai, kad jie veiksmingai pašalina plauko paviršiuje esančias nepageidaujamas medžiagas, tačiau neveikia vidinėse plauko struktūrose esančių steroidinių hormonų. Literatūros duomenimis, šiomis savybėmis labiausiai pasižymi mažo poliškumo organiniai tirpikliai, pavyzdžiui, izopropanolis, o vandeniniai tirpalai ar metanolis gali

2 lentelė. Plaukų ėminių paruošimo analizei bei kiekybinio hormonų koncentracijos nustatymo metodikų apžvalga
Table 2. Overview of sample preparation techniques and analytical methods for hair steroid analysis

Literatūros šaltinis	Plaukų ėminio ilgis, cm	Plaukų ėminio kiekis, mg	Plovimas	Plaukų smulkinimo būdas	Ekstrakcijai naudojamas tirpiklis	Ekstrakcijos trukmė, val.	Ekstrakcijos temperatūra, °C	Papildomi ekstrakto gryninimo metodai	Analizės metodas
Skoluda et al., 2012 [40]	3	25	Izopropanolis (2×, 3 min.)	Rutulinis malūnėlis	Metanolis	0,75	60	Netaikomi	CLIA
Hankey et al., 2013 [41]	4	< 8	Izopropanolis (3×)	Chirurginės žirklys	Metanolis	16	50	Netaikomi	IFA
Gao et al., 2014 [42]	1–1,5	< 50	Metanolis (2×, 2 min.)	Rutulinis malūnėlis	Metanolis	24	40	KFE	ESCh-MS/MS
Grunau et al., 2013 [43]	2	10–15	Izopropanolis (2×, 3 min.)	Chirurginės žirklys	Metanolis	16	50	Netaikomi	IFA
Steudte et al., 2013 [44]	6	10	Izopropanolis	Chirurginės žirklys	Metanolis	18	45	Netaikomi	ESCh-MS/MS
Grassi-Oliveira et al., 2012 [45]	1	10	ND	Chirurginės žirklys	Metanolis	16	52	Netaikomi	IFA
Wei et al., 2015 [46]	1	ND	Izopropanolis (3×, 3 min.)	Rutulinis malūnėlis	Metanolis	24	ND	Netaikomi	ECL
Slominski et al., 2015 [47]	1–3	50	ND	Chirurginės žirklys	Metanolis	15	52	Netaikomi	ESCh-MS
Karlen et al., 2013 [48]	ND	> 5	Neplauti	Rutulinis malūnėlis	Metanolis	24	25	Netaikomi	RIA
Raul et al., 2004 [49]	2	30–100	Metileno chloridas (2×, 2 min.)	Rutulinis malūnėlis	Sorenseno buferinis tirpalas	16	40	KFE ir SSE	ESCh-MS

Santrumpos: KFE – kietafazė ekstrakcija, SSE – skysčių-skysčių ekstrakcija, CLIA – chemiliuminescencinė analizė, IFA – imunofermentinė analizė, ESCh-MS/MS – efektyvioji skysčių chromatografija ir tandeminė masių spektrometrija, ESCh-MS – efektyvioji skysčių chromatografija ir masių spektrometrija, RIA – radioimuninė analizė, ECL – elektrochemiliuminescencinė analizė, ND – nėra duomenų.

išpūsti plauko struktūrą padidindami steroidinių hormonų išskyrimo iš plaukų tikimybę [3, 11].

Plaukų smulkinimas (malimas)

Veiksmingai steroidinių hormonų ekstrakcijai svarbi efektyvi plaukų ėminio ir ekstrakcijos tirpalo sąveika, todėl siekiant padidinti sąveikos paviršiaus plotą plaukų ėminiai smulkinami chirurginėmis žirklys iki ~ 1 mm pluoštelio [18] arba sutrinami rutuliniu malūnėliu (žr. pav., 2 lentelė) [11]. Plaukų smulkinimas žirklys nėra standartizuota procedūra, todėl ji gali lemti steroidinių hormonų koncentracijos pokyčius, nes susmulkintų plaukų dydis priklauso nuo to, kaip kruopščiai procedūrą atlieka tyrėjas. Naudojant malūnėlius su cirkonio oksido karoliukais galima susmulkinti plaukų ėminius iki ~ 5 m dydžio. Teoriškai tai galėtų pagerinti steroidinių hormonų ekstrakciją iš plaukų, tačiau iki šiol atlikta mažai tyrimų, kuriuose šis plaukų mėginių ruošimo būdas būtų palygintas su kitais. Be to, daroma prielaida, kad malūnėliu smulkinant plaukus yra didelė tikimybė prarasti dalį mėginio, taip pat toks ėminio ruošimo būdas gali lemti plaukuose esančių baltymų ar steroidinių hormonų skilimo procesus [11]. Naujausi duo-

