

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.393>

<https://orcid.org/0000-0002-1033-0607>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Eglė Mazgelytė

Steroidinių hormonų tyrimai plaukuose
vertinant lėtinio streso lygį bei jo
sąsajas su rizika sirgti širdies ir
kraujagyslių ligomis

DAKTARO DISERTACIJA

Medicinos ir sveikatos mokslai,
Medicina (M001)

VILNIUS 2022

Disertacija rengta 2018–2022 metais Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedroje. Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba (ATEROSTRES projektas, Nr. MIP-050/2015) ir Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas. 2020 m. ir 2022 m. gautos Lietuvos mokslo tarybos stipendijos už studijų rezultatus (Nr. P-DAP-20-317, Nr. P-DAP-22-211).

Mokslinės vadovės:

akad. prof. habil. dr. Zita Aušrelė Kučinskienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001, vadovavimo laikotarpis – nuo 2018-10-01 iki 2019-09-30)

doc. dr. Dovilė Karčiauskaitė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001, vadovavimo laikotarpis – nuo 2019-10-01 iki 2022-09-30)

Mokslinė konsultantė – akad. prof. habil. dr. Zita Aušrelė Kučinskienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001, konsultantė nuo 2019-10-01 iki 2022-09-30)

Gynimo taryba:

Pirmininkė – prof. dr. Janina Tutkuvienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Nariai:

doc. dr. Ramunė Grikšienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biofizika – N011),

prof. dr. Pranas Šerpytis (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

prof. dr. Daiva Urbonienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

prof. dr. Margus Viigimaa (Talino technologijos universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2022 m. lapkričio mėn. 9 d. 13 val. VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Raudonojoje auditorijoje (E122). Adresas: Santariškių g. 2, 08661 Vilnius, Lietuva.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.393>

<https://orcid.org/0000-0002-1033-0607>

VILNIUS UNIVERSITY

Eglė Mazgelytė

Analysis of Hair Steroid Hormone Concentrations for the Assessment of Chronic Stress and its Association with Cardiovascular Disease Risk

DOCTORAL DISSERTATION

Medicine and Health Science,
Medicine (M 001)

VILNIUS 2022

The dissertation was prepared between 2018 and 2022 at the Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Vilnius University. The research was supported by the Research Council of Lithuania (ATEROSTRES project, No. MIP-050/2015) and the Faculty of Medicine, Vilnius University. The scholarships were granted for academic accomplishments from the Research Council of Lithuania in 2020 and 2022 (No. P-DAP-20-317, No. P-DAP-22-211).

Academic supervisors:

Prof. Habil. Dr. Zita Aušrelė Kučinskienė (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001, supervisor from 2018-10-01 to 2019-09-30)

Assoc. Prof. Dr. Dovilė Karčiauskaitė (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001, supervisor from 2019-10-01 to 2022-09-30)

Academic consultant – Prof. Habil. Dr. Zita Aušrelė Kučinskienė (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001, consultant from 2019-10-01 to 2022-09-30)

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Janina Tutkuvienė (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

Members:

Assoc. Prof. Dr. Ramunė Griškienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biophysics – N011),

Prof. Dr. Pranas Šerpytis (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

Prof. Dr. Daiva Urbonienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

Prof. Dr. Margus Viigimaa (Tallinn University of Technology, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 13:00 on 9th of November, 2022 in the Red Auditorium (E122) at the Vilnius University Hospital Santaros Klinikos. Address: Santariškių Str. 2, 08661 Vilnius, Lithuania.

The text of this dissertation can be accessed at the Library of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

„Vienas dalykas, kurio aš išmokau per ilgą gyvenimą – kad visas mūsų mokslas, palyginus jį su realybe, yra primityvus ir vaikiškas. Ir vis dėlto tai yra pats vertingiausias dalykas, kurį mes turime.“

Albertas Einšteinas

TURINYS

1. SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	10
2. ĮVADAS	14
2.1. Darbo aktualumas.....	14
2.2. Darbo naujumas ir reikšmė	14
2.3. Darbo tikslas.....	16
2.4. Darbo uždaviniai	16
2.5. Ginamieji teiginiai	16
3. LITERATŪROS APŽVALGA	18
3.1. Streso samprata ir atsako į stresorių mechanizmai.....	18
3.2. Streso vertinimo metodai.....	20
3.2.1. Steroidiniai hormonai – biocheminiai streso žymenys	21
3.2.2. Steroidinių hormonų biosintezė	21
3.2.3. Steroidiniai hormonai kraujyje ir jų metabolizmas periferiniuose audiniuose.....	25
3.2.4. Alostatinio krūvio indeksas	27
3.2.5. Steroidinių hormonų tyrimai žmogaus biologiniuose ėminiuose	29
3.3. Psichosocialinio streso svarba širdies ir kraujagyslių ligų išsivystymui	40
4. MOKSLINIO DARBO METODIKA	41
4.1. Tiriamieji.....	41
4.2. Tyrimo eiga	41
4.3. Tyrimo metodai	42
4.3.1. Klausimynai	42
4.3.2. Steroidinių hormonų tyrimai plaukų ėminiuose.....	44
4.3.3. Biocheminiai ir hematologiniai tyrimai	48
4.3.4. Ciklofilino A koncentracijos nustatymas.....	50
4.3.5. Oksidacinio streso žymenų tyrimai.....	50
4.3.6. Trombocitų funkcinio aktyvumo tyrimai	50
4.3.7. Statistinė analizė.....	51
5. TYRIMO REZULTATAI	52
5.1. Steroidinių hormonų koncentracijos plaukuose nustatymo metodikos įdiegimas	52

5.1.1. Chromatografinio atskyrimo ir MS/MS detektavimo sąlygų optimizavimas	52
5.1.2. Metodo tinkamumo įvertinimas.....	56
5.2. Širdies ir kraujagyslių ligų rizikos tyrimas vyrų imtyje	57
5.2.1. Tiriamųjų charakteristika.....	57
5.2.2. Širdies ir kraujagyslių ligų rizikos vertinimas ir sąsaja su kortizolio koncentracija plaukuose	60
5.2.3. Alostatinio krūvio įvertimo skaičiavimas ir sąsaja su kortizolio koncentracija plaukuose	68
5.3. Širdies ir kraujagyslių ligų rizikos tyrimas moterų imtyje	70
5.3.1. Tiriamųjų charakteristika.....	70
5.3.2. Įvairių veiksnių poveikis steroidinių hormonų koncentracijai plaukuose	72
5.3.3. Širdies ir kraujagyslių ligų rizikos vertinimas ir sąsaja su steroidinių hormonų koncentracijomis plaukuose.....	72
5.3.4. Metabolinio sindromo sąsaja su steroidinių hormonų koncentracijomis plaukuose.....	79
5.3.5. Streso, nerimo, miego kokybės vertinimas ir sąsaja su širdies ir kraujagyslių ligų rizikos veiksniais	85
5.3.6. Streso, nerimo ir miego kokybės sąsaja su steroidinių hormonų koncentracijomis plaukuose	91
6. REZULTATŲ APTARIMAS	93
6.1. Efektyviosios skysčių chromatografijos ir tandeminės masių spektrometrijos pritaikymas steroidinių hormonų tyrimams plaukų ėminiuose.....	93
6.2. Steroidiniai hormonai plaukuose ir antropometriniai bei arterinio kraujo spaudimo rodikliai.....	94
6.3. Steroidiniai hormonai plaukuose ir lipidų bei angliavandenių apykaitos rodikliai.....	97
6.4. Steroidiniai hormonai plaukuose ir uždegimo rodikliai	99
6.5. Steroidiniai hormonai plaukuose ir rizika sirgti širdies ir kraujagyslių ligomis.....	101
6.6. Steroidiniai hormonai plaukuose ir metabolinis sindromas	102
6.7. Subjektyviai vertinamas stresas, nerimas, miego kokybė ir širdies ir kraujagyslių ligų rizikos veiksniai	104
6.8. Subjektyvūs streso, nerimo, miego kokybės vertinimo rodikliai, alostatinio krūvio įvertis ir steroidinių hormonų koncentracijos plaukuose	104
6.9. Tyrimo trūkumai.....	107

IŠVADOS	108
LITERATŪROS SAĶAŠAS.....	109
DARBO APROBACIJA	121
SUMMARY	129
PADĒKA	187
<i>CURRICULUM VITAE</i>	188
PRIEDAI.....	193

1. SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

11-KT – 11-ketotestosteronas
11KA4 – 11-ketoandrostendionas
11OHA4 – 11 β -hidroksiandrostendionas
17OHP – 17 α -hidroksiprogesteronas
17OHPreg – 17 α -hidroksipregnenolonas
5-Adiol – androstendiolis
A4 – androstendionas
ADP – adenzino difosfatas
AK – alostatinis krūvis
AKR1C3 – aldo-keto reduktazė (angl. *aldo-keto reductase family 1, member C3*)
AKTH – adrenokortikotropinis hormonas
Apo A1/A2/B/E – apolipoproteinas A1/A2/B/E
ATEROSTRES – Lietuvos mokslo tarybos Mokslininkų grupių projekto „Lėtinio streso nulemti aterosklerozės proceso ypatumai: naujų biožymenų paieška ir tyrimai“ akronimas
AVPR1B – arginino vazopresino receptoriaus 1B (angl. *arginine vasopressin receptor 1B*)
cAMP – ciklinis adenzino 3',5'-monofosfatas
CBG – kortikosteroidus sujungiantis globulinas (angl. *corticosteroid binding globulin*)
CYP – citochromas
CypA – ciklofilinas A
CMIA – chemiliuminescencinė analizė
CRB – C reaktyvusis baltymas
CRFR1 – kortikotropiną atpalaiduojančio veiksnio receptoriaus 1 (angl. *corticotropin-releasing factor receptor 1*)
CRH – kortikotropiną atpalaiduojantis hormonas (angl. *corticotropin-releasing hormone*)
CV – variacijos koeficientas (angl. *coefficient of variation*)
DCh-MS – dujų chromatografija ir masių spektrometrija
DHEA – dehidroepiandrosteronas
DHEA-S – dehidroepiandrosterono sulfatas
DKS – diastolinis kraujo spaudimas
DOC – 11-deoksikortikosteronas
DTL – didelio tankio lipoproteinai
ECL – elektrochemiliuminescencinė analizė
eNOS – endotelio NO sintazė

ES – Europos Sąjunga
ESCh-FLU – efektyvioji skysčių chromatografija su fluorescenciniu detektoriumi
ESCh-MS/MS – efektyvioji skysčių chromatografija ir tandeminė masių spektrometrija
ESI – elektrosrauto jonizacija (angl. *electrospray ionization*)
FAD(H₂) – flavino adenino dinukleotidas (redukuotas)
FDX – feredoksinas
FDXR – feredoksino reduktazė
FMN(H₂) – flavino mononukleotidas (redukuotas)
FRAP – geležies redukcijos antioksidacinė galia (angl. *ferric reducing ability of plasma*)
FSH – folikulus stimuliuojantis hormonas
GnRH – gonadotropinus atpalaiduojantis hormonas (angl. *gonadotropin-releasing hormone*)
GR – gliukokortikoidų receptoriai
HOMA-IR – atsparumo insulinui indeksas (angl. *homeostatic model assessment for insulin resistance*)
HSD – hidroksisteroido dehidrogenazė
ICAM-1 – tarpląstelinė adhezijos molekulė 1
IFA – imunofermentinė analizė
IGF-1 – į insuliną panašus augimo veiksnys 1
IL-6/1β/4/10/13 – interleukinas 6/1β/4/10/13
IQR – tarpkvartilinis plotis
KFE – kietafazė ekstrakcija
KMI – kūno masės indeksas
KoA – kofermentas A
KŠL – koronarinė širdies liga
LC – melsvoji dėmė (lot. *locus caeruleus*)
LH – liuteinizuojantis hormonas
LMC – laboratorinės medicinos centras
LMTL – labai mažo tankio lipoproteinai
LoD – aptikimo riba (angl. *limit of detection*)
LoQ – nustatymo riba (angl. *limit of quantification*)
MC2R – 2 tipo melanokortino receptoriai
MDA – malono dialdehidas
MI – miokardo infarktas
MR – mineralkortikoidų receptoriai
MRM – daugialypių reakcijų stebėjimas (angl. *multiple reaction monitoring*)
MS – metabolinis sindromas

MTL – mažo tankio lipoproteinai
NAD(H) – nikotinamido adenino dinukletotidas (redukuotas)
NADP(H) – nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas (redukuotas)
NCEP-ATP III – Nacionalinės cholesterolio švietimo programos suaugusiųjų gydymo kriterijai (angl. *National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III*)
Ne DTL – ne didelio tankio lipoproteinai
NF-κB – branduolio veiksnys κB
NO – azoto oksidas
NPC1/2 – NPC viduląstelinis cholesterolio nešiklis 1/2 (angl. *NPC intracellular cholesterol transporter 1/2*)
PAPS – 3'-fosfoadenozino-5'-fosfosulfatas
PAPSS – PAPS sintazė
PHA ašis – pogumburio-hipofizės-antinksčių ašis
PHG ašis – pogumburio-hipofizės-gonadų ašis
PI – pasikliautinis intervalas
PMKI – Pitsburgo miego kokybės indeksas
POMC – proopiomelanokortinas
POMC – proopiomelanokortino genas
POR – citochromo P450 oksidoreduktazė
PSS – subjektyviai suvokto streso skalė (angl. *Perceived Stress Scale*)
RIA – radioimuninė analizė
 r_p – Pirsono koreliacijos koeficientas
 r_s – Spirmeno koreliacijos koeficientas
SCORE2 – rodiklis, nurodantis absoliučiąją riziką per 10 metų išsivystyti širdies ir kraujagyslių ligai (angl. *Systematic Coronary Risk Estimation 2*)
SHBG – lytinius hormonus sujungiantis globulinas (angl. *sex hormone binding globulin*)
SKS – sistolinis kraujo spaudimas
SN – standartinis nuokrypis
SNS – simpatinė nervų sistema
SR – santykinė rizika
SRD5A – steroidų 5α-reduktazė
SSE – skysčių-skysčių ekstrakcija
STAI – nerimo klausimynas (angl. *State-Trait Anxiety Inventory*)
SULT1E1 – estrogenų sulfotransferazė
SULT2A1 – DHEA sulfotransferazė
ŠKL – širdies ir kraujagyslių ligos
ŠS – šansų santykis
ŠSD – širdies susitraukimų dažnis

T – testosteronas
TAG – triacilgliceroliai
TBA – tiobarbitūrinė rūgštis
TNF- α – naviko nekrozės veiksnys α
TRAP – trombino receptorių aktyvinantis peptidas
TTL – tarpinio tankio lipoproteinai
UESCh-MS/MS – ultraefektyvioji skysčių chromatografija ir tandeminė masių spektrometrija
UV/Vis detektorius – ultravioletinės ir matomos šviesos detektorius
VRBTEK – Vilniaus regioninis biomedicininis tyrimų etikos komitetas
VŠĮ VUL SK – VŠĮ Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos
VU MF BMI FBMLMK – Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedra
ŽMGK – Žmogaus ir medicininės genetikos katedra

2. ĮVADAS

2.1. Darbo aktualumas

Širdies ir kraujagyslių ligos (ŠKL) vis dar išlieka pagrindine mirties priežastimi tiek Lietuvoje, tiek visame pasaulyje. Apskaičiuota, jog 2019 m. 17,9 mln. pasaulio gyventojų mirties priežastis buvo ŠKL ir tai sudarė 32 % visų mirčių [1]. Lietuvoje išeminė širdies liga sudaro daugiau kaip trečdalį visų mirčių, o mirtingumas nuo ŠKL Lietuvoje yra didžiausias iš visų Europos Sąjungos (ES) šalių ir net 4 kartus viršija ES vidurkį [2].

Gyvensenos veiksniai, tokie kaip netinkama mityba, menkas fizinis aktyvumas, rūkymas, yra siejami su didesne ŠKL rizika ir klasikinių ŠKL rizikos veiksnių – hipertenzijos, nutukimo, dislipidemijos, cukrinio diabeto – atsiradimu. Kiti gerai žinomi ir nemodifikuojami ŠKL rizikos veiksniai yra amžius, vyriškoji lytis, genetinis polinkis ir šeiminė ŠKL anamnezė [3]. Nors minėtų veiksnių svarba ŠKL vystymuisi yra neabejotina, vien tik klasikiniai veiksniai nepaaiškina tokio didelio sergamumo ir mirtingumo nuo ŠKL. Manoma, jog psichosocialinis stresas yra nepriklausomas ŠKL rizikos veiksnys. Epidemiologinių tyrimų duomenimis, lėtinis stresas darbe ir asmeniniame gyvenime yra susijęs su 40–50 % didesne koronarinės širdies ligos (KŠL) rizika [4]. Galimas tiek tiesioginis, tiek netiesioginis psichosocialinio streso poveikis širdies ir kraujagyslių sistemai [5]. Tiesioginis poveikis yra pagrįstas dėl streso išskiriamų hormonų biologiniu poveikiu, pasireiškiančiu atsparumu insulinui, padidėjusiu arteriniu kraujo spaudimu ir širdies susitraukimų dažniu, centrinio tipo nutukimu, imuninės sistemos veiklos sutrikimais, intensyvesniu sisteminiu ir arterijos sienelėje vykstančiu lokaliu uždegiminiu procesu [6–8]. Netiesioginis poveikis gali būti susijęs su elgsenos pokyčiais: rūkymu, kaloringo maisto ir alkoholio vartojimu, sumažėjusiu fiziniu aktyvumu, dienos režimo nesilaikymu [7]. Nors dėmesys psichosocialiniams veiksniams vis didėja ir jų svarba yra pabrėžiama 2021 m. publikuotose Europos kardiologų draugijos širdies ir kraujagyslių ligų prevencijos klinikinėje praktikoje rekomendacijose [5], streso kaip rizikos veiksnio supratimas ir streso valdymo programų taikymas klinikinėje praktikoje vis dar yra ribotas.

2.2. Darbo naujumas ir reikšmė

Pagrindinis psichosocialinio streso tyrimų ribotumas yra universališos ir validuotos streso vertinimo metodikos trūkumas. Moksliniuose tyrimuose stresas vertinamas skirtingais metodais: respondentams pildant streso

vertinimo klausimynus [9,10], atliekant specialias apklausas tiesioginio interviu būdu [11], taip pat skaičiuojant alostatinio krūvio indeksą [12] bei matuojant kortizolio koncentraciją įvairiuose biologiniuose ėminiuose [13–15]. Šiame tyrime siekėme kompleksiška įvertinti tiriamųjų streso lygį: naudojome anketinės apklausos metodus, skaičiavome alostatinio krūvio indekso vertes bei nustatėme steroidinių hormonų koncentracijas plaukų ėminiuose.

Nors visi minėti streso vertinimo metodai taikomi gana plačiai, pastaruoju dešimtmečiu labiausiai susidomėta kortizolio koncentracijos plaukuose nustatymu tiriant lėtinį stresą ir su juo susijusias būkles – lėtinio skausmo sindromą [16], miego sutrikimus [17], depresiją ir nerimo sutrikimus [18], bipolinį sutrikimą [19]. Publikuojama vis daugiau mokslinių darbų, kuriuose tyrinėjamos kortizolio koncentracijos plaukuose sąsajos su sergamumu širdies ir kraujagyslių ligomis bei šių ligų rizikos veiksniais [7], tačiau beveik neatlikta tyrimų, kuriuose būtų analizuojama kitų su stresu siejamų hormonų – kortizono bei dehidroepiandrosterono – svarba širdies ir kraujagyslių ligų rizikai vertinti.

Iki šiol ir Lietuvoje tokio tipo tyrimų nebuvo atlikta, tačiau hipotezė, jog psichosocialinis stresas yra veiksnys, kuris galėtų paaiškinti itin didelį Lietuvos populiacijos sergamumą ŠKL, pirmą kartą buvo iškelta bendrame Lietuvos ir Švedijos mokslininkų projekte „LiVicordia“. Pažymėtina, jog projekto vykdymo laikotarpiu Lietuvoje vidutinio amžiaus vyrų mirtingumas nuo ŠKL buvo apie keturis kartus didesnis nei Švedijoje. Minėto mokslinio tyrimo rezultatai parodė, jog Vilniaus vyrų imtyje rytinė kortizolio koncentracija seilėse ir kraujo serume buvo statistiškai reikšmingai didesnė, palyginti su to paties amžiaus Linčiopingo tiriamaisiais. Taip pat pastebėta, jog atsakas į laboratorijoje sukeltą ūminį stresą Vilniaus vyrų imtyje buvo statistiškai reikšmingai silpnesnis nei Linčiopingo tiriamųjų grupėje [20]. Visa tai leido daryti prielaidą, jog Lietuvoje patiriamas didesnis psichosocialinis stresas reikšmingai prisideda prie aukštų mirtingumo nuo ŠKL rodiklių.