menys rodo, kad steroidinių hormonų išskyrimas iš nesmulkintų plaukų taip pat gali būti vertinga alternatyva. Nors atlikti tyrimai parodė, kad steroidinių hormonų ekstrakcija iš plaukų ėminių buvo efektyvesnė naudojant smulkintus plaukus, analizinio signalo skirtumas nebuvo didelis, todėl tokie steroidiniai hormonai kaip kortizolis, kortizonas, testosteronas, progesteronas, DHEA, DHEA-S, androstendionas, 17- β -pregnenolonas nesunkiai gali būti aptinkami naudojant tiek smulkintus, tiek nesmulkintus plaukų ėminius [20].

Steroidinių hormonų ekstrakcija iš plaukų

Steroidiniai hormonai iš plaukų išskiriami naudojant organinius tirpiklius (pvz., metanolis, acetonas) [11], Sorenseno buferinį tirpalą (0,2 M NaH_2PO_4 ; 0,2 M Na_2HPO_4) ar druskos rūgštį (žr. pav. ir 2 lentelę) [20]. A. Herane Vives ir kolegų parengtame apžvalginiame straipsnyje [21] nurodyta, kad dauguma autorių kortizolio ekstrakcijai iš plaukų pasirinko metanolį. Metanolis efektyviai ištirpina neutralius hidrofilinius ir iš dalies lipofilinius junginius, dėl savo hidrofilinių savybių metanolis lengvai prasiskverbia pro plauko struktūrą, ją išpučia ir sudaro poras, pro kurias steroidiniai hormonai išski-

riami į terpę [20–22]. Nors vandeniai rūgščių tirpalai lemia grynesnių ekstraktų susidarymą, palyginti su ekstrakcija metanolyje, minėti tirpalai gali sukelti analizių hidrolizę [20]. Dažniausiai steroidinių hormonų ekstrakcijai iš plaukų mėginys yra inkubuojamas per naktį kambario ar 52 °C temperatūroje. Tačiau kai kurie duomenys rodo, kad po vieno steroidinių hormonų ekstrakcijos metanolyje etapo vidutiniškai išskiriama tik 46 % mėginyje esančio kortizolio kiekio. Keturių etapų ekstrakcija yra veiksmingesnė: jos metu mėginys 15 val. inkubuojamas metanolyje 52 °C temperatūroje ir 5 min. kambario temperatūroje, procedūra kartojama du kartus. Taikant minėtą ekstrakcijos būdą išskiriama 98–100 % mėginyje esančio kortizolio kiekio [11].

Po ekstrakcijos, siekiant išvengti analizei trukdančių medžiagų patekimo, reikalingos papildomos mėginių gryninimo procedūros. Plaukų mėginiams dažniausiai naudojama kietafazė ekstrakcija (KFE) (žr. pav. ir 2 lentelę) [20]. Šiuo metu, vis dažniau įprastą rankinį KFE atlikimo būdą keičia automatizuotos KFE sistemos, kurios pasižymi geresniu atkuriamumu, sutrumpintu mėginio paruošimo laiku, didesniu mėginių, kurie gali būti gryninami vienu metu, skaičiumi [4].

SEILIŲ ĖMINIŲ PARUOŠIMAS ANALIZEI

Steroidinių hormonų ekstraktacija iš seilių

Steroidiniams hormonams išskirti iš seilių ėminių bei siekiant pašalinti analizei trukdančias medžiagas, pavyzdžiui, baltymus, druskas, fosfolipidus, taip pat atliekama ekstraktacija [23]. Seilių ėminiams dažniausiai taikoma skysčių-skysčių ekstraktacija (SSE) organiniais tirpikliais, tokiais kaip heksanas, etilacetatas, dichlorometanas, taip pat gali būti atliekama ir kietafazė ekstraktacija (KFE) [24]. Šių metodų privalumas yra grynesni mėginių ekstraktai ir tiriamų analizių sukoncentravimas [23]. Nors kasdieniuose tyrimuose šie mėginio paruošimo analizei metodai nėra populiarūs, jie leidžia gauti patikimesnius rezultatus [24].

SSE yra labai efektyvus, tačiau sunkiai automatizuojamas ir ilgai trunkantis metodas. Ekstraktacijai yra naudojami tirpikliai, pasižymintys skirtingu poliškumu tam, kad fazės nesimaišytų ir būtų atskiriamos [25]. KFE metodo esmė – analizės adsorbicija kieto sorbento paviršiuje. KFE sudaro keturi etapai: 1) sorbento kondicionavimas pašalinant priemaišas ir pagerinant analizės sulaikymą; 2) mėginio įleidimas į kolonėlę; 3) kolonėlės plovimas tirpikliu, siekiant pašalinti nepageidaujamus ėminio komponentus; 4) analizės desorbicija [26] – šiame etape išgrynintos ir sukoncentruotos analizės (steroidiniai hormonai) eliuojamos organiniais tirpikliais – metanolio ar acetonitrilo. Dziurkowska su kolegomis [24] atliko dviejų kortizolio ekstraktacijos iš žmogaus seilių metodų palyginimą. Kiekybiniam kortizolio koncentracijos vertinimui autoriai naudojo efektyviosios skysčių chromatografijos su ultravioletinio spektro detektoriumi metodą. Minėto tyrimo rezultatai parodė, jog SSE metodu išskirto kortizolio aptikimo riba (AR, angl. *limit of detection*) buvo 1 ng/ml, o nustatymo riba (NR, angl. *limit of quantification*) – 3 ng/ml. Taikant KFE metodą, gauta AR siekė 3 ng/ml, o NR – 5 ng/ml. Nors SSE metodu išgrynintame mėginyje nustatytos žemesnės kortizolio aptikimo ir nustatymo ribos, autoriai padarė išvadą, jog abu ekstraktacijos metodai yra pakankamai efektyvūs [24]. M. Alzahrani su kolegomis vertino KFE metodo efektyvumą testosterono, DHEA ir epitestosterono ekstraktacijai iš seilių ėminių. Tyrėjai nustatė, jog taikant KFE ir

naudojant trijų skirtingų koncentracijų (100 pg/ml, 400 pg/ml ir 800 pg/ml) steroidinių hormonų standartinių medžiagų tirpalus pasiektos itin aukštos šių hormonų ekstraktacijos atkuriamumo vertės (atitinkamai daugiau nei 93 %, 86 % ir 96 %) [27]. Be to, steroidinių hormonų metabolitai, pavyzdžiui, DHEA-S, dėl savo joninių savybių neekstrahuojami organiniais tirpikliais, todėl tokiems junginiams gryninti reikėtų rinktis medžiagų adsorbicija pagrįstą KFE metodą. Atlikti tyrimai rodo, jog KFE pritaikomumas yra platesnis nei SSE, KFE metodu gaunami labai grynūs analizių ekstraktai [23].

ANALIZĖS METODAI

Didėjant poreikiui nustatyti steroidinių hormonų koncentraciją reikalingi itin jautrūs ir specifiški analizės metodai. Dažniausiai naudojami chemiluminescenciniai (CLIA) bei imunofermentiniai (IFA) metodai. Minėti metodai yra nesunkiai atliekami ir pasižymi dideliu jautrumu bei našumu [6]. Nustatyta, jog taikant IFA analizės variacijos koeficientas yra mažesnis nei 10 %. Panašaus dydžio variacijos koeficientas yra būdingas ir analizei naudojant ESCh-MS metodą [10]. A. Dettenborn su kolegomis [28] ištyrė 360 asmenų plaukų ėminius nustatė, jog CLIA metodu išmatuotos kortizolio koncentracijos plaukuose variacijos koeficientas yra mažesnis nei 8 % [28]. Taip pat tyrimų rezultatai rodo, kad CLIA metodu nustatytos kortizolio koncentracijos plaukuose variacijos koeficientas yra mažesnis nei 8 % [28]. Vis dėlto pagrindinis IFA trūkumas yra santykinai mažas specifiskumas dėl IFA metodams naudojamų antikūnų kryžminių reakcijų su kitomis medžiagomis (pvz., steroidais ar lipofilinėmis medžiagomis). Be to, IFA metodas yra skirtas tik vienai mėginio analizei nustatyti, todėl nėra galimybės vienos analizės metu ištirti keleto steroidinių hormonų koncentracijas, šis metodas netinka ėminiams, kuriuose yra nedidelė steroidinių hormonų koncentracija (pvz., plaukams) [20]. Seilių tyrimus IFA metodu taip pat riboja nedidelis metodo specifiskumas: naudojami antikūnai dėl kryžminių reakcijų reaguoja su kortizonu, kurio koncentracija seilėse yra itin didelė, palyginti su kitais steroidiniais hormonais. Nepakankamas tyrimo jautrumas taip pat gali sukelti problemų, nes po vidurnakčio kortizolio koncentracija seilėse nukrinta žemiau aptikimo ribos [30]. Chromatografiniai tyrimų metodai įveikia imunofermentinių metodų