Vykdant šį disertacinį darbą Lietuvoje pirmą kartą įdiegtas ESCh-MS/MS metodas steroidinių hormonų koncentracijoms plaukuose nustatyti. Tyrimą vykdėme dviejose tiriamųjų grupėse: jaunų ir vidutinio amžiaus vyrų (25–55 m.) bei vidutinio ir vyresnio amžiaus (50–64 m.) moterų. Nors naujausi epidemiologinių tyrimų duomenys rodo, kad Europoje daugiau moterų nei vyrų miršta nuo ŠKL (2,00 mln. vs. 1,76 mln. mirčių per metus), mirtingumo rodiklius standartizavus pagal amžių stebimas didesnis vyrų mirtingumas nuo ŠKL (moterų – 441 atvejis/100 tūkst. gyv. vs. vyrų – 551 atvejis/100 tūkst. gyv.). Pažymėtina, kad jaunesnių nei 70 m. amžiaus vyrų mirtingumas nuo ŠKL yra daugiau nei du kartus didesnis nei to paties amžiaus moterų [21].

Gauti tyrimų rezultatai naudingi tiek fundamentiniu, tiek praktiniu požiūriu. Suvokus sąsajas tarp lėtinio streso ir ŠKL rizikos, būtų galima tiksliau įvertinti konkretaus asmens riziką sirgti ŠKL ir laiku imtis tinkamos prevencijos, o įdiegta steroidinių hormonų tyrimo plaukuose metodika būtų naudinga vertinant prevencinių priemonių, pavyzdžiui, streso valdymo programų, efektyvumą.

2.3. Darbo tikslas

Įvertinti streso metu išskiriamų steroidinių hormonų koncentracijų plaukuose sąsajas su širdies ir kraujagyslių ligų rizikos veiksniais bei absoliučiąją riziką sirgti širdies ir kraujagyslių ligomis jaunų ir vidutinio amžiaus vyrų bei vidutinio ir vyresnio amžiaus moterų imtyse.

2.4. Darbo uždaviniai

1. Įdiegti efektyviosios skysčių chromatografijos ir tandeminės masių spektrometrijos (ESCh-MS/MS) metodą steroidinių hormonų koncentracijoms plaukų ėminiuose nustatyti.
2. Įvertinti steroidinių hormonų (kortizolio, kortizono, dehidroepiandrosterono) koncentracijų plaukuose sąsajas su tiriamųjų antropometriniais rodikliais, angliavandenių bei lipidų apykaitos žymenimis ir SCORE2 įverčiu.
3. Įvertinti steroidinių hormonų (kortizolio, kortizono dehidroepiandrosterono) koncentracijų plaukuose sąsajas su metabolinio sindromo išsivystymo rizika.
4. Išanalizuoti ryšius tarp objektyvių lėtinio streso vertinimo rodiklių (steroidinių hormonų plaukuose ir alostatinio krūvio indekso) ir respondentų subjektyviai vertinamų streso, nerimo lygio bei miego kokybės rodiklių.

2.5. Ginamieji teiginiai

1. Efektyvioji skysčių chromatografija ir tandeminė masių spektrometrija yra dideliu jautrumu ir specifiskumu pasižymintis analizės metodas, kurį naudojant galima patikimai įvertinti steroidinių hormonų koncentracijas plaukų ėminiuose.
2. Ilgalaikė gliukokortikoidų sekrecija yra sietina su didesniu tradicinių širdies ir kraujagyslių ligų rizikos veiksnių ir metabolinio sindromo dažniu bei didesne absoliučiąja rizika sirgti širdies ir kraujagyslių ligomis.

3. Stebimas statistiškai reikšmingas tiesioginis ryšys tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir alostatinio krūvio indekso verčių, tačiau ryšiai tarp objektyvių lėtinio streso žymenų ir subjektyviai respondentų vertinamo streso bei miego kokybės rodiklių yra labai silpni.

3. LITERATŪROS APŽVALGA

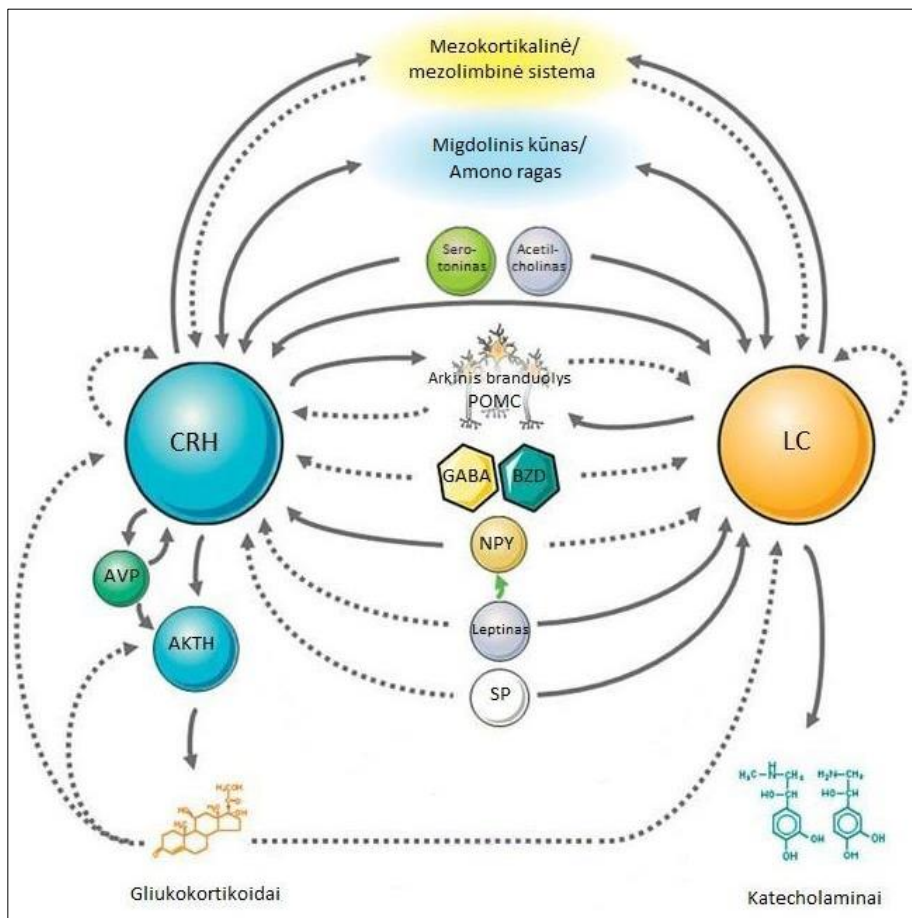
3.1. Streso samprata ir atsako į stresorių mechanizmai

Stresas – organizmo homeostazės sutrikdymas dėl emocijų ar fizinių stresorių poveikio [6,14]. Fiziologinis streso poveikis labai priklauso nuo individualaus stresoriaus grėsmės suvokimo, todėl stresoriumi vadinamos naujos, nenuspėjamos situacijos, keliančios grėsmę asmens ego ir kontrolės praradimo jausmą [22].

Fiziologinį atsaką į stresorių sukelia simpatinės nervų sistemos (SNS) bei pogumburio-hipofizės-antinksčių (PHA) ašies aktyvacija [6, 14]. Atsako į dirgiklį pradžioje (t. y. pirmosiomis sekundėmis po susidūrimo su stresoriumi) SNS aktyvumas padidėja: smegenų kamieno melsvosios dėmės (LC, lot. *locus caeruleus*) A1/A2 centruose skatinama noradrenalino sekrecija, o antinksčių šerdyje acetilcholinui veikiant chromafininių ląstelių muskarininius receptorius išskiriamas adrenalinas ir noradrenalinas. Katecholaminai, sąveikaudami su α ir β adrenerginiais receptoriais širdies raumenyje ir kraujagyslių sienelėse, lemia širdies susitraukimų dažnio ir kraujo spaudimo padidėjimą – smegenys ir raumenys efektyviau aprūpinami krauju, vyksta „kovok arba bėk“ (angl. *fight or flight*) reakcija [6].

Tolesnis atsakas į stresorių vyksta aktyvinant neuroendokrininę PHA ašį. Pogumburio paraventriculiniame branduolyje išskiriami kortikotropiną atpalaiduojantis hormonas (CRH, angl. *corticotropin-releasing hormone*) ir arginino vazopresinas (AVP). CRH jungiasi prie specifinių su G baltymais susijusių priekinėje hipofizės dalyje esančių CRFR1 receptorių (angl. *corticotropin-releasing factor type 1 receptors*), aktyvina adenilato ciklazę, didina viduląstelinio ciklinio adenzino monofosfato (cAMP) kiekį ir skatina adrenokortikotropinio hormono (AKTH) išsiskyrimą, aktyvina nuo cAMP priklausomos baltymų kinazės A signalinį kelią ir skatina *POMC* geno, koduojančio AKTH pirmtaką proopiomelanokortiną (POMC), raišką. AVP būdingas sinerginis veikimas: AVP jungiasi prie arginino vazopresino receptorių 1B (AVPR1B, angl. *arginine vasopressin receptor 1B*), aktyvinamas baltymų kinazės C signalinis kelias ir skatinama POMC sintezė, taip pat AVP skatina CRFR1 receptorių raišką priekinėje hipofizės dalyje. Išsiskykęs AKTH antinksčių pluoštinės zonos (lot. *zona fasciculata*) ląstelėse jungiasi su 2 tipo melanokortino receptoriais (MC2R, angl. *melanocortin 2 receptor*), aktyvina adenilato ciklazę, todėl didėja viduląstelinio cAMP koncentracija ir skatinama cholesterolio – kortizolio ir kitų steroidinių hormonų pirmtako – biosintezė [6, 14, 23]. Didžiausia kortizolio koncentracija nustatoma praėjus 15–20 min. po atsiradusio dirgiklio [14].

Tiek noradrenerginė sistema, tiek PHA ašis reguliuojama neigiamo grįžtamojo ryšio principu: iš LC išsiskyres noradrenaliną slopina noradrenerginę sistemą, o galutinis PHA ašies produktas kortizolis mažina AKTH ir CRH išsiskyrimą [6, 24]. Literatūroje aprašomas funkcinis ryšys tarp minėtų pagrindinių atsako į stresorių komponentų. Nustatyta, jog CRH išsiskyrimas pogumburyje skatina noradrenalino išsiskyrimą LC, o šis savo ruožtu aktyvina CRH sekreciją. Taip pat CRH ir noradrenerginė sistema aktyvina mezokortikalinę ir mezolimbines dopaminergines sistemas, o šios pasižymi slopinamuoju poveikiu pagrindiniams streso sistemos komponentams. Paminėtinas ir CRH sekretuojančių neuronų bei noradrenerginės sistemos ryšys su aukštesniaisiais centrinės nervų sistemos centrais – migdoliniu kūnu (lot. *amygdala*), atsakingu už baimės ir pykčio jausmų atsiradimą, bei Amono ragu (lot. *hippocampus*), kuris svarbus atminties, mokymosi procesams, motyvacijos formavimuisi. CRH išsiskyrimas skatina α -melanocitus stimuliuojančio hormono ir β -endorfino išsiskyrimą iš pogumburio arkinio branduolio (angl. *arcuate nucleus*), o minėtos molekulės slopina CRH sekreciją ir noradrenerginės sistemos aktyvumą [6, 24]. Nustatyta, jog neuromediatoriai serotoninas, acetilcholinai skatina, o benzodiazepinas (BZD), γ -aminobutiratas (GABA) slopina noradrenerginę sistemą ir CRH sekreciją. Naujausių tyrimų rezultatai parodė, jog reikšmingą poveikį atsako į stresorių sistemai, tikėtina, turi neuropeptidas Y (NPY), leptinas, medžiaga P (SP) [6]. Apibendrinta streso sistemos komponentų ir jų funkcinės sąveikos schema pateikiama 1 paveiksle.



1 pav. Streso sistemos komponentai ir jų funkcinė sąveika (pritaikyta pagal Nicolaidis N. C. *et al.*, 2014 [6])

3.2. Streso vertinimo metodai

Moksliniuose tyrimuose, kuriuose nagrinėjamas įvairių psichosocialinių stresorių poveikis psichinei ir fizinei asmens sveikatai, vis dar susiduriama su standartizuotų streso vertinimo metodų stoka. Pagrindiniai literatūroje nagrinėjami lėtinio streso vertinimo metodai yra biocheminių žymenų tyrimai, alostatinio krūvio indekso skaičiavimas bei tiriamųjų papildomi streso vertinimo klausimynai, tyrėjų vykdomi interviu ar automatinės klausimynų principu sukurtos streso vertinimo sistemos [25, 26].

3.2.1. Steroidiniai hormonai – biocheminiai streso žymenys

Stresas aktyvina neuroendokrininę PHA ašį, todėl steroidinius hormonus galima panaudoti kaip objektyvius biologinius streso žymenis. Dažniausiai psichosocialinio streso tyrimuose kaip ūminio ar lėtinio streso biocheminis žymuo naudojamas kortizolis [15, 16, 27], tačiau vis didesnis dėmesys skiriamas kortizolio metabolito kortizono bei androgenų pirmtako dehidroepiandrosterono bei jo sulfato kaip papildomų streso biocheminių žymenų tyrimams [28, 29].

3.2.2. Steroidinių hormonų biosintezė

Žmogaus organizme steroidiniai hormonai *de novo* sintetinami iš cholesterolio antinksčių žievėje, lytinėse liaukose ir placentoje [30–32]. Transkriptomikos tyrimai parodė, jog kai kurių steroidinių hormonų sintezėje dalyvaujančių fermentų raiška vyksta širdyje bei smegenyse, tačiau šiuose organuose nenustatyta reikšmingų biologiškai aktyvių hormonų kiekių [33]. Steroidinių hormonų biosintezėi naudojamas cholesterolis į ląstelę patenka receptorinės endocitozės būdu mažo tankio lipoproteinų sudėtyje cholesterolio esterių pavidalu, tačiau tam tikruose audiniuose ar organuose (pvz. antinksčiuose) cholesterolis ląstelių endoplazminiame tinkle gali būti sintetinamas *de novo* iš acetil-KoA [32]. Endosomose cholesterolio esteriai veikiant rūgštinei lizosomų lipazei hidrolizuojami iki laisvojo cholesterolio. Tropiniai hormonai (adrenokortikotropinis ir liuteinizuojantis hormonai) didina viduląstelinio cAMP kiekį antinksčiuose, o pastarasis slopina acil-KoA-cholesterolio aciltransferazės aktyvumą ir aktyvina β -hidroksi- β -metilglutaril-KoA reduktazę – ląstelėje didėja laisvojo cholesterolio kiekis. Laisvasis cholesterolis endosomoje susijungia su NPC1 ir NPC2 (angl. *NPC intracellular cholesterol transporter 1/2*) glikoproteinais ir yra pernešamas iš endosomos į ląstelės citoplazmą. Iš citoplazmos cholesterolis kartu su START (angl. *StAR-related lipid transfer*) domeną turinčiais pernašos baltymais (žinduolių organizme StarD1-15) pasiekia išorinę mitochondrijų membraną, o joje susijungęs su StAR (angl. *steroidogenic acute regulatory protein*) baltymu, sąveikaujančiu su išorinės mitochondrijų membranos baltymų kompleksu, patenka į vidinę mitochondrijų membraną, kurioje vyksta pirmoji steroidinių hormonų biosintezės reakcija [33, 34].

Steroidogenezėje dalyvauja dviejų funkcinių klasių fermentai: citochromai P450 (CYP) ir hidroksisteroido dehidrogenazės (HSD). Hemo prostetinę grupę struktūroje turintys CYP, panaudodami redukuotą nikotinamido adenino dinukleotido fosfatą (NADPH) kaip elektronų donorą, aktyvina

molekulinį deguonį ir fermentinės reakcijos metu vienas deguonies atomas oksiduoja substrato molekulę, o kitas deguonies atomas redukuojamas iki vandens molekulės [31, 34]. CYP katalizuojamos reakcijos yra negrįžtamos [31, 32].

Išskiriami du CYP tipai:

- **1 tipo CYP** išsidėstę mitochondrijų vidinėje membranoje ir yra priklausomi nuo elektronų pernašoje dalyvaujančio flavoproteino feredoksino reduktazės (FDXR, angl. *ferredoxin reductase*) ir geležies-sieros baltymo feredoksino (FDX, angl. *ferredoxin*) [31]. Pagrindiniai šio tipo fermentų atstovai yra CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2 [32, 34].
- **2 tipo CYP** išsidėstę endoplazminiame tinkle ir yra priklausomi nuo elektronų pernašoje dalyvaujančio fermento citochromo P450 oksidoreduktazės (POR), kurios sudėtyje kaip kofermentai veikia flavino adenino dinukleotidas (FAD) ir flavino mononukleotidas (FMN) [31]. Pagrindiniai šio tipo fermentų atstovai yra CYP17A1, CYP21A2, CYP19A1 [32, 34].

HSD fermentai kaip kofaktorių naudoja NAD(P)H ir NAD(P)⁺ bei katalizuoja hidroksisteroido virtimo atitinkamu ketosteroidu tiesioginę ir atvirkštinę reakcijas [31]. Pagrindinės steroidinių hormonų sintezėje dalyvaujančios HSD yra HSD3B2, HSD11B1, HSD11B2, HSD17 [32,34].

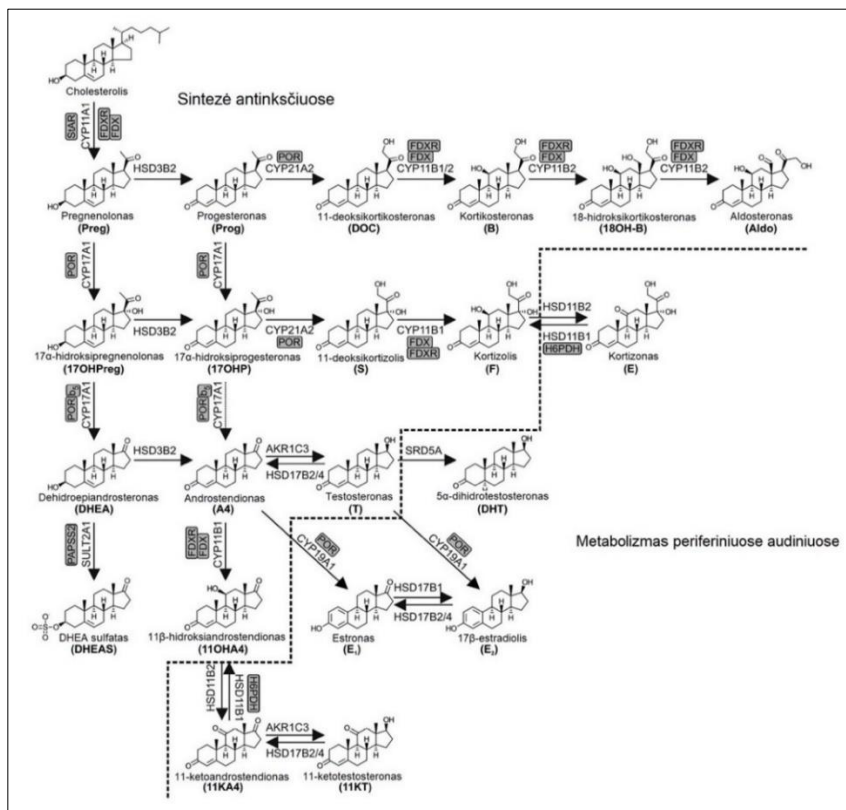
3.2.2.1. Steroidinių hormonų sintezė antinksčių žievėje

Antinksčių žievėje sintetinami mineralkortikoidai, gliukokortikoidai, androgenai ir jų pirmtakai. Antinksčių žievė skirstoma į tris funkcines zonas, kuriose dėl fermentus koduojančių genų raiškos skirtumų vyksta skirtingų steroidinių hormonų sintezė. Visų steroidinių hormonų biosintezės pirmoji reakcija yra mitochondrijose vykstantis ir CYP11A1 katalizuojamas cholesterolio virtimas pregnenolonu [30–33]. Tolesnės reakcijos yra sričiai specifinės (2 pav.):

- **Kamuolinėje srityje** (lot. *zona glomerulosa*) vyksta renino-angiotenzino-aldosterono sistemos reguliuojama aldosterono biosintezė. Veikiant HSD3B2 iš pregnenolono susidaro progesteronas. Progesteronas, katalizuojant fermentui CYP21A2, verčiamas į 11-deoksikortikosteroną (DOC), o pastarasis, veikiant CYP11B, virsta kortikosteronu, kurį CYP11B2 (aldosterono sintazė)

per tarpinį produktą 18-hidroksikortikosteroną verčia į aldosteroną [31].

- **Pluoštinėje srityje** (lot. *zona fasciculata*) vyksta PHA ašies reguliuojama kortizolio biosintezė. Veikiant HSD3B2 ir CYP17A1 iš pregnenolono susidaro 17 α -hidroksiprogesteronas (17OHP). CYP21A2 katalizuoja 17OHP vartimą 11-deoksikortizoliu, o iš jo veikiant CYP11B1 susidaro kortizolis [31].
- **Tinklinėje srityje** (lot. *zona reticularis*) vyksta dehidroepiandrosterono (DHEA) ir jo sulfato (DHEA-S), androstendiono (A4), 11 β -hidroksiandrostendiono (11OHA4) bei testosterono (T) biosintezė. Veikiant CYP17A1 iš pregnenolono susidaro 17 α -hidroksipregnenolonas (17OHPreg). CYP17A1 pasižymi 17,20-liaziniu aktyvumu ir 17OHPreg verčia į DHEA. CYP17A1 17,20-liaziniui aktyvumui kaip kofermentas būtinas citochromas b5. DHEA sintezę reguliuoja PHA ašis, tačiau, skirtingai nei kortizolis, DHEA neslopina PHA ašies neigiamo grįžtamojo ryšio principu. Didžioji antinksčių žievės pluoštinėje srityje susintetinto DHEA dalis, katalizuojant DHEA sulfotransferazei (SULT2A1), verčiama į DHEA-S [33]. DHEA ir kitų steroidinių hormonų sulfoninimas vyksta per tarpinio junginio – universalus sulfo grupių donoro 3'-fosfoadenozino-5'-fosfosulfato – susidarymą (PAPS). PAPS sintezėje dalyvauja fermentas PAPS sintazė (PAPSS). Taip pat DHEA veikiant HSD3B2 gali virsti į androstendioną, o iš jo, katalizuojant aldo-keto reduktazei (AKR1C3), susidaro testosteronas (T) [31].



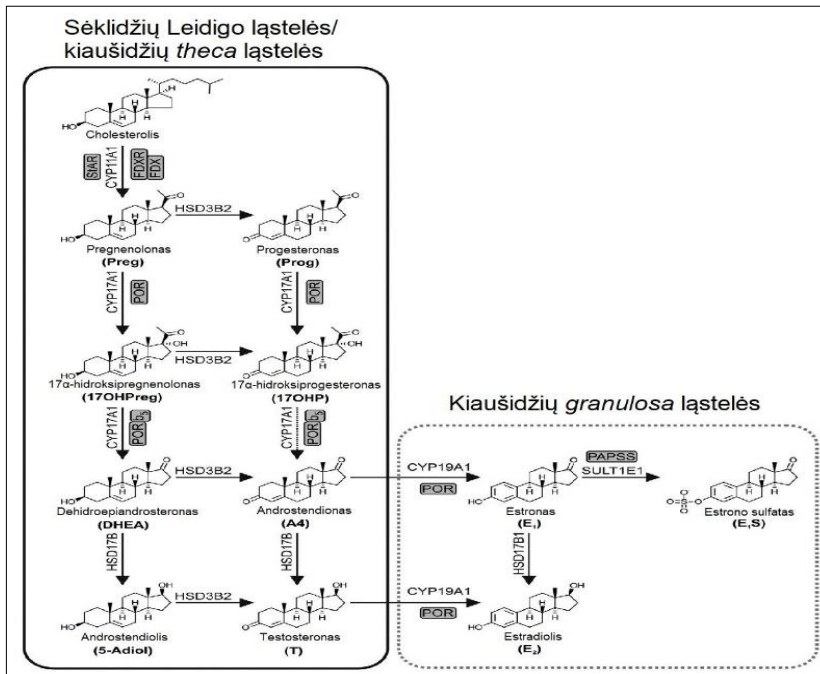
2 pav. Steroidinių hormonų biosintezės antinksčių žievėje bei metabolizmo periferiniuose audiniuose reakcijos (pritaikyta pagal Schiffer L. *et al.*, 2019 [31])

3.2.2.2. Steroidinių hormonų sintezė lytinėse liaukose

Steroidinių hormonų sintezę lytinėse liaukose reguliuoja pogumburio-hipofizės-gonadų (PHG) ašis. Pogumburyje sintetinamas gonadotropinus atpalaiduojantis hormonas (GnRH), kuris skatina liuteinizuojančio hormono (LH) ir folikulus stimuliuojančio hormono (FSH) sintezę. Pastarieji skatina androgenų ir estrogenų sekreciją lytinėse liaukose. PHG reguliuojama neigiamo grįžtamojo ryšio principu: estrogenai ir androgenai veikia hipofizėje ir pogumburyje esančius receptorių, slopindami GnRH ir LH bei FSH sintezę [35].

Sėklidžių Leidigo ląstelėse sintetinamas T, A4, DHEA. DHEA Leidigo ląstelėse sintetinamas tuo pačiu sintezės keliu kaip ir antinksčių tinklinės srities ląstelėse, tačiau Leidigo ląstelėse nevyksta fermento SULT2A1 raiška, todėl DHEA veikiant HSD3B2 verčiamas į A4 arba katalizuojant HSD17B3 virsta į androstendiolį (5-Adiol). A4 ir androstendiolis panaudojami kaip

testosterono sintezės substratai. Kiaušidžių *theca* ląstelėse daugiausia sintetinama androstendiono ir progesterono, taip pat gaminama šiek tiek DHEA ir testosterono, o *granulosa* ląstelėse sintetinamas 17 β -estradiolis. A4 ir testosteronas *theca* ląstelėse susidaro vykstant tokioms pačioms reakcijoms kaip ir antinksčių žievės ląstelėse. Abu minėti hormonai patenka į *granulosa* ląstelę ir veikiant fermentui CYP19A1 (aromatazė) sintetinamas estronas, iš kurio katalizuojant HSD17B1 susidaro 17 β -estradiolis. *Theca* ląstelėse intensyviai sintetinamas fermentas estrogenų sulfotransferazė (SULT1E1), katalizuojanti estrono sulfato susidarymą [31–33] (3 pav.). Paminėtina, jog kiaušidėse androgenų ir estrogenų sintezei kaip substratai naudojami ir antinksčiuose susintetinti DHEA ir A4. Androgenų sintezė lytinėse liaukose intensyviausia brendimo laikotarpiu, moterims reikšmingai sumažėja po menopauzės, o vyrams androgenų koncentracija itin sumažėja nuo 60 metų amžiaus [31].



3 pav. Steroidinių hormonų biosintezės lytinėse liaukose reakcijos (pritaikyta pagal Schiffer L. *et al.*, 2019 [31])

3.2.3. Steroidiniai hormonai kraujyje ir jų metabolizmas periferiniuose audiniuose

Svarbiausias kraujyje nustatomas mineralkortikoidas yra aldosteronas, taip pat aptinkamos nedidelės koncentracijos šio hormono pirmtakų – DOC,

kortikosterono, 18-hidroksikortikosterono. Didžioji kraujyje cirkuliuojančio aldosterono dalis yra laisvas hormonas, o 1/3 šio hormono yra susijungusio su baltymais – kortikosteroidus sujungiančiu globulinu (angl. *corticosteroid binding globulin*, CBG) ir albuminu [31].

Svarbiausi kraujyje nustatomi gliukokortikoidai yra kortizolis ir kortizonas. Kortizolio virsmą kortizonu katalizuoja fermentas 11 β -hidroksisteroido dehidrogenazė 2 (HSD11B2) (2 pav.). Minėto fermento raiška intensyviausiai vyksta mineralkortikoidų organuose taikiniuose – inkstų žievinėje dalyje, žarnyne, seilių ir prakaito liaukose bei placentoje. HSD11B2 katalizuojama reakcija apsaugo mineralkortikoidų receptorių (MR) nuo jų aktyvinimo kortizoliu, kurio koncentracija kraujo plazmoje yra 100–1000 kartų didesnė nei aldosterono [36]. Kortizono virsmą aktyviu kortizoliu katalizuoja 11 β -hidroksisteroido dehidrogenazė 1 (HSD11B1) (2 pav.), kurios intensyvi raiška nustatyta kepenyse, smegenyse, baltajame riebaliniame audinyje, raumenyse, odoje ir kauluose [33]. Kortizolio ir kortizono koncentracijų santykis kraujyje yra gana pastovus, tačiau žinoma, jog audiniams specifinė HSD11B1 raiška lemia viduląstelinis gliukokortikoidų koncentracijų pokyčius. Nustatyta, jog kraujotakoje 80–90 % kortizolio yra susijungusio su CBG, 5–10 % sudaro kompleksą su albuminu, o <10 % nustatoma laisvo hormono [31].

Literatūros šaltiniuose teigiama, jog kraujyje aptinkami antinksčių žievėje ir lytinėse liaukose susintetinti aktyvūs androgenai bei neaktyvūs jų pirmtakai. Svarbiausias vyrų ir reprodukcinio amžiaus moterų androgenas – testosteronas. Vyrų kraujo serume nustatoma apie 10 kartų didesnė testosterono koncentracija nei moterų, pagrindinis testosterono šaltinis vyrų organizme yra sėklidės ir tik nedidelė hormono dalis sintetinama antinksčiuose. Moterų organizme 50 % kraujotakoje esančio testosterono susidaro antinksčiuose ir kiaušidėse, o likusi dalis sintetinama periferiniuose audiniuose iš androgenų pirmtakų, pvz. androstendiono. Periferinių audinių ląstelėse A4 yra fermento AKR1C3, katalizuojančio A4 virsmą testosteronu, substratas. Tolimesnių reakcijų metu katalizuojant steroidų 5 α -reduktazei (SRD5A) vyksta testosterono redukcija iki 5 α -dihidrottestosterono – hormono, kuriam būdingas stipriausias androgeninis poveikis. Intensyviausia SRD5A raiška vyksta kepenyse, smegenyse, odoje ir priešinėje liaukoje [33]. Kiti kraujyje nustatomi androgenų pirmtakai yra DHEA, DHEA-S, A4, 11OHA4 bei androstendiolio sulfatas. Periferiniuose audiniuose (daugiausia kepenyse) iš 11OHA4 veikiant HSD11B2 susidaro 11-ketoandrostendionas (11KA4). AKR1C3 katalizuojamoje reakcijoje 11KA4 virsta 11-ketotestosteronu (11-

KT) (2 pav.), kuris pasižymi panašiu afiniškumu androgenų receptoriams kaip ir testosteronas [31].

Kraujyje aptinkami trys estrogenų klasės hormonai – estronas, estrono sulfatas ir 17β -estradiolis. Pastarasis yra laikomas biologiškai aktyvia forma. Moterims postmenopauziniu laikotarpiu ir vyrams yra itin svarbi estrogenų sintezė periferiniuose audiniuose (daugiausia baltajame riebaliniame audinyje) iš antinksčiuose susintetintų androgenų ir jų pirmtakų veikiant fermentams CYP19A1 ir HSD17B1 [33]. Aktyviems androgenams (dihidrotesteronui, testosteronui) ir estrogenams būdingas didelis afiniškumas lytinius hormonus sujungiančiam globulinui (SHBG, angl. *sex hormone binding globulin*) ir gerokai mažesnis giminingumas albuminui, todėl didžioji dalis minėtų hormonų kraujyje yra susijungę su SHBG. Tik 1–2 % androgenų ir estrogenų kraujyje cirkuliuoja laisvi. Vienintelis natūraliai organizme egzistuojantis ir kraujyje nustatomas progesterogenų klasės atstovas yra progesteronas. Didžiausios jo koncentracijos būdingos reprodukcinio amžiaus moterims, ypač antrajame ir trečiajame nėštumo trimestre, gerokai mažesnės koncentracijos aptinkamos postmenopauziniu laikotarpiu, o vyrų kraujo plazmoje randami labai nedideli progesterono kiekiai. Nustatyta, jog didžioji dalis kraujyje esančio progesterono yra sujungta su CBG [31].

3.2.4. Alostatinio krūvio indeksas

1993 m. Bruce'as S. McEwen'as ir Eliot'as Stellar'as [37] nagrinėdami sąsajas tarp patiriamo lėtinio streso ir įvairių sveikatos sutrikimų (autonominės nervų sistemos, virškinamojo trakto, širdies ir kraujagyslių bei imuninės sistemų sutrikimų) aprašė alostazės ir alostatinio krūvio teoriją. Alostazė gali būti apibrėžiama kaip homeostazės palaikymas kintant pagrindinių fiziologinių sistemų (autonominės nervų sistemos, neuroendokrininės, imuninės) aktyvumui, o alostatinis krūvis (AK) – tai lėtinio streso sukeltas organizmo „susidėvėjimas“, pasireiškiantis alostazę palaikančių fiziologinių sistemų disfunkcija. Naudojantis minėta teorija lėtinio streso lygiui įvertinti buvo pasiūlyta skaičiuoti alostatinio krūvio indeksą – objektyvų alostatinio krūvio dydžio įvertinimo rodiklį [38–40]. Haley W. Parker'io su kolegomis 2022 m. publikuotos metaanalizės duomenimis [41], didesnis alostatinio krūvio indeksas yra siejamas su 22 % didesniu mirtingumu nuo įvairių priežasčių (angl. *all-cause mortality*) bei 31 % didesniu mirtingumu nuo širdies ir kraujagyslių ligų.

AK indeksui skaičiuoti naudojami skirtingų organizmo fiziologinių sistemų – neuroendokrininės, metabolinės, kardiovaskulinės, imuninės,

kvėpavimo, šalinimo – veiklą atspindintys žymenys ir rodikliai. Dažniausiai moksliniuose tyrimuose tuo tikslu naudojami minėtų sistemų rodikliai pateikiami 1 lentelėje.

1 lentelė. AK indeksui skaičiuoti naudojami žymenys ir rodikliai [40]

Sistema	Žymuo/rodiklis
Neuroendokrininė	Kortizolis
	Dehidroepiandrosterono sulfatas
	Dopaminas
	Adrenalinas
	Noradrenalinas
	Skydliaukę stimuliuojantis hormonas
Metabolinė	Kūno masės indeksas
	Cholesterolis
	Gliukozė
	Glikozilintas hemoglobinas
	DTL-cholesterolis
	HOMA-IR
	Insulinas
	IGF-1
	MTL-cholesterolis
	Triacilgliceroliai
Liemens apimtis	
Liemens ir klubų apimčių santykis	
Kardiovaskulinė	Albuminas
	Arterinis kraujo spaudimas
	Širdies ritmo variabilumas
	Širdies susitraukimų dažnis ramybėje
	Pulsinis spaudimas
Imuninė	CRB
	E-selektinas
	Eritrocitų nusėdimo greitis
	Fibrinogenas
	ICAM-1
	IL-6
	Neutrofilų procentinė dalis
	TNF- α
Leukocitų skaičius	
Kvėpavimo	Forsuoto iškvėpimo tūris per pirmą sekundę
	Maksimalus iškvėpimo greitis
Šalinimo	Kreatininas
	Homocisteinas

Santrumpos: DTL – didelio tankio lipoproteinai, HOMA-IR – atsparumo insulinui indeksas (angl. *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*), IGF-1 – į insuliną panašus augimo veiksnys 1, MTL – mažo tankio lipoproteinai, CRB – C reaktyvusis baltymas, ICAM-1 – tarpląstelinė adhezijos molekulė 1, IL-6 – interleukinas 6, TNF- α – naviko nekrozės veiksnys α .

Paminėtina, jog AK indekso skaičiavimo metodika nėra standartizuota – skirtinguose tyrimuose naudojami skirtingi rodikliai, taip pat įvairuoja ir naudojamų rodiklių skaičius. Į AK indekso skaičiavimą įtraukiamų rodiklių vertės keičiamos į dichotominius (0 ir 1) kintamuosius ribinėmis reikšmėmis (angl. *cut-off*) pasirenkant kliniškai reikšmingas vertes, tiriamųjų imtį dalijant į kvartilius ar kvantilius arba taikant kombinuotą skaičiavimo metodiką [38].

3.2.5. Steroidinių hormonų tyrimai žmogaus biologiniuose ėminiuose

Klinikinės diagnostikos laboratorijose steroidinių hormonų koncentracijai įvertinti naudojami kraujo serumo ir šlapimo ėminiai, tačiau moksliniuose tyrimuose vis daugiau dėmesio skiriama hormonų koncentracijai nustatyti seilių, plaukų bei nagų ėminiuose [42–44]. 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 rinkti pakartotinius ėminius [43, 45]. Atliktų tyrimų rezultatai parodė, kad androstenediono, 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 [42, 45]. Nepaisant minėtų privalumų, yra ir keletas trūkumų: seilių ėminys gali būti užterštas krauju, gleivėmis ar maisto likučiais, o tai gali trukdyti tiksliai įvertinti steroidinių hormonų koncentracijas [43, 45]. Be to, seilėse steroidinių hormonų koncentracija yra mažesnė nei kraujo serume, todėl būtina taikyti didesniu jautrumu pasižyminčius analizės metodus [42]. Tiriant kraujo serumo ar seilių mėginius įvertinami tik trumpalaikiai steroidinių hormonų koncentracijos svyravimai, todėl, siekiant nustatyti ilgalaikius hormonų koncentracijos pokyčius, naudojami plaukų ir nagų ėminiai [44, 45] (2 lentelė).

Daugumoje atliktų tyrimų plaukų mėginiuose tiriama kortizolio koncentracija, tačiau taikant itin jautrius ir specifiskus analizės metodus galima išmatuoti ir testosterono, estradiolio, progesterono, kortizono, DHEA koncentracijas [46]. 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 [47, 48], todėl plaukai yra netinkami per paskutines minutes ar valandas iki tyrimo

įvykusiems ūminiams pokyčiams vertinti [49] (2 lentelė). Siekiant nustatyti ilgalaikius pokyčius, svarbu atsižvelgti į tyrimui parenkamo plaukų ėminio ilgį. Kiekvieno žmogaus plaukų augimo greitis yra skirtingas, tačiau 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 [50]. Taip yra dėl to, kad labiausiai nuo galvos odos nutolę plaukai yra intensyviau ir ilgiau veikiami ultravioletinės (UV) spinduliuotės, dažnai plaunant plaukus ar juos veikiant cheminėmis priemonėmis steroidiniai hormonai gali būti „išplaunami“, t. y. pašalinami iš plauko vidinių struktūrų [51]. 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 [52]. J. G. Abell'io ir bendraautorų [53] atliktų tyrimų duomenimis, steroidinių hormonų koncentracija priklauso nuo lyties ir amžiaus, taip pat įtakos gali turėti išoriniai veiksniai, pavyzdžiui, plaukų priežiūros priemonės (plaukų dažai, šampūnai, cheminis apdorojimas). G. Noppe [54] nustatė, 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 $p = 0,25$).

Kaip vertinga alternatyva steroidinių hormonų koncentracijos plaukuose tyrimams gali būti naudojami nagų ėminiai. Manoma, jog 1 mm laisvojo nago krašto atspindi prieš 3–6 mėn. nuo ėminio paėmimo 10 dienų laikotarpiu išsiskyrusių hormonų kiekį. Pagrindinis nagų ėminių privalumas yra neinvazinis ir paprastas ėminio surinkimas – ėminius tiriamieji gali surinkti savarankiškai, nereikalingas specialiai apmokytas personalas [44, 55]. Nepaisant minėtų privalumų trūksta duomenų, kokią įtaką steroidinių hormonų koncentracijai naguose turi tokie veiksniai kaip vartojami vaistai ir nagų priežiūros ypatumai. Taip pat nežinomos optimalios nagų ėminių laikymo sąlygos: dauguma tyrėjų siūlo ilgesniam saugojimo laikotarpiui ėminius šaldyti $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, tačiau detalių tyrimų, kuriuose būtų analizuojama ėminių laikymo sąlygų įtaka steroidinių hormonų koncentracijai, nėra. Dėl šių priežasčių plaukai išlieka pagrindiniu ėminiu ilgalaikiai steroidinių hormonų sekrecijai įvertinti [44].