apribojimus, nes pasižymi geresniu jautrumu ir specifiskumu [3]. Taikant efektyviają skysčių chromatografiją su fluorescenciniu detektoriumi (ESCh-FLU) pastebėta, jog ESCh-FLU pasižymi geresniu specifiskumu nei IFA. W. Gao ir kolegės ESCh-FLU metodą pritaikė kortizolio koncentracijai plaukuose nustatyti. Gauti rezultatai parodė, jog aptikimo riba yra 1 pg/mg, o metodo atkuriamumas siekia 74 %, tačiau analizei reikalingas kur kas didesnis ėminio kiekis ir sudėtingos, daug laiko reikalaujančios ėminio apdorojimo bei analizės derivatizacijos procedūros [31]. Panašiais privalumais ir trūkumais pasižymi ir dujų chromatografijos ir masių spektrometrijos (DCh-MS) metodas. Jis sėkmingai panaudotas androgenų, estrogenų, progestinų, kortikoidų kiekiui nustatyti plaukuose [20], išsiskiria geru specifiskumu, tačiau pasižymi ilga analizės trukme, reikalauja sudėtingų ėminio paruošimo ir derivatizacijos procedūrų, didelių ėminio kiekių (30–200 mg plaukų) [20]. Vienas plačiausiai naudojamų analizės metodų steroidinių hormonų koncentracijai nustatyti plaukuose yra efektyvioji skysčių chromatografija ir masių spektrometrija (ESCh-MS) [4]. Šis metodas pasižymi itin dideliu jautrumu ir specifiskumu, vienos analizės metu galima įvertinti daugelio analizių koncentracijas. Lyginant su DCh-MS, taikant ESCh-MS metodą nereikalingas sudėtingas ir daug laiko sąnaudų reikalaujantis analizių derivatizacijos etapas, todėl šis metodas tinka didelio našumo analizėms, gali būti diegiamas į kasdienę praktiką [3]. W. Gao ir kolegų parengtame apžvalginiame straipsnyje pateiktos skirtingų autorių ESCh-MS metodais išmatuotų steroidinių hormonų (kortizolio, kortizono, testosterono, DHEA, DHEA-S) koncentracijų plaukuose nustatymo ribos. Nurodoma, jog NR skirtingiems steroidiniams hormonams svyruoja nuo 100 iki 0,08 pg/mg [20]. Siekiant dar labiau padidinti metodo jautrumą ir specifiskumą, sumažinti naudojamo ėminio kiekį, sutrumpinti mėginio paruošimo ir analizės laiką, padidinti mėginių, analizuojamų vienu metu, skaičių, vis dažniau steroidinių hormonų koncentracijai įvertinti naudojamas efektyviosios skysčių chromatografijos ir tandeminės masių spektrometrijos (ESCh-MS/MS) metodas [4]. Taikant šį metodą galima patikimai kiekybiškai įvertinti platų steroidinių hormonų spektrą tiriant tokias terpes kaip kraujo serumas, sausas kraujo lašas, seilės, šlapimas, ląstelių homogenatas ar plaukai [32]. W. Gao ir kolegės [3]

sėkmingai pritaikė ESCh-MS/MS metodą septynių steroidinių hormonų koncentracijai seilėse nustatyti. Gauti tyrimų rezultatai parodė, jog estradiolio, kortizolio, kortizono, testosterono, progesterono, kortikosterono NR yra 5 pg/ml, o DHEA NR – 10 pg/ml. Taikant minėtų autorių idiegtą ESCh-MS/MS metodiką buvo pasiektas didesnis analizės jautrumas, palyginti su kitų autorių naudotais DCh-MS ar Sch-MS metodais. Be to, W. Gao ir bendraautorių tyrime nustatytas analizės variacijos koeficientas (VK) visiems tirtiems steroidiniams hormonams seilėse buvo < 11 % [3]. Vis dėlto aprašyto metodo taikymą riboja keli trūkumai: tai brangūs ir techniškai sudėtingi prietaisai bei analizės greitis. Dėl šių priežasčių idiegti ESCh-MS/MS metodą į klinikinės diagnostikos laboratorijas yra sudėtinga, reguliariai atliekama tik labai nedidelė dalis tyrimų [22].

STEROIDINIŲ HORMONŲ TYRIMŲ SVARBA

Lėtinio ir ūminio streso tyrimai

1956 m. Selye pirmasis pavartojo terminą „stresas“ ir pastebėjo, kad intensyvus, ilgai trunkantis atsakas į stresorių gali padaryti didelę žalą organizmui [33]. Tokios terpės kaip seilės, kraujo plazma ar šlapimas naudojamos ūminio ar trumpalaikio streso tyrimams. Plaukų tyrimas atspindi ilgalaikius hormonų sekrecijos pokyčius, todėl vis labiau domimasi, kaip jį būtų galima panaudoti kaip biologinį lėtinio streso žymenį vertinant streso reikšmę tam tikrų ligų išsivystymui [34]. Atlikti tyrimai parodė, kad ne tik kortizolis glaudžiai siejamas su stresu, tačiau ir lytiniai hormonai turi įtakos organizmo atsakui į ūminį ar lėtinį stresą. Buvo pastebėta, kad lytiniai steroidiniai hormonai gali skirtingai

reguluoti kortikotropiną atpalaiduojantį hormoną koduojančio *CRH* geno raišką. Estrogenai skatina pastarojo raišką, o testosteronas ją slopina, ir tai paaiškina lyties skirtumus, susijusius su reakcija į stresą, bei didesnę moterų polinkį į depresiją. Pastebėta, kad moterims, sergančioms gilia depresija, būdingas reikšmingai didesnis per parą išsiskiriančio estradiolio kiekis nei kontrolinės grupės tiriamosioms [35].

Endokrininių ligų diagnostika

Žinoma, jog ilgą laiką reikšmingai padidėjęs kortizolio kiekis gali sukelti Kušingo sindromą. Tokie pacientai dėl suintensyvėjusio baltymų katabolizmo patiria raumenų silpnumą, jiems būdingas intensyvus triacilglicerolių kaupimasis pilvo, liemens, veido srityse, pastebimos ryškiai violetinės spalvos strijos [36]. Sumažėjęs kortizolio kiekis gali sukelti retą endokrininį sutrikimą – Addisono ligą, dar vadinamą pirminiu antinksčių nepakankamumu [37]. Tokiems pacientams būdingas sumažėjęs apetitas, bendras silpnumas, hipotenzija, svorio netekimas [38]. Būtent kortizolio koncentracijos nustatymas plaukuose gali būti vertingas diagnozuojant Kušingo sindromą ar antinksčių nepakankamumą bei retrospektyviai stebint gydymo hormonais eigą [17]. Esant gonadų funkcijos sutrikimams, vyrams atliekami tyrimai hipogonadizmo, moterims – menstruacijų sutrikimų, virilizacijos, hirsutizmo diagnostikai. Šiems patologiniams pokyčiams nustatyti matuojamos testosterono, DHEA-S, estradiolio koncentracijos [39]. Minėtiems gonadų funkcijos sutrikimams diagnozuoti seilės pasižymi geresnėmis savybėmis nei kraujo serumas. Steroidiniai hormonai kraujyje pernešami susijungę su baltymais, tačiau į seiles patenka tik laisvi, biologiškai aktyvūs hormonai. Be to, buvo nustatyta, kad androstendiono ir testosterono koncentracijų santykis sei-

lėse yra geras hiperandrogenizmo bei pirminio policistinių kiaušidžių sindromo rodiklis [5].