2 lentelė. Steroidinių hormonų koncentracijos tyrimams naudojamų ėminių palyginimas [44, 47]

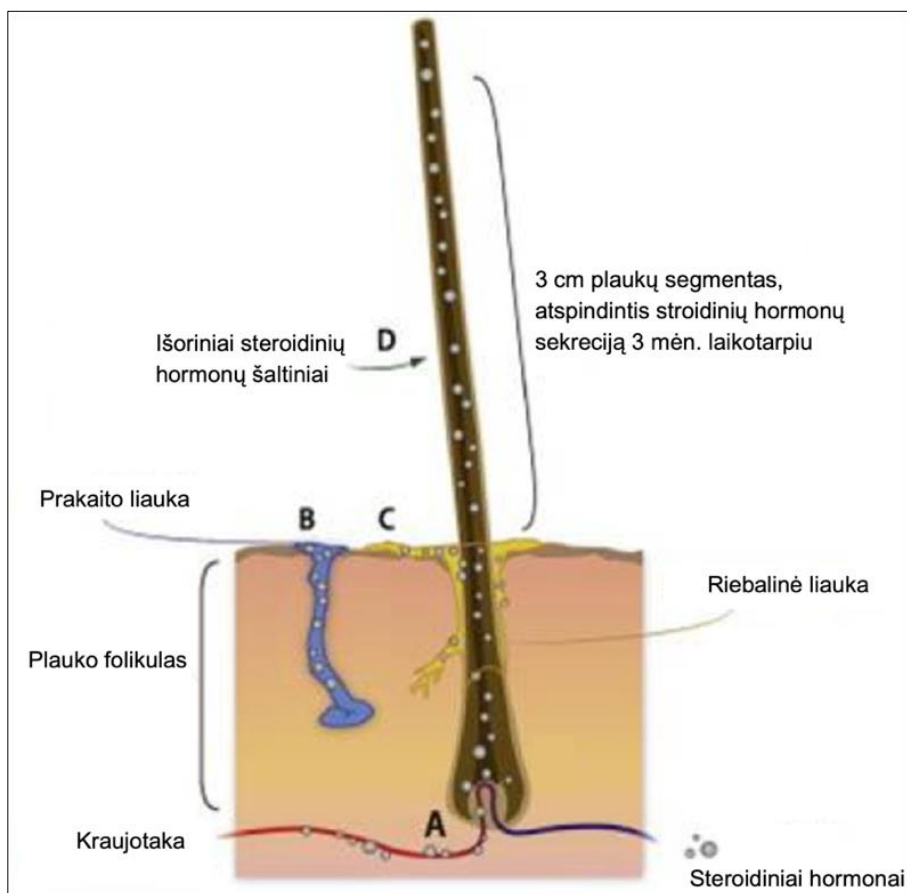
Ėminys	Ėminio laikymo reikalavimai	Ėminio paėmimo invaziškumas	Retrospektyvus hormonų koncentracijos įvertinimas	Surinkimo metodas	Įvertintas laikotarpis	Cirkadinio ritmo poveikis	Trumpalaikių koncentracijos pokyčių įvertinimas
Kraujo serumas	Tyrimas atliekamas nedelsiant arba užšaldomas -20 °C temperatūroje	Invazinis	Negalimas	Venos punkcija	Minutės	Yra	Galimas
Seilės	Tyrimas atliekamas nedelsiant arba užšaldomas -20 °C temperatūroje	Neinvazinis, gali sukelti diskomfortą	Negalimas	Surenkamos į specialius plastikinius mėgintuvėlius	Minutės	Yra	Galimas
Šlapimas	Tyrimas atliekamas nedelsiant arba užšaldomas -80 °C temperatūroje	Neinvazinis, tačiau kai kuriems tiriamiesiems paros šlapimo surinkimo procedūra gali būti sudėtinga	Negalimas	Surenkamas į specialų vienkartinį indelį	24 val.	Nėra	Negalimas

2 lentelė (tęsinys). Steroidinių hormonų koncentracijos tyrimams naudojamų ėminių palyginimas [44, 47]

Ėminys	Ėminio laikymo reikalavimai	Ėminio paėmimo invaziškumas	Retrospektyvus hormonų koncentracijos įvertinimas	Surinkimo metodas	Įvertintas laikotarpis	Cirkadinio ritmo poveikis	Trumpalaikių koncentracijos pokyčių įvertinimas
Plaukai	Tamsoje, kambario temperatūroje	Neskausmingas, neinvazinis	Galimas	Kerpama nedidelė plaukų sruoga nuo viršugalvio užpakalinės dalies kuo arčiau galvos odos	Savaitės ar mėnesiai	Nėra	Negalimas
Nagai	Tyrimas atliekamas nedelsiant arba ėminiai užšaldomi –20 °C, –30 °C ar –80 °C temperatūroje	Neskausmingas, neinvazinis	Galimas	Kerpamas laisvasis nago kraštas	Savaitės ar mėnesiai	Nėra	Negalimas

3.2.5.1. Steroidinių hormonų pernaša į plaukus

Tikslūs mechanizmai, kuriais steroidiniai hormonai iš kraujotakos patenka į plauko vidines struktūras, dar nėra gerai žinomi, tačiau manoma, jog hormonai į plauką patenka pasyvios difuzijos būdu iš kraujo kapiliarų į augančias plauko folikulo ląsteles (šerdį), taip pat per prakaito ar riebalines liaukas [56, 57]. Alternatyvus mechanizmas – lokali PHA ašies aktyvacija plauko folikule, kai aktyvintos plauko folikulo ląstelės pačios geba sintetinti kortizolį [54]. Todėl renkant plaukų ėminius patartina plaukus kirpti kuo arčiau galvos odos vengiant plauko folikulo patekimo, nes tai lemia klaidingai didesnes nustatomas steroidinių hormonų koncentracijas [52] (4 pav.).



4 pav. Steroidinių hormonų patekimo į plauko vidines struktūras mechanizmas (A – pasyvi difuzija iš kraujo kapiliarų, B – prakaito liaukos, C – riebalinės liaukos D – išoriniai steroidinių hormonų šaltiniai) (pritaikyta pagal Lee D.Y. *et al.*, 2015 [57])

3.2.5.2. Plaukų ėminių paruošimo analizei metodų apžvalga

Plaukų ėminių paruošimą analizei apima šie etapai: ėminio svėrimas, plovimas ir steroidinių hormonų ekstrakcija. Kai kuriose metodikose prieš ekstrakciją atliekamas ėminio smulkinimas (homogenizacija) [47]. Daugumoje literatūroje aprašomų metodikų prieš analizę atliekami vienas ar keli plaukų plovimo etapai, kurie, priklausomai nuo ėminio užterštumo, trunka nuo 2 min. iki 10 min. [58, 59]. Jie būtini tam, kad būtų pašalintos analizei trukdančios medžiagos: plaukų priežiūros priemonės, prakaito ir riebalinių liaukų išskyros ar kitos plauko paviršiuje aptinkamos medžiagos (epidermio ląstelės, kūno skysčiai). Taip pat plaukų plovimo procedūra padeda išvengti galimo plaukų užterštumo sintetiniais steroidiniais preparatais. Plaukų plovimui naudojami šie tirpikliai: chloroformas, metileno chloridas, metanolis, izopropanolis (3 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 „išpūsti“ plauko struktūrą padidindami tikimybę išskirti iš plaukų steroidinius hormonus [47, 60].

Veiksmingai steroidinių hormonų ekstrakcijai svarbi efektyvi plaukų ėminio ir ekstrakcijos tirpalo sąveika, todėl siekiant padidinti sąveikos paviršiaus plotą plaukų ėminiai smulkinami chirurginėmis žirkklėmis iki ~1 mm pluoštelių [56] arba sutrinami rutuliniu malūnėliu (3 lentelė). Plaukų smulkinimas žirkklėmis 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 ėminus iki ~5 μm 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 steroidinių hormonų skilimo procesus [47]. Naujausiais duomenimis, 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 α -pregnenolonas nesunkiai gali būti aptinkami naudojant tiek smulkintus, tiek nesmulkintus plaukų ėminius [58].

Steroidiniai hormonai iš plaukų išskiriami naudojant organinius tirpiklius (pvz.: metanolį, acetoną) [47], Sorenseno buferinį tirpalą (0,2 M NaH₂PO₄; 0,2 M Na₂HPO₄) ar druskos rūgštį (3 lentelė) [58]. A. Herane Vives ir kolegų [61] parengtame apžvalginiame straipsnyje 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 į plauko struktūrą, ją išpučia ir sudaro poras, pro kurias steroidiniai hormonai išskiriami į terpę [58, 61, 62]. Nors vandeniniai rūgščių tirpalai lemia grynesnių ekstraktų susidarymą, palyginti su ekstrakcija metanolyje, minėti tirpalai gali sukelti analičių hidrolizę [58]. Dažniausiai plaukų mėginys steroidinių hormonų ekstrakcijai 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 [47]. Po ekstrakcijos reikalingos papildomos mėginių gryninimo procedūros, kad nepatektų analizei trukdančių medžiagų. Plaukų mėginiams dažniausiai naudojama kietafazė ekstrakcija (KFE) (3 lentelė) [58]. 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 [63].

3.2.5.3. Analizės metodai

Dažniausiai steroidinių hormonų koncentracijoms nustatyti naudojami chemiliuminescencinės (CMIA) bei imunofermentinės analizės (IFA) metodai. Tyrimai šiais metodais yra nesunkiai atliekami ir pasižymi dideliu jautrumu bei našumu [64]. Nustatyta, jog taikant IFA analizės variacijos koeficientas (CV, angl. *coefficient of variation*) yra mažesnis nei 10 %. Panašaus dydžio CV yra būdingas ir analizei naudojant ESCh-MS metodą [48]. L. Dettenborn su kolegomis [65] ištyrę 360 asmenų plaukų ėminius nustatė, jog CMIA metodu išmatuotos kortizolio koncentracijos plaukuose variacijos koeficientas yra mažesnis nei 8 %. Taip pat tyrimų rezultatai rodo, jog CMIA metodu nustatytos kortizolio koncentracijos plaukuose vertės stipriai koreliuoja su ESCh-MS/MS metodu gautomis vertėmis ($r^2 = 0,96$)

[65]. Vis dėlto pagrindinis IFA trūkumas yra santykinai mažas specifiškumas dėl IFA metodams naudojamų antikūnų kryžminių reakcijų su kitomis lipofilinėmis medžiagomis. Be to, IFA metodas yra skirtas tik vienai mėginio analizei nustatyti, todėl nėra galimybės vienos analizės metu iširti keleto steroidinių hormonų koncentracijų, šis metodas netinka ėminiams, kuriuose yra nedidelės steroidinių hormonų koncentracijos (pvz. plaukams) [58].

Chromatografiniai tyrimų metodai sumažina imunofermentinių metodų apribojimus, nes pasižymi geresniu jautrumu ir specifiškumu [60]. Taikant efektyviają skysčių chromatografiją su fluorescenciniu detektoriumi (ESCh-FLU) pastebėta, jog ESCh-FLU pasižymi geresniu specifiškumu nei IFA. W. Gao ir kolegos [66] ESCh-FLU metodą pritaikė kortizolio koncentracijai plaukuose nustatyti. Gauti rezultatai parodė, jog aptikimo riba (LoD, angl. *limit of detection*) yra 1 pg/mg, o metodo atkuriamumas siekia 74 %, tačiau analizei reikalingas kur kas didesnis ėminio kiekis ir sudėtingos, daug laiko trunkančios ėminio apdorojimo bei analizės derivatizacijos procedūros [66]. Panašiais privalumais ir trūkumais pasižymi ir dujų chromatografijos ir masių spektrometrijos (DCh-MS) metodas. Jis sėkmingai panaudotas androgenų, estrogenų, progesterinų, kortikoidų koncentracijai plaukuose nustatyti, išsiskiria geru specifiškumu, tačiau pasižymi ilga analizės trukme, reikalauja sudėtingų ėminio paruošimo ir derivatizacijos procedūrų, didelių ėminio kiekių (30–200 mg plaukų) [58].

Vienas labiausiai paplitusių analizės metodų steroidinių hormonų koncentracijai plaukuose nustatyti yra efektyvioji skysčių chromatografija ir masių spektrometrija (ESCh-MS) [63]. Šis metodas išsiskiria itin dideliu jautrumu ir specifiškumu, vienos analizės metu galima įvertinti daugelio analičių koncentracijas. Palyginti su DCh-MS, taikant ESCh-MS metodą nereikalingas sudėtingas ir daug laiko sąnaudų reikalaujantis analičių derivatizacijos etapas, todėl šis metodas tinka didelio našumo analizėms [60]. W. Gao ir kolegų [58] parengtame apžvalginiame straipsnyje pateiktos skirtingų autorių ESCh-MS metodais išmatuotų steroidinių hormonų (kortizolio, kortizono, testosterono, DHEA, DHEA-S) koncentracijų plaukuose nustatymo ribos (LoQ, angl. *limit of quantification*). Nurodoma, jog LoQ skirtingiems steroidiniams hormonams svyruoja nuo 0,08 pg/mg iki 100 pg/mg.

Siekiant dar labiau padidinti metodo jautrumą ir specifiškumą, sumažinti naudojamo ėminio kiekį, sutrumpinti mėginio paruošimo ir analizės laiką, padidinti vienu metu analizuojamų mėginių skaičių, vis dažniau steroidinių hormonų koncentracijai įvertinti naudojamas efektyviosios skysčių chromatografijos ir tandeminės masių spektrometrijos (ESCh-MS/MS) metodas [63]. Šiuo metodu galima patikimai kiekybiškai įvertinti platų

steroidinių hormonų spektrą tiriant tokias terpes kaip kraujo serumas, sauso kraujo lašas, seilės, šlapimas, ląstelių homogenatas ar plaukai [67]. W. Gao ir kolegės [63] sėkmingai pritaikė ESCh-MS/MS metodą septynių steroidinių hormonų koncentracijai plaukuose nustatyti. Gauti tyrimų rezultatai parodė, jog kortizolio, kortizono, testosterono, progesterono, kortikosterono, androstenediono LoQ yra $\leq 0,1$ pg/mg, o DHEA LoQ – 0,9 pg/mg. Minėtų autorių įdiegta ESCh-MS/MS metodika leido pasiekti didesnę analizės jautrumą, palyginti su kitų autorių naudotais DCh-MS ar ESCh-MS metodais. Be to, W. Gao ir bendraautorių [60] tyrime nustatytas analizės CV visiems tirtiems steroidiniams hormonams plaukuose buvo 3,7–9,1 %. Vis dėlto aprašyto metodo taikymą riboja keli trūkumai: brangūs ir techniškai sudėtingi prietaisai bei analizės greitis. Dėl šių priežasčių įdiegti ESCh-MS/MS metodą į klinikinės diagnostikos laboratorijas yra sudėtinga, reguliariai atliekama tik labai nedidelė dalis tyrimų [62].

3 lentelė. Plaukų ėminių paruošimo analizei bei kiekybinio hormonų koncentracijų nustatymo metodų apžvalga

Literatūros šaltinis	Ėminio ilgis, cm	Ėminio kiekis, mg	Plovimas	Smulkinimo būdas	Ekstrakcijos tirpiklis (-iai)	Ekstrakcijos trukmė, val.	Ekstrakcijos temperatūra, °C	Papildomi ekstrakto gryninimo metodai	Tiriami hormonai	Analizės metodas
Skoluda <i>et al.</i> , 2012 [68]	3	25	Izopropanolis (2×, 3 min.)	Rutulinis malūnėlis	Metanolis	0,75	60	Netaikomi	Kortizolis	CMIA
Gao <i>et al.</i> , 2014 [69]	1–1,5	50	Metanolis (2×, 2 min.)	Rutulinis malūnėlis	Metanolis	24	40	KFE	Kortizolis	ESCh-MS/MS
Grunau <i>et al.</i> , 2013 [70]	2	10–15	Izopropanolis (2×, 3 min.)	Chirurginės žirklys	Metanolis	16	50	Netaikomi	Kortizolis	IFA
Van Uum <i>et al.</i> , 2008 [16]	2	10–20	ND	Chirurginės žirklys	Metanolis	16	52	Netaikomi	Kortizolis	IFA
Wei <i>et al.</i> , 2015 [71]	1	ND	Izopropanolis (3×, 3 min.)	Rutulinis malūnėlis	Metanolis	24	ND	Netaikomi	Kortizolis	ECL
Slominski <i>et al.</i> , 2015 [72]	1–3	50	ND	Chirurginės žirklys	Metanolis	15	52	Netaikomi	Kortizolis	ESCh-MS
Karlen <i>et al.</i> , 2011 [73]	ND	>5	Neplauti	Rutulinis malūnėlis	Metanolis	24	25	Netaikomi	Kortizolis	RIA
Hobo <i>et al.</i> , 2020 [74]	3	1	Izopropanolis (2×)	Rutulinis malūnėlis	0,1 M trifluoracto rūgšties ir 50 % acetonitrilo tirpalas	1	40	SSE ir KFE	Kortizolis, kortizonas, testosteronas, dihidrotestosteronas, DHEA, androstendionas, estradiolis	ESCh-MS/MS
Gaudi <i>et al.</i> , 2016 [75]	ND	10–20	Vanduo (1×), acetonas (1×)	ND	Metanolis	24	ND	Automatizuota KFE	Kortizolis, kortizonas	ESCh-MS/MS/MS
Dong <i>et al.</i> , 2017 [76]	3	30	Šampūnas ir vanduo (2×, 6 min.), heksanas (1×, 3 min.)	Chirurginės žirklys	Metanolis	18	25	Netaikoma	28 steroidiniai hormonai (6 kortikosteroidai, 13 estrogenų, 5 androgenai, 4 progestogenai)	UESCh-MS/MS

3 lentelė (tęsinys). Plaukų ėminių paruošimo analizei bei kiekybinio hormonų koncentracijų nustatymo metodų apžvalga

Literatūros šaltinis	Ėminio ilgis, cm	Ėminio kiekis, mg	Plovimas	Smulkinimo būdas	Ekstrakcijos tirpiklis (-iai)	Ekstrakcijos trukmė, val.	Ekstrakcijos temperatūra, °C	Papildomi ekstrakto gryninimo metodai	Tiriami hormonai	Analizės metodas
Gao <i>et al.</i> , 2010 [66]	1	50	Metanolis (2×)	Rutulinis malūnėlis	Sorenseno buferinis tirpalas, 0,1 M HCl, 0,1 M NaOH	16	40	SSE, KFE	Kortizolis	ESCh-FLU
Noppe <i>et al.</i> , 2015 [77]	1	10–30	Izopropanolis (1×)	Nesmulkinti	Metanolis	18	25	KFE	Kortizolis, kortizonas, testosteronas, 17 α -hidroksiprogesteronas, androstendionas, DHEA-S	ESCh-MS/MS
Voegel <i>et al.</i> , 2020 [78]	3	20	Dejonizuotas vanduo (1×), acetonas (1×)	Rutulinis malūnėlis	Metanolis	2	55	SSE	Kortizolis, kortizonas, progesteronas, testosteronas, androstendionas	ESCh-MS/MS
Gao <i>et al.</i> , 2013 [63]	3	10	Izopropanolis (1×, 3 min.)	Nesmulkinti	Metanolis	18	Kambario temp.	Automatizuota KFE	Kortizolis, kortizonas, testosteronas, kortikosteronas, progesteronas, DHEA, androstendionas	ESCh-MS/MS
Raul <i>et al.</i> , 2004 [79]	2	30–100	Metileno chloridas (2×, 2 min.)	Rutulinis malūnėlis	Sorenseno buferinis tirpalas	16	40	KFE ir SSE	Kortizolis, kortizonas	ESCh-MS

Santrumpos: KFE – kietafazė ekstrakcija, SSE – skysčių-skysčių ekstrakcija, CMIA – chemiluminescencinė analizė, IFA – imunofermentinė analizė, UESCh-MS/MS – ultraefektyvioji skysčių chromatografija ir tandeminė masių spektrometrija, ESCh-MS/MS – efektyvioji skysčių chromatografija ir tandeminė masių spektrometrija, ESCh-MS – efektyvioji skysčių chromatografija ir masių spektrometrija, RIA – radioimuninė analizė, ECL – elektrochemiluminescencinė analizė, ND – nėra duomenų.

3.3. Psichosocialinio streso svarba širdies ir kraujagyslių ligų išsivystymui

Daugėjant mokslinės informacijos apie daugiaveiksnių širdies ir kraujagyslių ligų etiologiją, vis daugiau dėmesio skiriama tam, kokią reikšmę turi elgsenos ir psichosocialiniai veiksniai ŠKL vystymuisi ir prevencijai. Epidemiologinių tyrimų duomenimis, ūminis emocinis stresas yra siejamas su nestabilia krūtinės angina, miokardo infarktu (MI) ir staigia mirtimi, o lėtinis stresas yra reikšmingas koronarinės širdies ligos (KŠL) patogenezėje [80].

Tarptautiniame atvejo ir kontrolės tyrime INTERHEART vertintas ryšys tarp ūminio miokardo infarkto ir psichosocialinio streso, apibrėžto kaip dirglumo, ilgalaikio nerimo jausmas, namuose ar darbe patiriamos įtampos sukelti miego sutrikimai. Tyrime dalyvavo 11 119 pacientų, kuriems pirmą kartą diagnozuotas ūminis MI, bei 13 648 kontrolinės grupės asmenys, kuriems MI nebuvo nustatytas. Rezultatai atskleidė, jog lėtinis namuose ir darbe patiriamas stresas yra susijęs su 2,17 (95 % PI [1,84; 2,55]) karto didesne rizika sirgti MI [81]. J. Booth'o su bendraautoriais [82] publikuotoje metaanalizėje, į kurią įtraukta 14 tyrimų, nagrinėta sąsaja tarp patiriamo psichosocialinio streso ir insulto rizikos. Gauti rezultatai parodė, jog tiriamieji, patiriantys lėtinį psichosocialinį stresą arba išgyvenę stiprų stresą sukėlusius įvykius, turi 1,33 (95 % PI [1,17; 1,50]) karto didesnę insulto riziką. A. Steptoe ir M. Kivimäki [4] parengtos metaanalizės duomenimis, vaikystėje patirtas lėtinis stresas (fizinė ar seksualinė prievarta, tėvų liga ar mirtis, prasta socialinė ir ekonominė padėtis) yra susijęs su beveik du kartus didesne rizika sirgti KŠL. Atsižvelgę į lyties ir amžiaus įtaką, autoriai patvirtino ir reikšmingą ryšį tarp darbe patiriamos įtampos ir 1,34 karto padidėjusios KŠL išsivystymo rizikos (95 % PI [1,18; 1,51]). Aptartų tyrimų rezultatai leidžia daryti prielaidą, jog lėtinis stresas yra svarbus ŠKL rizikos veiksnys, tačiau visuose apžvelgtuose moksliniuose tyrimuose psichosocialinis stresas vertintas subjektyviais metodais (tiriamųjų pildomais klausimynais), kurie neatskleidžia biologinio mechanizmo, siejančio lėtinį stresą su ŠKL išsivystymu.

4. MOKSLINIO DARBO METODIKA

4.1. Tiriamieji

Disertacinis darbas atliktas sudarius dvi tiriamųjų imtis:

1-asis tyrimas (vyrų imtis): Lietuvos mokslo tarybos Mokslininkų grupių projektas „Lėtinio streso nulemti aterosklerozės proceso ypatumai: naujų biožymenų paieška ir tyrimai“, akronimas – ATEROSTRES. Projekto vykdymo laikotarpis: 2015–2018 m. Projekto numeris: MIP-050/2015. Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto (VRBTEK) leidimo, išduoto 2015 m. spalio 6 d., Nr. 158200-15-807-319 (1 priedas). Vadovė – akad. prof. habil. dr. Zita Aušrelė Kučinskienė. Tyrime dalyvavo atsitiktine tvarka iš VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų (VšĮ VUL SK) Šeimos medicinos centro duomenų bazės atrinkti sąlyginai sveiki jauni ir vidutinio amžiaus (25–55 m.) vyrai.