IŠVADOS

Steroidinių hormonų tyrimai yra svarbūs tiek klinikinėje praktikoje, tiek moksliniuose tyrimuose. Šie tyrimai sėkmingai naudojami Kušingo sindromo, Addisono ligos, hipogonadizmo ar hirsutizmo diagnostikai, taip pat vertinant ūminio ar lėtinio streso reikšmę tam tikrų ligų išsivystymui. Tradiciškai steroidinių hormonų tyrimui naudojamas terpes – kraujo serumas ar šlapimas, vis dažniau keičia seilių ir plaukų ėminiai. Steroidinių hormonų tyrimai seilėse yra puiki alternatyva pacientams, kuriems kraujo paėmimo procedūra yra skausminga ar sukelia diskomfortą. Plaukų ėminiai tinkami ilgalaikių hormonų koncentracijos pokyčių stebėsenai, siekiant retrospektyviai įvertinti hormonų sekreciją 1–6 mėn. laikotarpiu. Būtent todėl steroidinių hormonų plaukuose tyrimai gali būti naudojami vertinant patiriamo streso lygį, diagnozuojant gonadų funkcijos sutrikimus ar stebint hormoninio gydymo eigą. Nuolat didėjantis steroidinių hormonų tyrimų poreikis skatina kurti efektyvesnes mėginio ruošimo analizei procedūras, tobulinti esamus ar kurti naujus analizės metodus. Dažniausiai naudojami imunofermentinės analizės metodai turi nemažai trūkumų, palyginti su moksliniuose tyrimuose vis dažniau taikomais itin jautriais ir specifiniais chromatografiniais analizės metodais. Chromatografinių metodų įdiegimas ir optimizavimas leistų sumažinti naudojamo ėminio kiekį, sutrumpinti mėginio paruošimo analizei laiką ir vienu metu įvertinti platų steroidinių hormonų spektrą. ♦

Gauta: 2019 08 08
Priimta spaudai: 2019 09 27

Summary

INVESTIGATION OF STEROID HORMONES IN HUMAN HAIR AND SALIVA SAMPLES: A REVIEW OF RESEARCH METHODOLOGIES

Gabija Aleknavičūtė, Eglė Mazgelytė, Asta Mažeikienė, Dovilė Karčiauskaitė, Zita Aušrelė Kučinskienė

Steroid hormones play a major role in many physiological and biochemical processes including regulation of metabolism, immune system functions, inflammation, development of primary and secondary sexual characteristics and neuroendocrine response during stress. Significant changes in steroid hormone

levels can cause variety of endocrine disorders, such as Cushing's syndrome, Addison's disease, hypogonadism or primary polycystic ovary syndrome. For these reasons steroid hormone research is important in daily clinical practice and for scientific research. Blood serum and urine are currently the matrices that are most com-

monly used for steroid hormone concentration measurements in clinical laboratories. Despite of that, the interest towards steroid hormones in human hair and saliva samples is rapidly increasing. Determination of steroid hormone levels in saliva, blood serum or urine is important for the evaluation of acute or short-term changes in steroid hormone secretion. One of the major advantages of saliva as a sample for steroid hormone analysis is that only free (non-protein-bound), biologically active fraction of circulating hormones is determined. On the other hand, the information about the long-term changes in steroid hormone levels can be obtained with steroid hor-

more level measurements in human hair. Therefore, investigation of steroid hormones in hair samples provides the possibility of retrospective evaluation of steroid hormones secretion 1–6 months prior the analysis. Due to the high demand for steroid hormone analyses in non-traditional samples such as saliva and hair, improvements in existing methods as well as development of more efficient sample preparation and steroid

hormone extraction techniques are one of the most challenging tasks in recent studies. Moreover, more often attention is focused on the optimization and implementation of more sensitive and specific analytical methods (e.g. high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry) for steroid analysis in human hair and saliva samples. Therefore, the main purpose of this article is to provide an overview of the most relevant developments in

sample preparation techniques as well as to compare different analytical methods for the quantitative determination of steroid hormones in human saliva and hair samples.

Keywords: steroid hormones, high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, enzyme-linked immunosorbent assay, stress research, endocrine diseases.

LITERATŪRA

- Zubeldia-Brenner L, Roselli CE, Recabarren SE, Gonzalez Deniselle MC, Lara HE. Developmental and functional effects of steroid hormones on the neuroendocrine axis and spinal cord. *J Neuroendocrinol* 2016; 28(7): 10.
- Litwack G. Steroid hormones. Human Biochemistry. Los Angeles, CA, United States: Elsevier 2018; p. 467–506.
- Gao W, Stalder T, Kirschbaum C. Quantitative analysis of estradiol and six other steroid hormones in human saliva using a high throughput liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay. *Talanta* 2015; 143: 353–8.
- 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 Analyt Technol Biomed Life Sci* 2013; 928: 1–8.
- Malon RSP, Sadir S, Balakrishnan M, Córcoles EP. Saliva-based biosensors: noninvasive monitoring tool for clinical diagnostics. *Biomed Res Int* 2014; 1–20.
- Taylor AE, Keevil B, Huhtaniemi IT. Mass spectrometry and immunoassay: how to measure steroid hormones today and tomorrow. *Eur J Endocrinol* 2015; 173(2): D1–12.
- French D. Advances in bioanalytical techniques to measure steroid hormones in serum. *Bioanalysis* 2016; 8(11): 1203–19.
- Lewis JG. Steroid analysis in saliva: an overview. *Clin Biochem Rev* 2006; 27(3): 139–46.
- Behringer V, Deschner T. Non-invasive monitoring of physiological markers in primates. *Horm Behav* 2017; 91: 3–18.
- Gerber M, Brand S, Lindwall M, Elliot C, Kalak N, Herrmann C, et al. Concerns regarding hair cortisol as a biomarker of chronic stress in exercise and sport science. *J Sports Sci Med* 2012; 11(4): 571–81.
- Greff MJE, Levine JM, Abuzgaia AM, Elzagallaai AA, Rieder MJ, van Uum SHM. Hair cortisol analysis: an update on methodological considerations and clinical applications. *Clin Biochem* 2019; 63: 1–9.
- Koren L, Mokady O, Karaskov T, Klein J, Koren G, Geffen E. A novel method using hair for determining hormonal levels in wildlife. *Animal Behaviour* 2002; 63(2): 403–6.
- Wright KD, Hickman R, Laudenslager ML. Hair cortisol analysis: a promising biomarker of HPA activation in older adults. *Gerontologist* 2015; 55: S140–5.
- Wester VL, van Rossum EFC. Clinical applications of cortisol measurements in hair. *Eur J Endocrinol* 2015; 173(4): M1–10.
- 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(1–3): 32–7.
- 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. *Psychoneuroendocrinol* 2016; 73: 148–56.
- Noppe G. Long-term steroid hormone concentrations in healthy children, in obesity, and in disease. Erasmus University, Rotterdam; 2016.
- Meyer JS, Novak MA. Minireview: Hair cortisol: a novel biomarker of hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity. *Endocrinology* 2012; 153(9): 4120–7.
- Kroshko T, Kapronczai L, Cattet MR, Macbeth BJ, Stenhouse GB, Obbard ME, et al. Comparison of methanol and isopropanol as wash solvents for determination of hair cortisol concentration in grizzly bears and polar bears. *MethodsX* 2017; 4: 68–75.
- Gao W, Kirschbaum C, Grass J, Stalder T. LC-MS based analysis of endogenous steroid hormones in human hair. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2016; 162: 92–9.
- Herane Vives A, De Angel V, Papadopoulos A, Strawbridge R, Wise T, Young AH, et al. The relationship between cortisol, stress and psychiatric illness: new insights using hair analysis. *J Psychiatr Res* 2015; 70: 38–49.
- Xiang L, Sunesara I, Rehm KE, Marshall GD Jr. A modified and cost-effective method for hair cortisol analysis. *Biomarkers* 2016; 21(3): 200–3.
- Keevil BG. Novel liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) methods for measuring steroids. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013; 27(5): 663–74.
- Dziurkowska E, Wesolowski M. Evaluation of two techniques for extraction of cortisol from human saliva. *Chromatographia* 2009; 70(5–6): 769–74.
- Dziurkowska E, Wesolowski M. Solid phase extraction purification of saliva samples for antipsychotic drug quantitation. *Molecules* 2018; 23(11): 2946.
- Bacalum E, Tanase A, David V. Retention mechanism applied in solid phase extraction for some polar compounds. *Department of physical chemistry* 2010; 19(2): 61–8.
- Alzahrani MA, Alshuwaier GO, Aljaloud KS, Gibson C, Khalaf A, Alhawiti AS, et al. Development of a derivatization method for investigating testosterone and dehydroepiandrosterone using tandem mass spectrometry in saliva samples from young professional soccer players pre- and post-training. *Sci Pharm* 2019; 87(2): 11.
- Dettenborn L, Tietze A, Kirschbaum C, Stalder T. The assessment of cortisol in human hair: associations with sociodemographic variables and potential confounders. *Stress* 2012; 15(6): 578–88.
- Milam J, Slaughter R, Verma G, McConnell R. Hair cortisol, perceived stress and dispositional optimism: a pilot study among adolescents. *J Trauma Stress Disord Treat* 2014; 3(3): 1000126.
- El-Farhan N, Rees DA, Evans C. Measuring cortisol in serum, urine and saliva – are our assays good enough? *Ann Clin Biochem* 2017; 54(3): 308–22.
- Gao W, Xie Q, Jin J, Qiao T, Wang H, Chen L, Lu Z. HPLC-FLU detection of cortisol distribution in human hair. *Clin Biochem* 2010; 43(7–8): 677–82.
- Couchman L, Vincent RP, Ghataore L, Moniz CF, Taylor NF. Challenges and benefits of endogenous steroid analysis by LC-MS/MS. *Bioanalysis* 2011; 3(22): 2549–72.
- Schneiderman N, Ironson G, Siegel SD. Stress and health: psychological, behavioral, and biological determinants. *Annu Rev Clin Psychol* 2005; 1: 607–28.
- Sörbo A, Eiving I, Theodorsson E, Rydenhag B. Hair cortisol as a biomarker of stress before and after subarachnoid hemorrhage: a case report. *Remed Open Access* 2017; 2: 1062.