2-asis tyrimas (moterų imtis): Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedros (VU MF BMI FBMLMK) vykdomas biomedicininis tyrimas „Steroidinių hormonų koncentracijos plaukuose sąsaja su moterų patiriamu lėtinio streso lygiu ir rizika sirgti širdies ir kraujagyslių ligomis“. Projekto vykdymo laikotarpis: 2020–2022 m. VRBTEK leidimo, išduoto 2020 m. rugpjūčio 25 d., Nr. 2020/8-1254-735 (2 priedas). Projekto vadovė – doc. dr. Dovilė Karčiauskaitė. Į tyrimą įtrauktos sąlyginai sveikos 50–64 m. amžiaus moterys, dalyvaujančios širdies ir kraujagyslių ligų prevencijos programoje (pagal Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministro 2005 m. lapkričio 25 d. įsakymą Nr. V-913 „Dėl Asmenų, priskirtinų širdies ir kraujagyslių ligų didelės rizikos grupei, atrankos ir prevencijos priemonių finansavimo programos patvirtinimo“). Į tyrimą nebuvo įtrauktos besilaukiančios ir maitinančios moterys.

Tiriamųjų asmeninė informacija buvo konfidenciali ir saugiai užkoduota, biologiniai ėminiai buvo tiriami ir gauti duomenys analizuojami naudojant identifikacinius kodus. Tyrimų dalyviai yra pasirašę informuoto asmens sutikimo formas.

4.2. Tyrimo eiga

Disertaciniame darbe iškeltiems tikslams ir uždaviniams įgyvendinti biomedicininiai tyrimai buvo atliekami pagal 5 paveiksle pateikiamą schemą.

Tiriamųjų atranka VŠĮ VUL SK Šeimos medicinos centre:

Tiriamųjų atranka pagal nustatytus įtraukimo/neįtraukimo kriterijus, informuoto asmens sutikimo formos pasirašymas

Atrankos kriterijus atitinkančių tiriamųjų vizitas VŠĮ VUL SK Šeimos medicinos centre:

Pildomi klausimynai
Vertinami antropometriniai rodikliai
Paimami kraujo ir plaukų ėminiai

Laboratorinių tyrimų atlikimas VŠĮ VUL SK LMC bei VU MF BMI FBMLMK ir ŽMGK laboratorijose:

Steroidinių hormonų tyrimai plaukų ėminiuose
Biocheminiai tyrimai (lipidų ir angliavandenių apykaitos rodikliai)
Veninio kraujo tyrimas automatizuotu metodu*
Uždegimo žymenų tyrimai*
Oksidacinio streso žymenų tyrimai*
Trombocitų funkcinio aktyvumo žymenų tyrimai*

Rezultatų interpretacija, statistinė duomenų analizė

5 pav. Mokslinio tyrimo eiga (*pažymėti tyrimai atlikti tik vyrų imtyje). Santrumpos: VŠĮ VUL SK LMC – Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centras, VU MF BMI FBMLMK – Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedra, ŽMGK – Žmogaus ir medicininės genetikos katedra

4.3. Tyrimo metodai

4.3.1. Klausimynai

Tiriamųjų apklausai buvo naudojami klausimynai, apimantys tiriamųjų sociodemografinius duomenis bei gyvensenos ypatumus. Fizinis aktyvumas vertintas respondentams pateikiant keturių fizinio aktyvumo darbe ir laisvalaikiu grupių aprašus. Fizinio aktyvumo darbe apibūdinimai:

1 grupė – darbas yra iš esmės sėdimas ir dirbant daug nevaikštoma, pvz.: darbas prie rašomojo stalo arba paprastų detalių surinkimas.

2 grupė – dirbant reikia gana daug vaikščioti, bet nereikia nešioti arba kilnoti sunkių daiktų, pvz.: klientų aptarnavimas, lengvas pramoninis darbas, pardavėjų darbas, dėstymas, kai daug vaikštoma.

3 grupė – dirbant daug vaikštoma, kilnojami daiktai arba tenka daug laiptoti aukštyn ir žemyn, pvz.: paštininko darbas, sunkesnės pramonės darbai, statybos, sunksnis darbas restorane.

4 grupė – sunkus fizinis darbas, kilnojami sunkūs daiktai ir dirbama fiziškai intensyviai, pvz.: slaugos darbai, reikalaujantys kilnoti sunkius objektus ir atlikti sunkius tvarkymo darbus.

Fizinio aktyvumo laisvalaikio apibūdinimai:

1 grupė – daugiausia laisvalaikio skiriama skaitymui, televizoriaus žiūrėjimui, kino teatro lankymui ir kitai fiziškai neaktyviai veiklai.

2 grupė – mažiausiai 4 kartus per savaitę einama pasivaikščioti, važinėjama dviračiu ar kitaip judama. Šiai grupei priklauso: ėjimas arba važinėjama dviračiu į darbą ir atgal, sekmadieniniai pasivaikščiojimai, nesunkus darbas sode, žvejyba, stalo tenisas, žaidimas kėgliais.

3 grupė – laisvalaikis skiriamas bėgimui, plaukimui, lauko tenisui, badmintonui, aerobikai arba panašioms judrioms sporto šakoms. Šiai grupei priklauso sunkesni sodo darbai. Tokia veikla užsiimama bent 3 kartus per savaitę.

4 grupė – laisvalaikis skiriamas sunkioms treniruotėms bei dalyvavimui reguliariai vykstančiose bėgimo, orientavimosi, slidinėjimo, plaukimo, futbolo, rankinio varžybose porą kartų per savaitę.

Bendrajam tiriamųjų fiziniam aktyvumui įvertinti buvo apskaičiuota fizinio aktyvumo darbe ir laisvalaikio įverčių suma: kiekviena fizinio aktyvumo grupė (1–4 grupė) verčiama balais nuo 1 iki 4 ir apskaičiuojama fizinio aktyvumo darbe ir laisvalaikio balų suma (galimi bendrojo fizinio aktyvumo lygio įverčiai – 2–8 balai). Bendrojo fizinio aktyvumo lygis surinkus 2 arba 3 balus vertinamas kaip žemas, surinkus 4–8 balus – kaip aukštas.

Moterų imtyje papildomai naudoti specializuoti klausimynai tiriamųjų patiriamo streso, nerimo lygiui bei miego kokybei įvertinti.

Per paskutinį mėnesį patirto streso lygiui įvertinti naudota subjektyviai suvokto streso skalė (angl. *Perceived Stress Scale*, PSS). Šiame darbe naudotas iš 10 klausimų sudarytas PSS klausimynas, kuriame kiekvienas klausimas turi 5 atsakymo variantus, vertinamus nuo 0 iki 4 balų (3 priedas). PSS surinktų balų suma įvairuoja nuo 0 iki 40. Didesnė surinktų skalės balų suma reiškia didesnę streso lygį: 0–13 balų – streso lygis žemas, 14–26 – streso lygis vidutinis, 26–40 – streso lygis aukštas [83].

Nerimas vertintas pasitelkiant STAI (angl. *State-Trait Anxiety Inventory*) klausimyno skalę, leidžiančią nustatyti asmenybinį nerimastingumą (STAI-T, angl. *T-Anxiety*) (4 priedas). Naudojantis STAI-T klausimynu vertinama, ar žmogus yra linkęs nerimauti, analizuojamos saugumo, ramybės, pasitikėjimo

savimi būsenos bei jų dažnumas. Klausimą sudaro 20 klausimų, kurių kiekvienas turi po 4 atsakymo variantus, vertinamus nuo 1 iki 4 balų. STAI-T surinktų balų suma įvairuoja nuo 20 iki 80. Didesnė surinktų balų suma reiškia didesnę nerimą [84].

Paskutinio mėnesio miego kokybei vertinti naudotas Pitsburgo miego kokybės indeksas (PMKI, angl. *Pittsburgh sleep quality index*) (5 priedas). Klausimą sudaro 19 klausimų, kurie yra suskirstyti į 7 kategorijas: subjektyvi miego kokybė, miego latentškumas, miego trukmė, įprastinis miego efektyvumas, miego sutrikimai, vaistų miegui vartojimas, bloga savijauta dieną. Kiekviena klausimų kategorija vertinama balais nuo 0 iki 3, kur 0 balų reiškia, jog sutrikimų nėra, o 3 balai rodo stiprius sutrikimus. PMKI surinktų balų suma įvairuoja nuo 0 iki 21. Didesnė surinktų balų suma reiškia blogesnę miego kokybę: surinkus ≥ 5 balus miegas vertinamas kaip sutrikęs [85].

4.3.2. Steroidinių hormonų tyrimai plaukų ėminiuose

4.3.2.1. Reagentai ir medžiagos

Tirpikliai: izopropanolis, $\geq 99,9$ % grynumo (*Sigma-Aldrich*, Vokietija); acetonas, gradientinės ESCh grynumo (*Chromasolv*[®], Vokietija); metanolis, gradientinės ESCh grynumo (*Chromasolv*[®], Vokietija); heksanas, gradientinės ESCh grynumo (*Chromasolv*[®], Vokietija); acetonitrilas, gradientinės ESCh grynumo (*Chromasolv*[®], Vokietija); dietilo eteris, 99,5 % DCh grynumo (*Chromasolv*[®], Vokietija); skruzdžių rūgštis, >99 % grynumo (*Merck Schuchardt OHG*, Vokietija); dejonizuotas vanduo, paruoštas vandens gryninimo įranga PURELAB Flex-3 (*Elga*[®], Jungtinė Karalystė); Sorenseno buferinis tirpalas (0,133 M, pH = 7,6); acto rūgštis, $\geq 99,8$ % grynumo (*VWR International GmbH*, JAV).

Sorenseno buferinio tirpalo (0,133 M, pH=7,6) paruošimas: 1,889 g Na₂HPO₄, $\geq 99,0$ % grynumo (*Sigma-Aldrich*, Vokietija), ištirpinama 100 ml dejonizuoto vandens, o 0,908 g KH₂PO₄, $\geq 99,0$ % grynumo (*Sigma-Aldrich*, Vokietija), ištirpinama 50 ml dejonizuoto vandens. Ruošiant 100 ml Sorenseno buferinio tirpalo sumaišoma 86,8 ml Na₂HPO₄ tirpalo ir 13,2 ml KH₂PO₄ tirpalo.

Steroidinių hormonų etaloninės medžiagos: 6 α -metilprednizolonas, ≥ 98 % grynumo (*Sigma-Aldrich*, Vokietija); kortizolis, ≥ 98 % grynumo (*Sigma-Aldrich*, Vokietija); kortizonas, ≥ 98 % grynumo (*Sigma-Aldrich*, JAV); dehidroepiandrosteronas, ≥ 99 % grynumo (*Sigma-Aldrich*, JAV); testosteronas, ≥ 99 % grynumo (*Sigma-Aldrich*, JAV), progesteronas, $\geq 99,8$ %

grynumo (*Sigma-Aldrich*, JAV); 17 α -hidroksiprogesteronas, ≥ 95 % grynumo (*Sigma-Aldrich*, JAV); estradiolis, $\geq 96,7$ % grynumo (*Sigma-Aldrich*, JAV); kortizolis-d4, ≥ 98 % grynumo (*Sigma-Aldrich*, JAV); kortizonas-d8, ≥ 98 % grynumo (*Sigma-Aldrich*, JAV); dehidroepiandrosteronas-d6, ≥ 98 % grynumo (*Sigma-Aldrich*, JAV); testosteronas-d3, ≥ 98 % grynumo (*Sigma-Aldrich*, JAV); progesteronas-d9, $\geq 98,6$ % grynumo (*Sigma-Aldrich*, JAV); 17 α -hidroksiprogesteronas-d8, $\geq 99,2$ % grynumo (*Sigma-Aldrich*, JAV); estradiolis-d5, $\geq 99,2$ % grynumo (*Sigma-Aldrich*, JAV).

Standartinių kortizolio tirpalų paruošimas (1-asis tyrimas): pirminis kortizolio (5 mg/ml) standartinis tirpalas ištirpintas 90 % acetonitrile ir laikomas tamsiame inde -20 °C temperatūroje. Mažesnių koncentracijų tirpalai buvo ruošiami skiedžiant pirminį standartą acetonitrilo ir vandens mišinyje (1:1, v/v).

Standartinių steroidinių hormonų tirpalų paruošimas (2-asis tyrimas): pirminiai kortizolio-d4 (1 mg/ml), kortizono-d8 (0,2 mg/ml), progesterono-d9 (0,2 mg/ml), DHEA-d6 (1 mg/ml), estradiolio-d5 (20 μ g/ml), testosterono-d3 (10 μ g/ml) bei kortizolio, kortizono, progesterono, DHEA, estradiolio, 17 α -hidroksiprogesterono, testosterono standartiniai tirpalai (1 mg/ml) ištirpinti metanolyje ir laikomi tamsiuose induose -20 °C temperatūroje. Mažesnių koncentracijų tirpalai buvo gaminami skiedžiant pirminius standartus metanoliu.

Kietafazės ekstrakcijos kolonėlės: Discovery® DSC-18, tūris – 1 ml, sorbento kiekis – 100 mg (*Sigma-Aldrich Co.*, Vokietija).

4.3.2.2. Plaukų ėminių surinkimas ir paruošimas analizei

Pirmajame tyrime (vyrų imtyje) plaukų ėminio paruošimas analizei atliktas pagal Jean'o-Sébastien'o Raul'io su kolegomis [79] bei Elio F. De Palo ir bendraautorių [86] straipsniuose publikuotas metodikas. Plaukų sruoga buvo kerpama nuo viršugalvio užpakalinės dalies, kuo arčiau galvos odos. Surinkti ėminiai dedami į foliją ir atitinkamai paženklinami (jie gali būti laikomi ilgą laiką kambario temperatūroje, vengiant UV spinduliuotės poveikio). Prieš tolesnes mėginio paruošimo procedūras pasirenkamas norimas plaukų ėminio ilgis – šiame tyrime naudojama 3 cm ilgio plaukų sruoga.

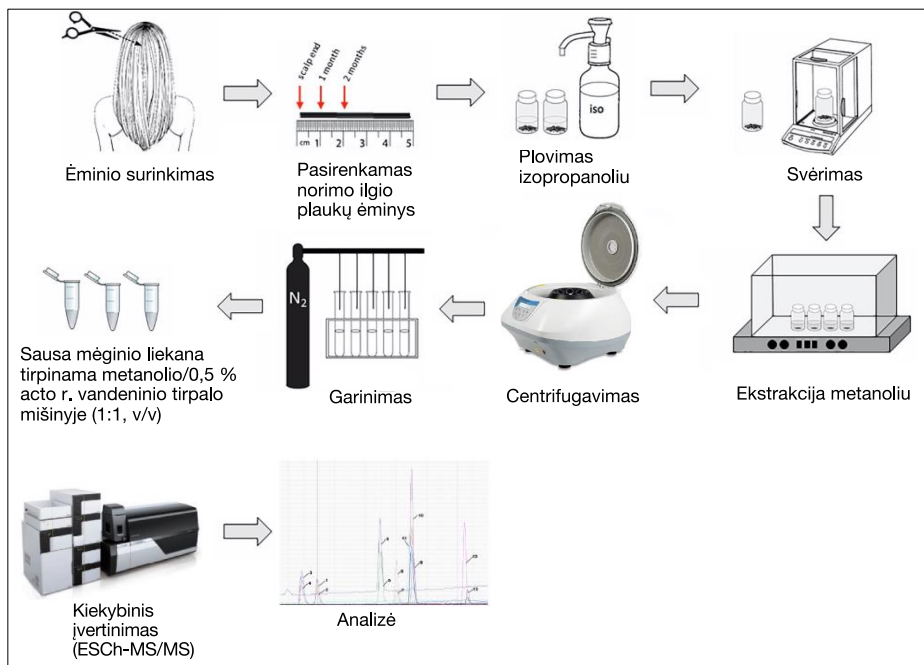
Plaukai susmulkinti žirkklėmis į nedidelius (1–2 mm) pluošteliu. Analizinėmis svarstyklėmis pasverta 20–50 mg susmulkintų plaukų, jie suberti į paruoštą vakuuminę filtravimo sistemą ir mėginys 2 kartus plautas 3 ml izopropanolio. Plaukai papildomai nusausinti azoto sraute ir perkelti į mikromėgintuvėlius. Į tokį mėginį buvo įpilama 2 ml Sorenseno buferinio tirpalo ir 10 μ l 1 μ g/ml vidinio standarto (6 α -metilprednizolono). Taip

paruoštas mėginys inkubuotas termostate 16 val. 40 °C temperatūroje. Į vakuuminę frakcijų kolektorių įstatyta kietafazės ekstrakcijos kolonėlė, frakcijos buvo renkamos į centrifuginius mėgintuvėlius. Pirmiausia, kolonėlė buvo aktyvuojama / praplaunama 3 ml metanolio, po to – 1,5 ml dejonizuoto vandens. Į taip paruoštą kolonėlę perkeltas mėginys. Analitės buvo desorbuojamos keliais skirtingais tirpikliais ar jų mišiniais šia seka:

- a) 0,5 ml dejonizuoto vandens;
- b) 0,5 ml acetono ir vandens mišinio (1:4, v/v);
- c) 0,25 ml heksano;
- d) 1,5 ml dietilo eterio (tiriamoji frakcija).

Paskutinės frakcijos eliuatas buvo sukoncentruojamas azoto sraute iki sausos liekanos. Sausa mėginio liekana ištirpinta 100 µl acetonitrilo ir vandens mišinyje (1:1, v/v), mėginys buvo perkeliamas į chromatografinį buteliuką ir analizuojamas.

Antrajame tyrime (moterų imtyje) taip pat naudoti 3 cm ilgio plaukų ėminiai, kurių paruošimas analizei atliktas pagal Wei Gao su kolegomis 2013 m. [63] straipsnyje publikuotą metodiką. Plaukai buvo perkeliama į stiklinius mėgintuvėlius ir 3 min. kambario temperatūroje plaunami 3 ml izopropanolio. Mėginiai buvo džiovinami traukos spintoje ne trumpiau nei 24 val. Analizėmis svarstyklėmis pasverta 10 mg plaukų ir mėginys perkeltas į 2 ml mikromėgintuvėlį. Į tokį mėginį įpilta 1,4 ml metanolio ir 20 µl tiriamų hormonų vidinių standartų mišinio (kortizolio-d4 – 50 ng/ml; kortizono-d8 – 50 ng/ml; progesterono-d9 – 20 ng/ml; estradiolio-d5 – 20 ng/ml; testosterono-d3 – 10 ng/ml; DHEA-d6 – 50 µg/ml, 17α-hidroksiprogesteronod8 – 10 ng/ml koncentracijos mišinyje). Taip paruoštas mėginys buvo purtomas 18 val. 1200 aps./min greičiu kambario temperatūroje ir centrifuguojamas 5 min. 10000 aps./min greičiu. Į naują mikromėgintuvėlį perkeltas supernatantas išgarintas azoto sraute iki sausos liekanos. Sausa mėginio liekana ištirpinta 200 µl metanolio ir 0,05 % acto rūgšties vandeninio tirpalo mišinyje (1:1, v/v), mėginys buvo perkeliamas į chromatografinį buteliuką ir analizuojamas (6 pav.).



6 pav. Steroidinių hormonų koncentracijos plaukuose kiekybinio įvertinimo eiga

4.3.2.3. Įranga ir matavimo sąlygos

Pirmajame tyrime (vyrų imtyje) ESCh tyrimai buvo atliekami Shimadzu Nexera X2 (*Shimadzu*, Japonija) chromatografu, sukomplektuotu iš aukšto slėgio dviejų kanalų gradientinio siurblio (sudaryto iš dviejų izokratiščių siurblių su tirpiklių pasirinkimo galimybe ir maišymo kamera), automatinės mėginio įleidimo sistemos, kolonėlių termostato ir UV/Vis detektoriaus. Įleidžiamas mėginio tūris – 10 μ l. Analizei atskirti naudota Zorbax Eclipse XDB-C8 (4,6 \times 150 mm, 5,0 μ m) kolonėlė (*Agilent*, JAV). Chromatografinė kolonėlė buvo termostatuojama 22 $^{\circ}$ C temperatūroje. Judrios fazės srauto greitis – 1,0 ml/min. Judri fazė buvo formuojama iš dviejų eliuentų: acetonitrilo ir dejonizuoto vandens, santykiu 40:60, v/v. Analizės trukmė – 20 min. Kortizolio absorbcijos signalas registruotas 245 nm bangos ilgyje. Nustatomos analitės sulaikymo trukmė – 4,12 min. Duomenys buvo apdorojami *LabSolutions* programine įranga.