35. Guo L, Chen YX, Hu YT, Wu XY, He Y, Wu JL, et al. Sex hormones affect acute and chronic stress responses in sexually dimorphic patterns: consequences for depression models. *Psychoneuroendocrinol* 2018; 95: 34–42.
36. Nieman LK, Chanco Turner ML. Addison's disease. *Clin Dermatol* 2006; 24(4): 276–80.
37. Burton C, Cottrell E, Edwards J. Addison's disease: identification and management in primary care. *Br J Gen Pract* 2015; 65(638): 488–90.
38. Sarkar SB, Sarkar S, Ghosh S, Bandyopadhyay S. Addison's disease. *Contemp Clin Dent* 2012; 3(4): 484–6.
39. Holst JP, Soldin OP, Guo T, Soldin SJ. Steroid hormones: relevance and measurement in the clinical laboratory. *Clin Lab Med* 2004; 24(1): 105–18.
40. Skoluda N, Dettenborn L, Stalder T, Kirschbaum C. Elevated hair cortisol concentrations in endurance athletes. *Psychoneuroendocrinol* 2012; 37(5): 611–7.
41. Henley P, Jahedmotlagh Z, Thomson S, Hill J, Darnell R, Jacobs D. Hair cortisol as a biomarker of stress among a first nation in Canada. *Ther Drug Monit* 2013; 35(5): 595–9.
42. Gao W, Zhong P, Xie Q, Wang H, Jin J, Deng H. Temporal features of elevated hair cortisol among earthquake survivors. *Psychophysiology* 2014; 51(4): 319–26.
43. Grunau RE, Cepeda IL, Chau CMY, Brummelte S, Weinberg J, Lavoie PM. Neonatal pain-related stress and NFKBIA genotype are associated with altered cortisol levels in preterm boys at school age. *PLoS One* 2013; 8(9): e73926.
44. Steudte S, Kirschbaum C, Gao W, Alexander N, Schonfeld S, Hoyer J. Hair cortisol as a biomarker of traumatization in healthy individuals and post-traumatic stress disorder patients. *Biol Psychiatry* 2013; 74(9): 639–46.
45. Grassi-Oliveira R, Pezzi JC, Daruy-Filho L, Viola TW, Francke IDA, Leite CE. Hair cortisol and stressful life events retrospective assessment in crack cocaine users. *Am J Drug Alcohol Abuse* 2012; 38(6): 535–8.
46. Wei J, Sun G, Zhao L, Yang X, Liu X, Lin D. Analysis of hair cortisol level in first-episodic and recurrent female patients with depression compared to healthy controls. *J Affect Disord* 2015; 175: 299–302.
47. Slominski R, Rovnaghi CR, Anand KJ. Methodological considerations for hair cortisol measurements in children. *Ther Drug Monit* 2015; 37(6): 812–20.
48. Karlen J, Ludvigsson J, Frostell A, Theodorsson E, Faresjo T. Cortisol in hair measured in young adults – a biomarker of major life stressors? *BMC Clin Pathol* 2011; 11(1): 12.
49. 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.