Antrajame tyrime (moterų imtyje) ESCh tyrimai buvo atliekami Shimadzu Nexera CL chromatografu (*Shimadzu*, Japonija), sukomplektuotu iš aukšto slėgio dviejų kanalų gradientinio siurblio LC-30AD CL (*Shimadzu*, Japonija), automatinės mėginio įleidimo sistemos SIL-30 AC CL (*Shimadzu*, Japonija), kolonėlių termostato CTO-20AC CL (*Shimadzu*, Japonija) ir trigubo

kvadrupolio tandeminio masių spektrometro Shimadzu LCMS-8060 (*Shimadzu*, Japonija) su elektrosrauto jonizacijos (ESI) jonų šaltiniu. Įleidžiamas mėginio tūris – 10 µl. Analitėms atskirti naudota YMC-Triart Bio C4 (3,0×100 mm, 1,9 µm) kolonėlė (*YMC Co*, Japonija). Chromatografinė kolonėlė termostatuojama 50 °C temperatūroje. Judrios fazės srauto greitis – 0,4 ml/min. Judri fazė buvo formuojama iš dviejų eliuentų – 0,05 % acto rūgšties vandeninio tirpalo ir metanolio. Optimizuoti judrios fazės gradiento parametrai bei MS/MS detektavimo sąlygos pateikiamos skyriuje „Tyrimo rezultatai“. Analizės trukmė – 14 min. Duomenys buvo apdorojami *LabSolutions CL 1.20* programine įranga.

4.3.3. Biocheminiai ir hematologiniai tyrimai

Biocheminiai lipidų ir angliavandenių apykaitos rodiklių tyrimai kraujo serumo mėginiuose bei veninio kraujo tyrimas automatizuotu metodu atlikti VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centre (VšĮ VUL SK LMC). Atliktų tyrimų, taikytų analizės metodų bei naudotų analizatorių sąrašas pateikiamas 4 lentelėje.

4 lentelė. Vši VUL SK LMC Biochemijos bei Hematologijos ir bendrosios citologijos laboratorijose iširtos analizės, taikyti analizės metodai bei naudoti analizatoriai

Analitė	Metodas	Analizatorius
Bendrasis cholesterolis	Fermentinis (cholesterolio esterazės / cholesterolio oksidazės) kolorimetrinis	Architect ci8200 (Abbott, JAV)
MTL-cholesterolis	Apskaičiuota pagal Friedewaldo formulę, kai TAG ≤ 4,5 mmol/l: MTL-cholesterolis = Bendrasis cholesterolis – (TAG/5) – DTL-cholesterolis. Jei TAG > 4,5 mmol/l, taikytas selektyvaus detergento / fermentinis (cholesterolio esterazės / cholesterolio oksidazės) kolorimetrinis metodas	Architect ci8200 (Abbott, JAV)
DTL-cholesterolis	Selektyvaus detergento / fermentinis (cholesterolio esterazės / cholesterolio oksidazės) kolorimetrinis	Architect ci8200 (Abbott, JAV)
Ne DTL-cholesterolis	Apskaičiuota pagal formulę: Ne DTL-cholesterolis = Bendrasis cholesterolis – DTL-cholesterolis	
Triacilgliceroliai	Fermentinis (glicerolio 3-fosfato oksidazės) kolorimetrinis	Architect ci8200 (Abbott, JAV)
Apolipoproteinas A1	Imunonefelometrinis	BN II (Siemens, Vokietija)
Apolipoproteinas A2	Imunonefelometrinis	BN II (Siemens, Vokietija)
Apolipoproteinas B	Imunonefelometrinis	BN II (Siemens, Vokietija)
Apolipoproteinas E	Imunonefelometrinis	BN II (Siemens, Vokietija)
Gliukozę	Fermentinis (heksokinazės / gliukozės 6-fosfato dehidrogenazės) kolorimetrinis	Architect ci8200 (Abbott, JAV)
CRB	Imunoturbidimetrinis	Architect ci8200 (Abbott, JAV)
Veninio kraujo tyrimas		Sysmex XE-5000 (Sysmex Corporation, Japonija)

Santrumpos: MTL – mažo tankio lipoproteinai, DTL – didelio tankio lipoproteinai, ne DTL – ne didelio tankio lipoproteinai, TAG – triacilgliceroliai, CRB – C reaktyvusis baltymas

4.3.4. Ciklofilino A koncentracijos nustatymas

Ciklofilino A (CypA) koncentracija kraujo serume nustatyta IFA metodu naudojant Gemini (*Stratec*, Vokietija) analizatorių. CypA koncentracijai nustatyti naudotas „Human CYPA (Cyclophilin A) ELISA Kit“ (*Elabscience*, Kinija) reagentų rinkinys, tyrimai buvo atlikti pagal gamintojo pateiktas rekomendacijas. CypA aptikimo riba – 0,75 ng/ml, nustatymo riba – 1,25 ng/ml, variacijos koeficientas – <10 %.

4.3.5. Oksidacinio streso žymenų tyrimai

Malono dialdehido (MDA) koncentracija kraujo serume nustatyta pagal G. A. Khoshsorur'o su kolegomis 2000 m. [87] straipsnyje publikuotą metodiką. Metodo principas – rūgštinėje terpėje 100 °C temperatūroje viena molekulė MDA reaguoja su dviem molekulėmis tiobarbitūrinės rūgšties (TBA), susidarant MDA-TBA₂ kompleksui. Pastarasis nustatomas ir MDA koncentracija įvertinama taikant ESCh-FLU metodą. Fluorescencinio detektoriaus sužadinimo bangos ilgis – 527 nm, detekcijos – 551 nm. MDA-TBA₂ junginio sulaukymo trukmė – 1,63 min. Duomenys buvo apdorojami *LabSolutions* programine įranga.

Antioksidacinio aktyvumo tyrimui taikytas elektronų pernaša pagrįstas FRAP (angl. *ferric reducing ability of plasma*) metodas, aprašytas I. F. F. Benzie ir J. J. Strain'o 1996 m. [88] publikuotame straipsnyje. Metodo principas – kraujyje esančių antioksidantų vykdoma geležies 2,4,6-tripiridil-s-triazino ([Fe(III)-(TPTZ)₂]³⁺ komplekso redukcija iki intensyviai mėlynos spalvos [Fe(II)-(TPTZ)₂]²⁺ komplekso, kuris identifiкуotas spektrofotometru Shimadzu UV-1601 (*Shimadzu Corp.*, Japonija) matuojant sugertį ties 593 nm bangos ilgiu. Gautos reikšmės lygintos su standartiniais divalentės geležies jonų tirpalais ir apskaičiuotos FRAP vertės, kurios buvo išreikštos μmol Fe²⁺/l.

Malono dialdehido bei FRAP tyrimus kraujo serume atliko dr. Aušra Linkevičiūtė-Dumčė.

4.3.6. Trombocitų funkcinio aktyvumo tyrimai

Trombocitų funkcinio aktyvumo tyrimai atlikti tėkmės citometrijos metodu naudojant BD FACSCanto tėkmės citometrą (*BD Biosciences*, JAV). Pagal priekinę ir šoninę šviesos sklaidas bei naudojant su fluorochromais konjuguotus monokloninius antikūnus CD61-APC (antikūnai prieš integriną β3) ir CD42a-PerCP-Cy5.5 (antikūnai prieš glikoproteiną IX) buvo identifiкуoti trombocitai. Trombocitų funkcinis aktyvumas vertintas po

stimuliacijos agonistais adenozino difosfatu (ADP) ir trombino receptorių aktyvinančiu peptidu (TRAP): aktyvumui įvertinti buvo naudojami CD63-PE (antikūnai prieš trombocitų α granulių integriną) bei PAC-1-FITC (antikūnai prieš trombocitų aktyvacijos kompleksą) monokloniniai antikūnai. Analizuojant rezultatus vertinta, kiek trombocitų savo paviršiuje prisijungė atitinkamus antikūnus (CD63-PE, PAC-1-FITC) prieš tirtus žymenis. Gauti rezultatai išreikšti procentine išraiška. Duomenys buvo apdorojami *BD FACS Diva* (6.1.2 versija) programine įranga. Trombocitų funkcinio aktyvumo tyrimus atliko doktorantas Mantas Radzevičius.

4.3.7. Statistinė analizė

Duomenų statistinė analizė atlikta naudojantis R programiniu paketu (versija 4.0.3). Tolydžiųjų kintamųjų pasiskirstymo pagal normalųjį skirstinį hipotezė buvo tikrinama naudojant Šapiro–Vilko kriterijų. Normaliai pasiskirstę tolydieji kintamieji išreikšti vidurkiu \pm standartiniu nuokrypiu, o ne pagal normalųjį skirstinį pasiskirstę kintamieji išreikšti mediana ir tarpkvartiliniu pločiu (IQR). Kokybiniai kintamieji išreikšti absoliučiais skaičiais ir procentine dalimi. Kintamųjų ryšio stiprumas vertintas apskaičiavus Spirmeno (kai duomenys pasiskirstę ne pagal normalųjį dėsnį) arba Pirsono (kai duomenys pasiskirstę pagal normalųjį dėsnį) koreliacijos koeficientus (r). Ryšys vertintas kaip labai silpnas ($r \leq 0,19$), silpnas ($0,20 \leq r \leq 0,39$), vidutinis ($0,40 \leq r \leq 0,69$), stiprus ($0,70 \leq r \leq 0,89$) ir labai stiprus ($0,90 \leq r \leq 1,00$). Kiekybinių kintamųjų vidurkių ar medianų skirtumai tarp dviejų grupių buvo lyginami taikant Stjudento t testą (kai duomenys pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį) arba Mano–Vitnio–Vilkoksono rangų sumų kriterijų (kai duomenys pasiskirstę ne pagal normalųjį skirstinį). Kiekybinių kintamųjų medianų skirtumai tarp dviejų ar daugiau grupių buvo lyginami taikant Kruskalo–Voliso ranginį kriterijų, daugkartiniams poriniams palyginimams naudotas Duno testas su Bonferonio korekcija. Kokybinių kintamųjų nepriklausomumas tikrintas pasitelkiant Chi kvadrato (χ^2) arba Fišerio tikslųjį kriterijų. Metabolinio sindromo išsivystymo rizika buvo vertinama taikant binarinės vienalypės ir daugialypės logistinės regresijos modelius. Visiems skaičiavimams naudojamas reikšmingumo lygmuo $\alpha < 0,05$.

5. TYRIMO REZULTATAI

5.1. Steroidinių hormonų koncentracijos plaukuose nustatymo metodikos įdiegimas

Pirmajame tyrime (vyrų imtyje) kortizolio koncentracijai plaukuose nustatyti taikytas ESCh-UV/Vis metodas. Kortizolio kalibracinės kreivės tiesiškumo intervalas buvo matuojamas su septyniomis skirtingomis analizės koncentracijomis intervale nuo 5 ng/ml iki 150 ng/ml. Apskaičiuotas koreliacijos koeficientas (r^2) kortizoliui lygus 0,9998. Aptikimo riba – 15,6 ng/ml, nustatymo riba – 47,2 ng/ml. Antrajame tyrime (moterų imtyje), siekiant patikimai kiekybiškai įvertinti ne tik kortizolio, bet ir kitų steroidinių hormonų (kortizono, dehidroepiandrosterono, testosterono, progesterono, 17α -hidroksiprogesterono, estradiolio) koncentracijas, įdiegtas ESCh-MS/MS metodas. Tolesniuose poskyriuose pateikiamos optimizuotos chromatografinio atskyrimo ir MS/MS detektavimo sąlygos bei pagrindinės metodo analizinės charakteristikos.

5.1.1. Chromatografinio atskyrimo ir MS/MS detektavimo sąlygų optimizavimas

Optimizuojant chromatografinio atskyrimo sąlygas ir atsižvelgiant į gerą skiriamąją gebą, priimtinas sulaikymo trukmės bei smailių simetriškumą pasirinktas gradientinis režimas. Optimizuoti judrios fazės gradiento parametrai pateikiami 5 lentelėje.

5 lentelė. Judrios fazės gradiento formavimo parametrai

Trukmė, min	Metanolis, %	0,05 % acto rūgšties vandeninis tirpalas, %
0	40	60
0,50	40	60
8,00	80	20
9,00	100	0
10,00	100	0
11,00	40	60
14,00	40	60

Nustačius chromatografinio atskyrimo sąlygas buvo registruoti kortizolio, kortizono, DHEA, testosterono, progesterono, 17α -hidroksiprogesterono, estradiolio bei šių medžiagų deuteruotų analogų (kortizolis- d_4 , kortizonas- d_8 , progesteronas- d_9 , DHEA- d_6 , estradiolis- d_5 , testosterono- d_3) standartinių

tirpalų masių spektrai esant teigiamai elektrosrauto jonizacijai (ESI, angl. *electrospray ionization*) ir parinktos optimalios MS/MS detektavimo sąlygos tiriamoms analitėms ir jų vidiniams standartams. MS/MS detektavimui buvo pasirinktas jautriausias daugialypių reakcijų stebėjimo (MRM, angl. *multiple reaction monitoring*) režimas. Trigubo kvadrupolio masių analizatoriaus parametrai buvo optimizuoti tiesiogiai įleidžiant 10 µg/ml koncentracijos analičių standartus. Steroidinių hormonų pilno skenavimo masių spektruose kiekvienai analitei buvo identifikuoti intensyviausi protonizuoti $[M+H]^+$ jonai, kurie buvo izoliuoti pirmajame kvadrupolyje, suskaldyti skaldymo celėje, o fragmentai išanalizuoti trečiuoju kvadrupoliu. Tokiu būdu kiekvienai analitei buvo nustatyti: pirmtako molekulinis jonas ir du intensyviausiais signalais pasižymintys fragmentai – vienas kiekybinei analizei, o kitas patvirtinimui, 1-ojo kvadrupolio potencialų skirtumo įtampa, skaldymo energija bei 2-ojo kvadrupolio potencialų skirtumo įtampa.

Optimizuoti ESI jonų šaltinio parametrai pateikiami 6 lentelėje. Pagrindiniai ESCh ir MS/MS detektavimo parametrai 2-ajame tyrime (moterų imtyje) tirtiems steroidiniams hormonams pateikiami 7 lentelėje.

6 lentelė. Optimizuoti ESI jonų šaltinio parametrai

Parametras	Skaitinė vertė
Kapiliaro įtampa, kV	4,0
Dujų užsklandos temperatūra, °C	400
Išgarinimo kapiliaro temperatūra, °C	250
Išpurškimo dujų srautas, l/min	3
Džiovinimo dujų srautas, l/min	7
Užsklandos dujų srautas, l/min	12
Fragmentacijos dujų slėgis, kPa	270

7 lentelė. ESCh ir MS/MS detektavimo parametrai tirtiems steroidiniams hormonams

Junginys	Molekulinis jonas, m/z	Skilimai, m/z	1-ojo kvadrupolio potencialų skirtumo įtampa, V	Skaldymo energija, eV	2-ojo kvadrupolio potencialų skirtumo įtampa, V	Sulaikymo trukmė, min
Kortizolis*	363,20	363,20→121,10 (intensyvesnis) 363,20→105,05 (mažiau intensyvus)	-14,0 -27,0	-25,0 -50,0	-11,0 -18,0	3,23
Kortizolis-d4	367,20	367,20→121,15	-14,0	-25,0	-11,0	3,23
Kortizonas*	361,20	361,20→163,25 (intensyvesnis) 361,20→91,10 (mažiau intensyvus)	-14,0	-55,0	-16,0 -15,0	3,00
Kortizonas-d8	369,20	369,20→169,25	-27,0	-26,0	-20,0	3,00
DHEA*	271,00	271,00→253,15 (intensyvesnis) 271,00→213,25 (mažiau intensyvus)	-11,0	-15,0 -18,0	-25,0 -13,0	4,97
DHEA-d6	277,10	259,30→259,30	-11,0	-15,0	-16,0	4,97
Testosteronas*	289,10	289,10→97,05 (intensyvesnis) 289,10→109,15 (mažiau intensyvus)	-22,0 -12,0	-24,0 -25,0	-16,0 -18,0	4,77
Testosteronas-d3	292,10	292,10→97,10	-19,0	-24,0	-22,0	4,77

7 lentelė (tęsinys). ESCh ir MS/MS detektavimo parametrai tirtiems steroidiniams hormonams

Junginys	Molekulinis jonas, m/z	Skilimai, m/z	1-ojo kvadrupolio potencialų skirtumo įtampa, V	Skaldymo energija, eV	2-ojo kvadrupolio potencialų skirtumo įtampa, V	Sulaikymo trukmė, min
17 α -hidroksiprogesteronas*	331,10	331,10→97,05 (intensyvesnis)	-13,0	-25,0	-16,0	5,05
		331,10→109,10 (mažiau intensyvus)	-13,0	-28,0	-19,0	
17 α -hidroksiprogesteronas-d8	339,20	339,20→100,15	-27,0	-26,0	-22,0	5,05
Progesteronas*	315,00	315,00→97,05 (intensyvesnis)	-12,0	-23,0	-16,0	5,83
		315,00→109,05 (mažiau intensyvus)	-12,0	-26,0	-18,0	
Progesteronas-d9	324,20	324,20→100,15	-24,0	-26,0	-20,0	5,83
Estradiolis*	255,10	255,10→144,05 (intensyvesnis)	-10,0	-38,0	-14,0	4,59
		255,10→159,10 (mažiau intensyvus)	-10,0	-19,0	-15,0	
Estradiolis-d5	260,10	260,10→161,25	-20,0	-19,0	-29,0	4,59

*Matuojami du produkto molekuliniai jonai: intensyvesnis – kiekybiniam įvertinimui, mažiau intensyvus – patvirtinimui.

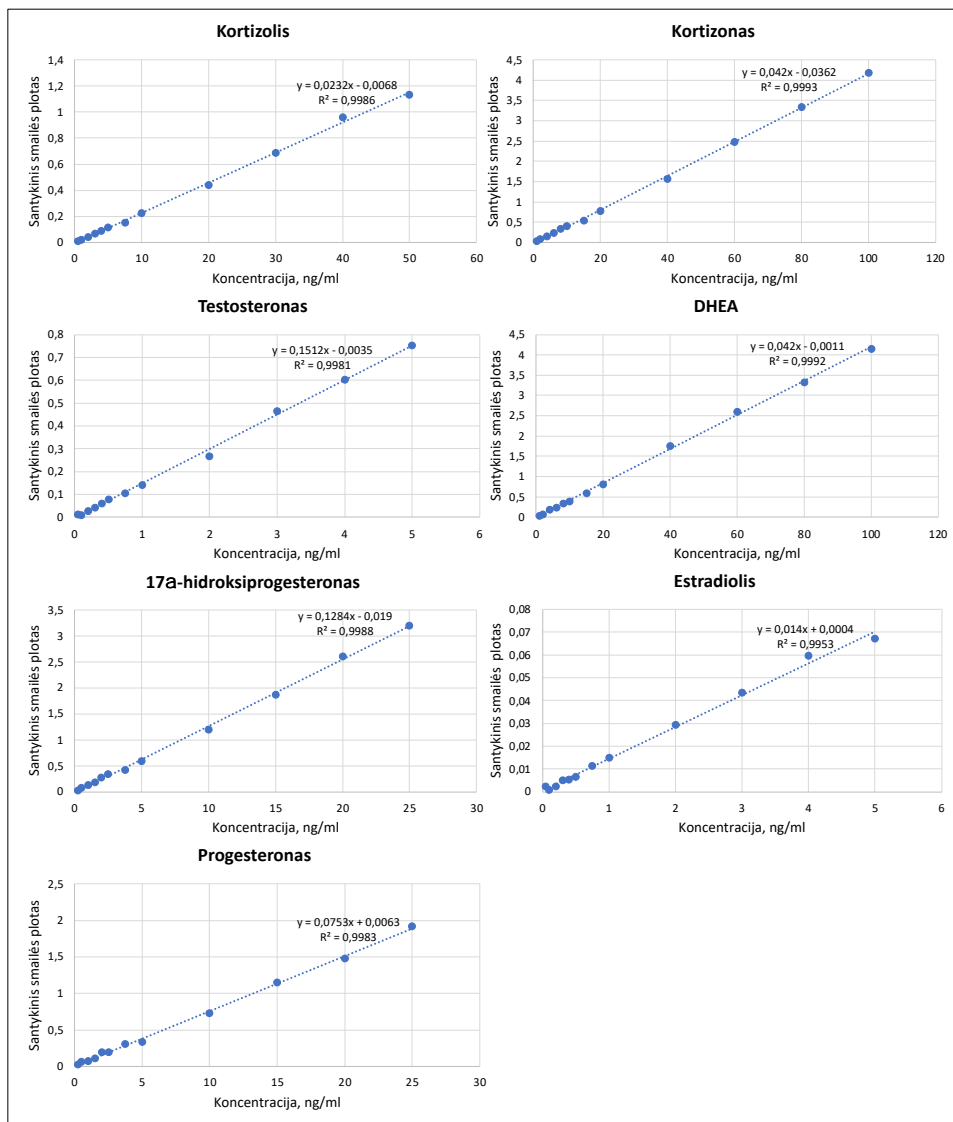
5.1.2. Metodo tinkamumo įvertinimas

Siekiant patvirtinti metodo tinkamumą įvertintos pagrindinės analizės charakteristikos: kalibracinės kreivės tiesiškumas, aptikimo riba (LoD) ir nustatymo riba (LoQ). LoD nurodo mažiausią analitės koncentraciją mėginyje, kurią galima aptikti kokybiškai, t. y. ji nustatoma, kai analitės signalo ir fono triukšmų santykis yra lygus 3. LoQ nurodo mažiausią analitės koncentraciją mėginyje, kurią galima įvertinti kiekybiškai, t. y. kai analitės signalo ir fono triukšmų santykis yra lygus 10. Kalibracinių kreivių tiesiškumo intervalai buvo matuojami su 12 skirtingų analitės koncentracijų intervale nuo 1 ng/ml iki 100 ng/ml (kortizonas, DHEA), nuo 0,5 ng/ml iki 50 ng/ml (kortizolis), nuo 0,05 ng/ml iki 5 ng/ml (estradiolis, testosteronas), nuo 0,25 ng/ml iki 25 ng/ml (17 α -hidroksiprogesteronas, progesteronas). Visi analizuoti junginiai parodė gerą tiesiškumą matuotame koncentracijų intervale ($r^2 > 0,998$). Pagrindinės nustatytos analizinės charakteristikos pateikiamos 8 lentelėje, o tirtų steroidinių hormonų kalibracinės kreivės vaizduojamos 7 paveiksle.

8 lentelė. Pagrindinės analizinės charakteristikos

Analitė	Tiesės lygtis	r^2	LoD, ng/ml	LoQ, ng/ml
Kortizolis	$y = 0,0232x - 0,0068$	0,9986	0,4	0,9
Kortizonas	$y = 0,042x - 0,0362$	0,9993	0,2	0,5
DHEA	$y = 0,042x - 0,0011$	0,9992	1,8	6,0
Testosteronas	$y = 0,1512x - 0,0035$	0,9981	0,2	0,6
17 α - hidroksiprogesteronas	$y = 0,1284x - 0,019$	0,9988	0,3	0,6
Progesteronas	$y = 0,0753x + 0,0063$	0,9983	0,1	0,3
Estradiolis	$y = 0,014x + 0,0004$	0,9953	0,2	0,6

Santrumpos: LoD – aptikimo riba, LoQ – nustatymo riba



7 pav. Steroidinių hormonų kalibracinės kreivės

5.2. Širdies ir kraujagyslių ligų rizikos tyrimas vyrų imtyje

5.2.1. Tiriamųjų charakteristika

Tiriamųjų imtį sudarė 163 jauni ir vidutinio amžiaus (mediana (IQR) – 39 (16,5) metai) vyrai. Dauguma tiriamųjų buvo vedę ar turintys sugyventinę, nedirbantys papildomo ar naktinio darbo bei turintys aukštąjį ar aukštesnįjį išsilavinimą. Didžioji dalis asmenų teigė, jog yra nerūkantys, daugiau nei pusė tiriamųjų dirba sėdimą darbą, tačiau laisvalaikiu užsiima lengva ar sunkesne

fizine veikla. Tiriamųjų sociodemografiniai ir gyvenamosios veiksniai pateikiami 9 lentelėje.

9 lentelė. ATEROSTRES projekto dalyvių sociodemografiniai ir gyvenamosios veiksniai

Rodiklis	Mediana	IQR
Amžius (metai)	39	16,5
Rodiklis	Tiriamųjų skaičius (%)	
Išsilavinimas¹		
Vidurinis / profesinis	9 (5,6)	
Aukštasis / aukštesnysis	151 (94,4)	
Civilinė padėtis¹		
Vedęs / turi sugyventinę	115 (71,9)	
Nevedęs / išsiskyręs / našlys	45 (28,1)	
Papildomas darbas¹		
Dirba papildomą darbą	39 (24,4)	
Nedirba papildomo darbo	121 (75,6)	
Naktinis darbas¹		
Dirba naktinį darbą	20 (12,5)	
Nedirba naktinio darbo	140 (87,5)	
Rūkymas¹		
Rūko	27 (16,9)	
Nerūko	133 (83,1)	
Fizinis aktyvumas darbe¹		
Sėdimas darbas	111 (69,4)	
Vaikščiojimas	38 (23,8)	
Sunkesnis fizinis darbas	10 (6,2)	
Sunkus fizinis darbas	1 (0,6)	
Fizinis aktyvumas laisvalaikiu²		
Nejudra	29 (18,3)	
Vaikščiojimas	77 (48,4)	
Sunkesnės fizinės treniruotės	39 (24,5)	
Sunkios fizinės treniruotės	14 (8,8)	

¹n=160, ²n=159

Tiriamųjų klinikiniai duomenys ir šiame tyrime analizuotų laboratorinių rodiklių rezultatai pateikiami 10 lentelėje.

10 lentelė. ATEROSTRES projekto dalyvių klinikiniai duomenys ir laboratorinių tyrimų rezultatai

Rodiklis	Vidurkis±SN mediana (IQR)	ar	Mažiausia vertė	Didžiausia vertė
KMI (kg/m ²)	25,04 (4,75)		16,95	45,40
Liemens apimtis (cm)	89 (15)		69	141
SKS (mmHg)	129 (16,5)		93	175
DKS (mmHg)	76 (13)		57	104
ŠSD (k./min)	63 (14)		40	94
Gliukozė (mmol/l)	5,24 (0,52)		4,15	7,61
Bendrasis cholesterolis (mmol/l)	5,02 (1,39)		3,04	8,73
DTL-cholesterolis (mmol/l)	1,19 (0,33)		0,58	2,21
MTL-cholesterolis (mmol/l)	3,11 (1,17)		1,56	5,95
Ne DTL-cholesterolis (mmol/l)	3,78 (1,49)		1,99	7,61
TAG (mmol/l)	1,17 (0,86)		0,41	9,94
Kortizolis plaukuose (ng/g)	46,18 (119,29)		0,63	858,31
CRB (mg/l)	0,64 (0,96)		0,10	31,00
CypA (ng/ml)	43,52 (60,20)		0,33	81,00
Leukocitai (10 ⁹ /l)	5,47 (1,52)		2,82	9,45
Neutrofilai (10 ⁹ /l)	2,50 (1,02)		1,09	6,73
Limfocitai (10 ⁹ /l)	2,09 (0,84)		0,84	4,05
Monocitai (10 ⁹ /l)	0,49 (0,21)		0,25	1,49
Neutrofilai (%)	47,96±8,33		29,18	73,31
Limfocitai (%)	38,91± 8,13		14,27	59,2
Monocitai (%)	9,24±2,11		5,50	19,33
MDA (µg/l)	97,48 (35,62)		56,03	251,42
FRAP (µmol Fe ²⁺ /l)	47,67 (11,41)		28,50	79,98
CD63+ su TRAP (%)	28,85 (21,05)		0,40	69,20
PAC-1+ su ADP (%)	49,40 (37,20)		0,10	90,20

Santrumpos: SN – standartinis nuokrypis, IQR – tarpkvartilinis plotis, KMI – kūno masės indeksas, SKS – sistolinis kraujo spaudimas, DKS – diastolinis kraujo spaudimas, ŠSD – širdies susitraukimų dažnis, DTL – didelio tankio lipoproteinai, MTL – mažo tankio lipoproteinai, ne DTL – ne didelio tankio lipoproteinai, TAG –

triacilgliceroliai, CRB – C reaktyvusis baltymas, CypA – ciklofilinas A, MDA – malono dialdehidai, FRAP – geležies redukcijos antioksidacinė galia (angl. *ferric reducing ability of plasma*), CD63+ su TRAP – trombocitų dalis, ekspresuojanti CD63 žymenį po stimuliacijos su TRAP, PAC-1+ su ADP – trombocitų dalis, ekspresuojanti PAC-1 žymenį po stimuliacijos su ADP.

5.2.2. Širdies ir kraujagyslių ligų rizikos vertinimas ir sąsaja su kortizolio koncentracija plaukuose

Mažas fizinis aktyvumas ir rūkymas yra pagrindiniai gyvensenos veiksniai, susiję su didesne ŠKL rizika. Pagal 4.3.1 poskyryje aprašytą metodiką įvertintas bendrasis tiriamųjų fizinis aktyvumas. Nustatyta, jog 47,8 % tiriamųjų būdingas žemas bendrasis fizinio aktyvumo lygis, o 52,2 % tyrimo dalyvių – aktyvesnis gyvenimo būdas. Analizuojant kortizolio koncentracijos plaukuose medianų skirtumus tarp rūkančių ir nerūkančių asmenų bei žemesniu ir aukštesniu fizinio aktyvumo lygiu pasižyminčių tiriamųjų, statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta (atitinkamai 64,69 (130,74) ng/g vs. 39,82 (102,50) ng/g, $p = 0,113$ ir 33,57 (108,35) ng/g vs. 54,90 (106,94) ng/g, $p = 0,116$).

Tiriamieji buvo suskirstyti į grupes pagal rekomenduojamas antropometrinių (KMI, liemens apimties), arterinio kraujo spaudimo (SKS, DKS), lipidų apykaitos (MTL-cholesterolio, ne DTL-cholesterolio, TAG koncentracijas kraujo serume) rodiklių vertes naudojantis 2021 m. publikuotomis Europos kardiologų draugijos širdies ir kraujagyslių ligų prevencijos klinikinėje praktikoje gairėmis [5]. Kortizolio koncentracijos plaukuose palyginimas tarp tiriamųjų grupių, sudarytų pagal minėtų rodiklių vertes, pateikiamas 11 lentelėje.

11 lentelė. Kortizolio koncentracijos plaukuose palyginimas tarp ŠKL rizikos veiksnių turinčių ir jų neturinčių tiriamųjų

Rodiklis	Tiriamųjų skaičius	Kortizolio koncentracija (ng/g) (mediana (IQR))	p reikšmė
KMI (kg/m²)			
18,5–24,9	80	32,13 (83,25)	
25,0–29,9	57	54,68 (147,16)	0,052*
≥30,0	26	74,69 (101,85)	
Liemens apimtis (cm)			
<94	101	34,98 (88,41)	0,007**
≥94	61	77,16 (152,14)	
SKS (mmHg)			
<140	131	39,86 (118,21)	0,253**
≥140	32	52,48 (105,08)	
DKS (mmHg)			
<90	144	39,22 (112,68)	0,027**
≥90	19	93,17 (101,17)	
TAG (mmol/l)			
<1,70	120	44,38 (117,32)	0,306**
≥1,70	43	54,68 (119,88)	
MTL-cholesterolis (mmol/l)			
<2,60	38	34,09 (72,67)	0,029**
≥2,60	125	51,66 (136,15)	
Ne DTL-cholesterolis (mmol/l)			
<3,40	58	36,11 (85,49)	0,025**
≥3,40	105	54,68 (134,98)	

*Kruskalo–Voliso ranginis kriterijus, **Mano–Vitnio–Vilkoksono rangų sumų kriterijus

Santrumpos: KMI – kūno masės indeksas, SKS – sistolinis kraujo spaudimas, DKS – diastolinis kraujo spaudimas, TAG – triacilgliceroliai, MTL – mažo tankio lipoproteinai, ne DTL – ne didelio tankio lipoproteinai.

Iš 11 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad statistiškai reikšmingi kortizolio koncentracijos plaukuose medianų skirtumai nustatyti lyginant tiriamųjų grupes, sudarytas pagal rekomenduojamas liemens apimties, diastolinio kraujo spaudimo, MTL-cholesterolio ir ne DTL-cholesterolio vertes. Nustatyta, kad tiriamiesiems, turintiems didesnes nei rekomenduojama

minėtų rodiklių vertes, būdingos statistiškai reikšmingai didesnės kortizolio koncentracijos plaukuose medianų vertės. Analizuojant kortizolio koncentracijos plaukuose skirtumus tarp tiriamųjų, suskirstų į grupes pagal kūno masės indekso, sistolinio kraujo spaudimo vertes bei triacilglicerolių koncentraciją kraujo serume, statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta.

Nagrinėjant sąsajas tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir tiriamųjų klinikinių ir laboratorinių tyrimų rodiklių, nustatyti silpni, tačiau statistiškai reikšmingi tiesioginiai ryšiai tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir KMI, liemens apimties, sistolinio bei diastolinio kraujo spaudimo, gliukozės, bendrojo cholesterolio, MTL-cholesterolio, ne DTL-cholesterolio koncentracijų kraujo serume ir neutrofilų absoliučios skaitinės vertės ir procentinės dalies kraujyje bei atvirkštinis ryšys tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir limfocitų procentinės dalies kraujyje (12 lentelė).

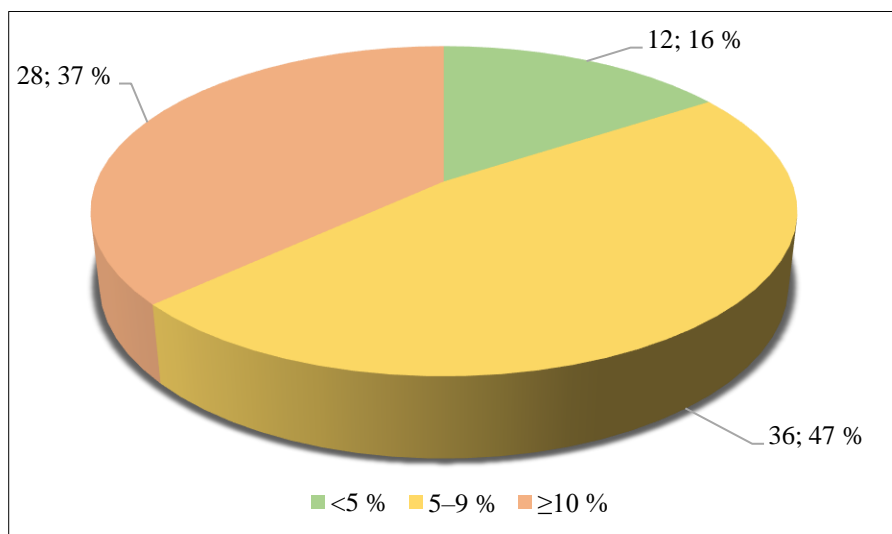
12 lentelė. Ryšys tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir antropometrinių, lipidų ir angliavandenių apykaitos, uždegimo, oksidacinio streso ir trombocitų aktyvacijos biožymenų

Rodiklis	r_s	p reikšmė
KMI (kg/m ²)	0,217	0,005
Liemens apimtis (cm)	0,211	0,007
SKS (mmHg)	0,339	9,55 × 10⁻⁶
DKS (mmHg)	0,320	3,05 × 10⁻⁵
ŠSD (k./min)	0,092	0,242
Gliukozė (mmol/l)	0,156	0,046
Bendrasis cholesterolis (mmol/l)	0,221	0,005
DTL-cholesterolis (mmol/l)	-0,026	0,746
MTL- cholesterolis (mmol/l)	0,226	0,004
Ne DTL- cholesterolis (mmol/l)	0,209	0,007
TAG (mmol/l)	0,115	0,144
CRB (mg/l)	0,108	0,171
CypA (ng/ml)	0,090	0,260
Leukocitai (10 ⁹ /l)	0,089	0,262
Neutrofilai (10 ⁹ /l)	0,176	0,026
Limfocitai (10 ⁹ /l)	-0,094	0,238
Monocitai (10 ⁹ /l)	0,155	0,050
Neutrofilai (%)	0,197	0,012
Limfocitai (%)	-0,217	0,006
Monocitai (%)	0,093	0,240
MDA (μg/l)	0,087	0,301
FRAP (μmol Fe ²⁺ /l)	0,102	0,203
CD63+ su TRAP (%)	0,066	0,416
PAC-1+ su ADP (%)	-0,018	0,840

Santrumpos: r_s – Spirmeno koreliacijos koeficientas, KMI – kūno masės indeksas, SKS – sistolinis kraujo spaudimas, DKS – diastolinis kraujo spaudimas, ŠSD – širdies susitraukimų dažnis, DTL – didelio tankio lipoproteinai, MTL – mažo tankio lipoproteinai, ne DTL – ne didelio tankio lipoproteinai, TAG – triacilgliceroliai, CRB – C reaktyvusis baltymas, CypA – ciklofilinas A, MDA – malono dialdehidai, FRAP – geležies redukcijos antioksidacinė galia (angl. *ferric reducing ability of plasma*), CD63+ su TRAP – trombocitų dalis, ekspresuojanti CD63 žymenį po stimuliacijos su TRAP, PAC-1+ su ADP – trombocitų dalis, ekspresuojanti PAC-1 žymenį po stimuliacijos su ADP.

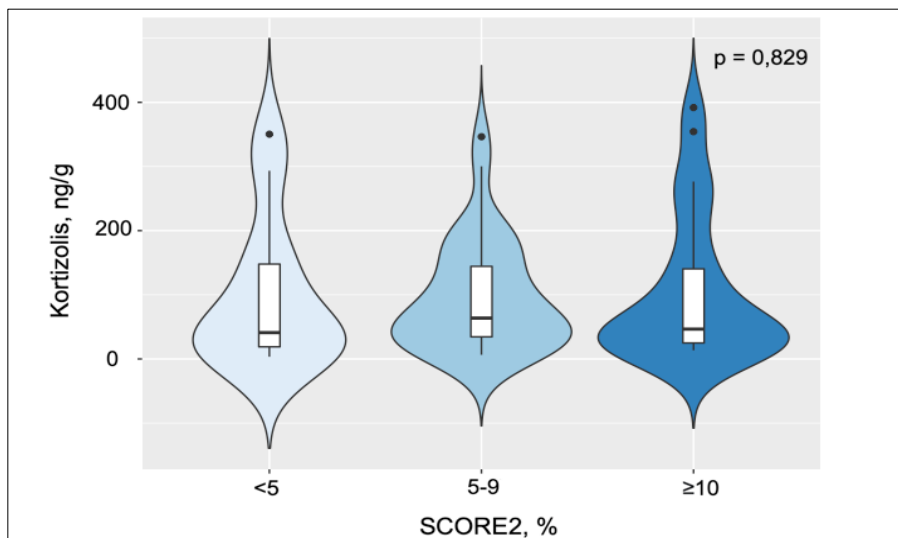
Tolesnei analizei tyrimo dalyviai suskirstyti į dvi amžiaus grupes: 25–39 m. ir 40–54 m. amžiaus. Pirmajai amžiaus grupei (25–39 m.) priskirti 84 (51,53 %) tiriamieji, antrajai grupei (40–54 m.) – 79 (48,47 %) tiriamieji. Vyresniems (40–54 m.) asmenims apskaičiuotas SCORE2 įvertis, nurodantis absoliučiąją riziką per 10 metų išsivystyti širdies ir kraujagyslių ligai. SCORE2 įvertis apskaičiuotas 76 tiriamiesiems, nes 3 asmenys nepateikė informacijos apie rūkymo įpročius. Nustatyta, jog SCORE2 įverčio mediana (IQR) yra 6 (5) %, minimali vertė – 3 %, maksimali vertė – 19 %.

Suskirsčius tyrimo dalyvius į grupes pagal SCORE2 indekso vertę nustatyta, jog 15,79 % tiriamųjų SCORE2 įvertis yra <5 %, 47,37 % asmenų SCORE2 yra 5–9 %, o 36,84 % tiriamųjų SCORE2 \geq 10 % (8 pav.).



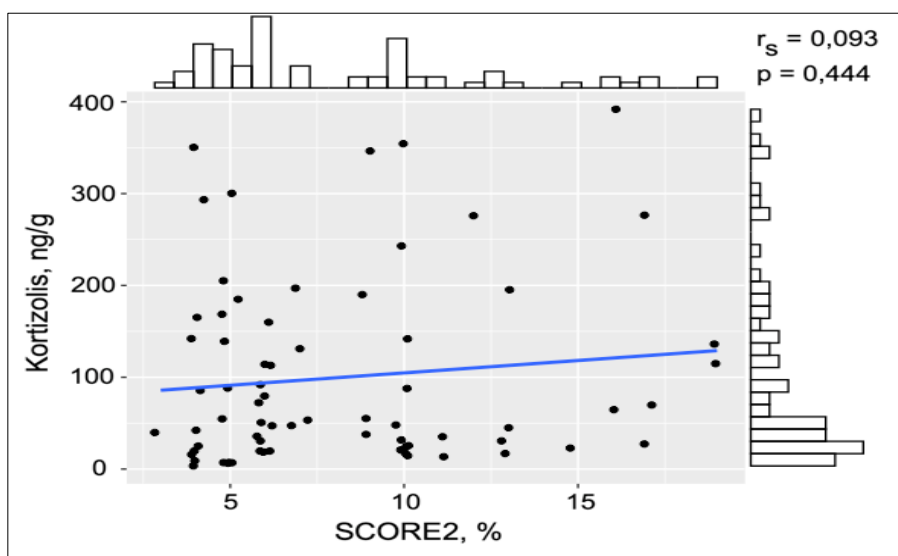
8 pav. Tiriamųjų pasiskirstymas pagal SCORE2 indekso vertes

Lyginant vyrų, kurių SCORE2 vertė yra <5 %, 5–9 %, \geq 10 %, kortizolio koncentracijos plaukuose medianas (IQR), statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta (atitinkamai 41,04 (129,02) ng/g, 63,69 (109,87) ng/g, 46,54 (115,50) ng/g, $p = 0,829$) (9 pav.).



9 pav. Kortizolio koncentracijos plaukuose palyginimas tarp skirtingą SCORE2 įvertį turinčių asmenų

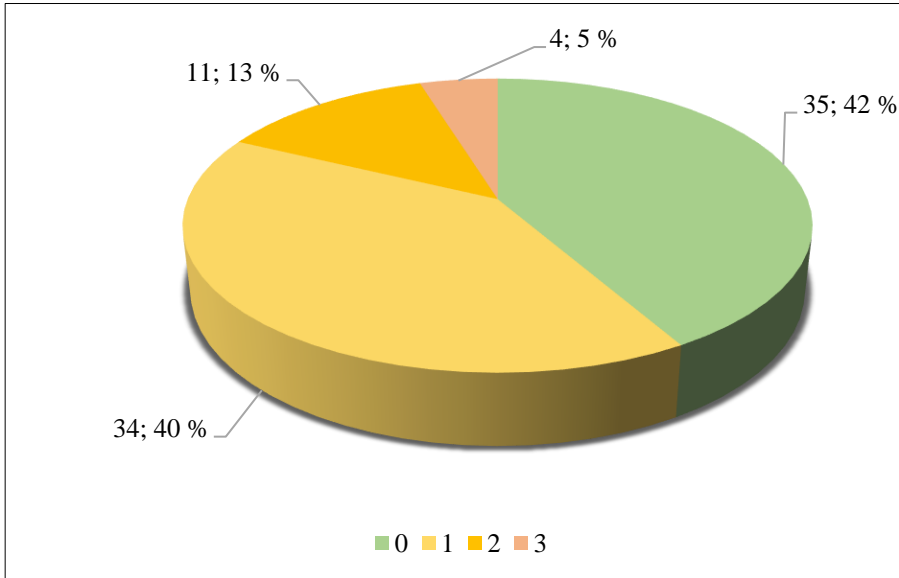
Statistiškai reikšmingo ryšio tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir SCORE2 įverčio taip pat nenustatyta ($r_s = 0,093$, $p = 0,444$) (10 pav.).



10 pav. Ryšys tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir SCORE2 įverčio

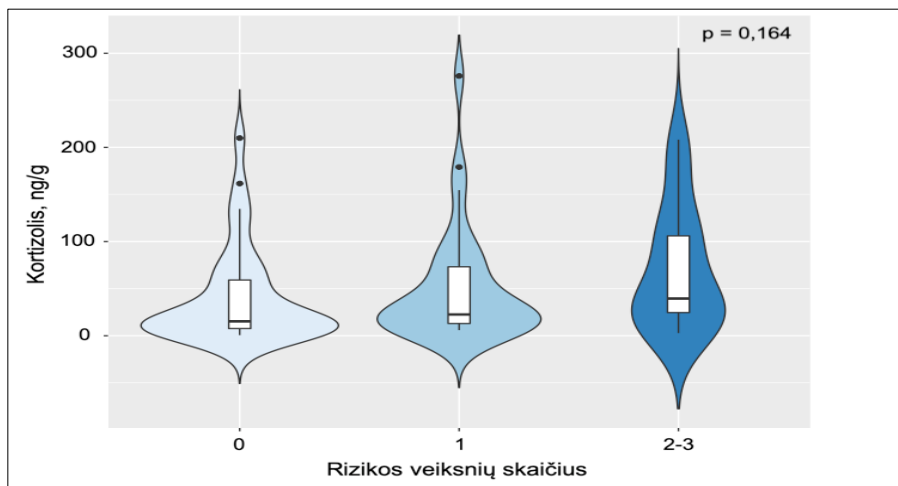
Antrosios amžiaus grupės (25–39 m.) tiriamiesiems įvertintas ŠKL rizikos veiksnių skaičius – pasirinkti rodikliai, įeinantys į SCORE2 įverčio skaičiavimo metodiką (rūkymas, ne DTL-cholesterolis >3,4 mmol/l, SKS

≥140). Nustatyta, jog analizuojamų ŠKL rizikos veiksnių neturi 42,17 % tiriamųjų, vienas rizikos veiksnys būdingas 39,76 % asmenų, du rizikos veiksniai – 13,25 % tyrimo dalyvių, o trys rizikos veiksniai – tik 4,82 % asmenų (11 pav.).



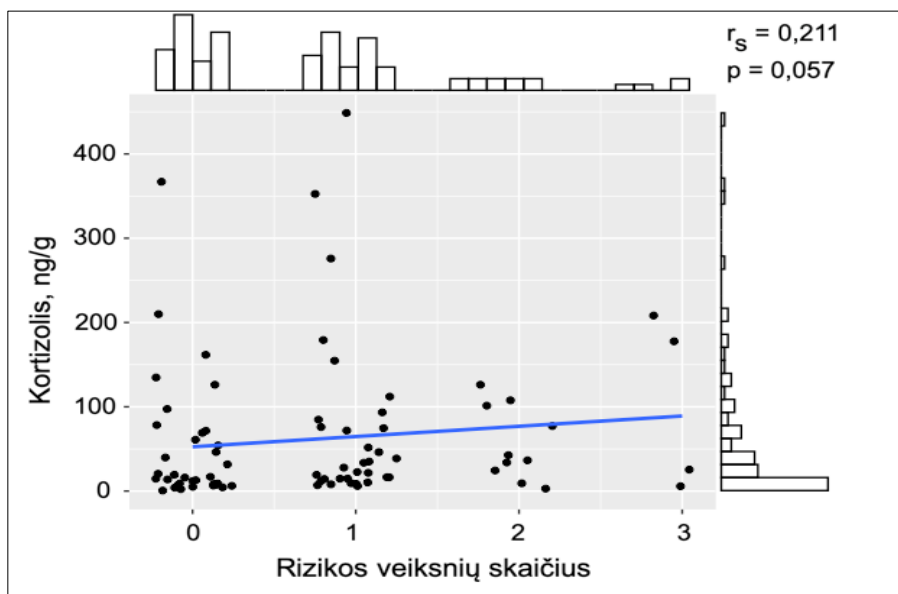
11 pav. Tiriamųjų pasiskirstymas pagal ŠKL rizikos veiksnių skaičių

Kortizolio koncentracijos plaukuose medianos lygintos trijose tiriamųjų grupėse: rizikos veiksnių neturinčių, vieną rizikos veiksnių bei du arba tris rizikos veiksnius turinčių tiriamųjų grupėse. Iš 12 pav. pateiktų duomenų matyti, kad didėjant ŠKL rizikos veiksnių skaičiui pastebima kortizolio koncentracijos plaukuose medianos (IQR) didėjimo tendencija (atitinkamai 15,98 (57,20) ng/g, 27,82 (61,53) ng/g, 39,54 (81,44) ng/g), tačiau medianų skirtumai tarp skirtingą ŠKL rizikos veiksnių skaičių turinčių tiriamųjų nebuvo statistiškai reikšmingi ($p = 0,164$).



12 pav. Kortizolio koncentracijos plaukuose palyginimas tarp skirtingą ŠKL rizikos veiksnių skaičių turinčių asmenų

Statistiškai reikšmingo ryšio tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir ŠKL rizikos veiksnių skaičiaus nebuvo nustatyta ($r_s = 0,211$, $p = 0,057$) (13 pav.).



13 pav. Ryšys tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir ŠKL rizikos veiksnių skaičiaus

5.2.3. Alostatinio krūvio įverčio skaičiavimas ir sąsaja su kortizolio koncentracija plaukuose

Alostatinio krūvio (AK) įverčiui skaičiuoti buvo naudojami penkioms grupėms priklausantys rodikliai: širdies ir kraujagyslių sistemos, medžiagų apykaitos, imuninės sistemos rodikliai, oksidacinio streso bei trombocitų aktyvacijos žymenys. Iš viso AK įverčio skaičiavimui naudota 18 skirtingų rodiklių (kiekybinių kintamųjų). Kiekvienas iš minėtų kiekybinių kintamųjų buvo perskaičiuoti į dichotominius pagal nustatytas ribines skaitines vertes. Ribinės vertės sudarytos apskaičiavus kiekvieno iš rodiklių 25-ąjį ar 75-ąjį procentilius tiriamojame imtyje. Daugumai rodiklių skaitinė vertė „1“ buvo priskirta, jei kintamojo skaitinė reikšmė buvo didesnė arba lygi 75-ajam procentiliui. DTL-cholesterolio ir FRAP rodikliams skaitinė vertė „1“ buvo priskirta, jei kintamojo skaitinė vertė buvo mažesnė arba lygi 25-ajam procentiliui. Pagal minėtą metodiką apskaičiuoto AK įverčio vertės galėjo svyruoti nuo 0 iki 18 (13 lentelė).

13 lentelė. Alostatinio krūvio įverčio skaičiavimui naudotų rodiklių ribinės vertės

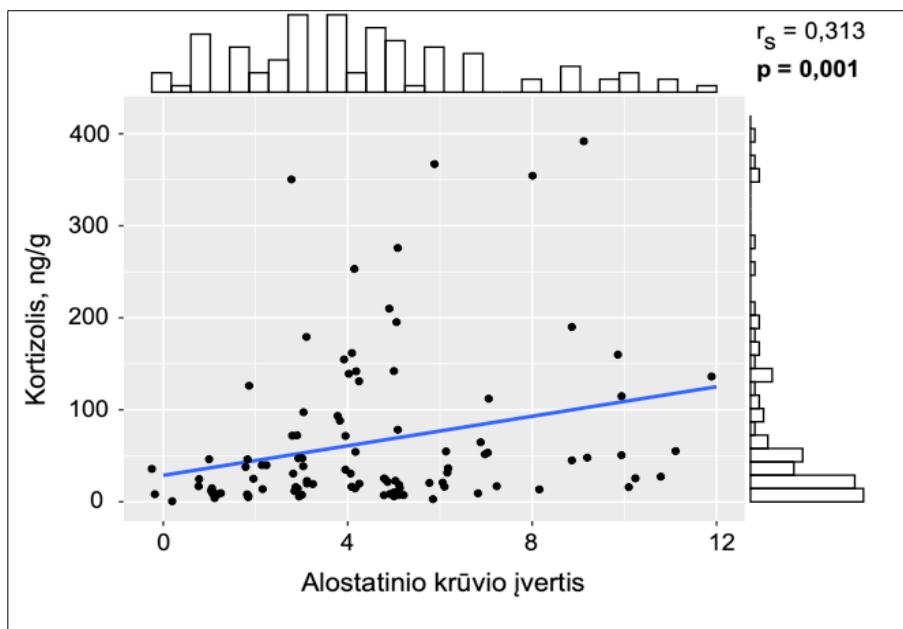
Rodiklių grupė	Rodiklis	Tiriamųjų skaičius	Ribinė vertė
Širdies ir kraujagyslių sistemos rodikliai	SKS (mmHg)	163	≥136
	DKS (mmHg)	163	≥83
	ŠSD (k./min)	163	≥71
Medžiagų apykaitos rodikliai	KMI (kg/m ²)	163	≥27,91
	Liemens apimtis (cm)	162	≥98
	Gliukozė (mmol/l)	163	≥5,50
	TAG (mmol/l)	163	≥1,74
	DTL-cholesterolis (mmol/l)	163	≤1,06
	MTL-cholesterolis (mmol/l)	163	≥3,79
	Bendrasis cholesterolis (mmol/l)	163	≥5,83
Imuninės sistemos rodikliai	CRB (mg/l)	162	≥1,30
	Neutrofilai (%)	161	≥52,81
	Leukocitai (10 ⁹ /l)	161	≥6,28
	CypA (ng/ml)	160	≥81,00

13 lentelė (tęsinys). Alostatinio krūvio įverčio skaičiavimui naudotų rodiklių ribinės vertės

Rodiklių grupė	Rodiklis	Tiriamųjų skaičius	Ribinė vertė
Oksidacinio streso žymenys	MDA ($\mu\text{g/l}$)	142	$\geq 119,30$
	FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{l}$)	158	$\leq 42,92$
Trombocitų aktyvacijos žymenys	CD63 su TRAP (%)	152	$\geq 40,35$
	PAC-1 + su ADP (%)	129	$\geq 66,40$

Santrumpos: SKS – sistolinis kraujo spaudimas, DKS – diastolinis kraujo spaudimas, ŠSD – širdies susitraukimų dažnis, KMI – kūno masės indeksas, TAG – triacilgliceroliai, DTL – didelio tankio lipoproteinai, MTL – mažo tankio lipoproteinai, CRB – C reaktyvusis baltymas, CypA – ciklofilinas A, MDA – malono dialdehidis, FRAP – geležies redukcijos antioksidacinė galia (angl. *ferric reducing ability of plasma*), CD63+ su TRAP – trombocitų dalis, ekspresuojanti CD63 žymenį po stimuliacijos su TRAP, PAC-1+ su ADP – trombocitų dalis, ekspresuojanti PAC-1 žymenį po stimuliacijos su ADP.

AK įvertis apskaičiuotas 102 tiriamiesiems. Nustatyta, jog AK įverčio mediana (IQR) lygi 4 (3), minimali vertė – 0, maksimali vertė – 12. Analizuojant ryšį tarp AK įverčių ir kortizolio koncentracijos plaukuose, nustatyta silpna, tačiau statistiškai reikšminga ($r_s = 0,313$, $p = 0,001$) tiesioginė priklausomybė tarp minėtų kintamųjų (14 pav.).



14 pav. Ryšys tarp alostatinio krūvio įverčio ir kortizolio koncentracijos plaukuose

5.3. Širdies ir kraujagyslių ligų rizikos tyrimas moterų imtyje

5.3.1. Tiriamųjų charakteristika

Tyrimo dalyvavo 145 vidutinio ir vyresnio amžiaus moterys (amžiaus mediana (IQR) – 55 (7) metai). Didžiąją dalį moterų (81,9 %) tyrimo metu buvo prasidėjęs menopauzinis laikotarpis, dauguma jų turėjo aukštąjį išsilavinimą ir buvo ištekėjusios ar turėjo sugyventinį. Vertinant tyrimo dalyvių rūkymo ir fizinio aktyvumo įpročius pastebėta, kad tik nedidelė dalis moterų yra rūkančios, daugiau nei pusė tiriamųjų dirba sėdimą darbą, o laisvalaikį užsiima lengva fizine veikla. Tiriamųjų sociodemografiniai ir gyvenamosios veiksniai pateikiami 14 lentelėje.

14 lentelė. Tiriamųjų sociodemografiniai ir gyvenamosios veiksniai

Rodiklis	Mediana	IQR
Amžius (metai)	55	7
Rodiklis	Tiriamųjų skaičius (%)	
Išsilavinimas		
Pagrindinis	3 (2,1)	
Vidurinis / profesinis	20 (13,8)	
Aukštasis / aukštesnysis	122 (84,1)	
Civilinė padėtis		
Ištekėjusi / turi sugyventinį	107 (73,8)	
Netekėjusi / išsituokusi / našlė	38 (26,2)	
Naktinis darbas		
Dirba naktinį darbą	18 (12,4)	
Nedirba naktinio darbo	127 (87,6)	
Rūkymas		
Rūko	16 (11,0)	
Nerūko	129 (89,0)	
Fizinis aktyvumas darbe¹		
Sėdimas darbas	85 (59,0)	
Vaikščiojimas	45 (31,3)	
Sunkus fizinis darbas	12 (8,3)	
Sunkus fizinis darbas	2 (1,4)	
Fizinis aktyvumas laisvalaikiu¹		
Nejudra	44 (30,6)	
Vaikščiojimas	91 (63,2)	
Sunkesnės fizinės treniruotės	9 (6,2)	
Sunkios fizinės treniruotės	0 (0)	

¹n=144

Tiriamųjų klinikiniai duomenys ir šiame tyrime analizuotų laboratorinių rodiklių rezultatai pateikiami 15 lentelėje.

15 lentelė. Projekto dalyvių klinikiniai duomenys ir laboratorinių tyrimų rezultatai

Rodiklis	Vidurkis±SN ar mediana (IQR)	Mažiausia vertė	Didžiausia vertė
KMI (kg/m ²)	26,81 (8,18)	17,86	55,77
Liemens apimtis (cm)	85 (20)	62	136
SKS (mmHg)	127 (21)	89	180
DKS (mmHg)	80±9,08	59	110
ŠSD (k./min)	76 (15)	53	135
Gliukozė (mmol/l)	5,39 (0,71)	4,1	9,21
Bendrasis cholesterolis (mmol/l)	5,78 (1,49)	3,75	10,69
DTL-cholesterolis (mmol/l)	1,64 (0,62)	0,85	3,2
MTL-cholesterolis (mmol/l)	3,52 (1,32)	1,6	8,88
Ne DTL-cholesterolis (mmol/l)	4,03 (1,54)	2,07	9,47
TAG (mmol/l)	1,160 (0,74)	0,52	4,01
Apo B (g/l) ¹	0,92 (0,37)	0,093	1,85
Apo A1 (g/l) ¹	1,56±0,26	0,86	2,49
Apo A2 (g/l) ¹	0,35 (0,065)	0,22	0,57
Apo E (mg/l) ¹	44,70 (12,32)	23,20	79,00
Apo A1/Apo B ¹	1,62 (0,72)	0,62	17,31
Kortizolis (ng/g) ²	3,43 (6,75)	0,53	117,55
Kortizonas (ng/g) ²	6,65 (4,95)	1,49	73,33
DHEA (ng/g) ³	3,97 (4,06)	0,99	22,72
Progesteronas (ng/g) ⁴	1,25 (2,42)	0,09	38,80
17α-hidroksiprogesteronas (ng/g) ⁵	0,42 (0,25)	0,20	0,94
Estradiolis (ng/g) ⁶	0,15 (0,18)	0,07	1,67
Testosteronas (ng/g) ⁷	0,22 (0,22)	0,06	17,59

¹n=115, ²n=144, ³n=135, ⁴n=123, ⁵n=68, ⁶n=21, ⁷n=78

Santrumpos: SN – standartinis nuokrypis, IQR – tarpkvartilinis plotis, KMI – kūno masės indeksas, SKS – sistolinis kraujo spaudimas, DKS – diastolinis kraujo spaudimas, ŠSD – širdies susitraukimų dažnis, DTL – didelio tankio lipoproteinai, MTL – mažo tankio lipoproteinai, ne DTL – ne didelio tankio lipoproteinai, TAG – triacilgliceroliai, Apo B – apolipoproteinas B, Apo A1 – apolipoproteinas A1, Apo A2 – apolipoproteinas A2, Apo E – apolipoproteinas E, DHEA – dehidroepiandrosteronas, 17OHP – 17α-hidroksiprogesteronas.

5.3.2. Įvairių veiksmų poveikis steroidinių hormonų koncentracijai plaukuose

Dėl galimo įvairių veiksmų poveikio steroidinių hormonų koncentracijai plaukuose anketinėje apklausoje tiriamosios pateikė informaciją apie prasidėjusį menopauzės laikotarpį bei plaukų plovimo dažnį (1 k./sav., 2–4 k./sav., >5 k./sav.), taip pat patirtus stiprius emocinius išgyvenimus (pvz.: darbo netekimas, skyrybos, artimo žmogaus netektis) per pastaruosius tris mėnesius. Palyginus steroidinių hormonų koncentracijas plaukuose pagal minėtus veiksmus besiskiriančių tiriamųjų grupėse, statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta (Mano–Vitnio–Vilkoksono rangų sumų kriterijus arba Kruskalo–Voliso ranginis kriterijus, $p > 0,05$).

5.3.3. Širdies ir kraujagyslių ligų rizikos vertinimas ir sąsaja su steroidinių hormonų koncentracijomis plaukuose

Pagal 4.3.1 poskyryje aprašytą metodiką įvertintas bendrasis tiriamųjų fizinis aktyvumas. Nustatyta, jog 60,8 % tyrimo dalyvių būdingas žemas bendrasis fizinio aktyvumo lygis, o 39,2 % – aktyvesnis gyvenimo būdas. Lyginant kortizolio, kortizono, DHEA koncentracijų plaukuose medianas tarp žemesniu ir aukštesniu fizinio aktyvumo lygiu pasižyminčių tiriamųjų, statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta (atitinkamai 3,66 (9,74) ng/g vs. 3,58 (4,81) ng/g, $p = 0,333$; 6,69 (5,73) ng/g vs. 6,50 (4,07) ng/g, $p = 0,362$; 3,58 (3,68) ng/g vs. 4,23 (4,73) ng/g, $p = 0,333$). Analizuojant minėtų hormonų koncentracijų skirtumus tarp rūkančių ir nerūkančių asmenų, statistiškai reikšmingų skirtumų taip pat nebuvo nustatyta (kortizolis: 3,10 (3,50) ng/g vs. 3,58 (6,96) ng/g, $p = 0,849$; kortizonas: 6,24 (3,42) ng/g vs. 7,26 (5,05) ng/g, $p = 0,257$; DHEA: 3,02 (2,47) ng/g vs. 4,07 (4,29) ng/g, $p = 0,382$).

Lyginant steroidinių hormonų koncentracijų plaukuose medianas tarp skirtingas antropometrinių, arterinio kraujo spaudimo, lipidų apykaitos rodiklių vertes turinčių tiriamųjų, nustatyta, jog didesnę nei rekomenduojama SKS ir DKS turinčioms moterims būdingos statistiškai reikšmingai didesnės kortizolio koncentracijos plaukuose medianos. Taip pat nustatyti statistiškai reikšmingi kortizono koncentracijos plaukuose skirtumai tiriamųjų grupėse, sudarytose pagal KMI, liemens apimtį ir SKS vertes. Palyginus DHEA koncentracijų medianas ŠKL rizikos veiksmus turinčių ir jų neturinčių tiriamųjų grupėse statistiškai reikšmingų skirtumų negauta. Steroidinių hormonų koncentracijų plaukuose palyginimas tarp tiriamųjų grupių, sudarytų pagal minėtų rodiklių vertes, pateikiamas 16 lentelėje.

16 lentelė. Steroidinių hormonų koncentracijų plaukuose palyginimas tarp ŠKL rizikos veiksnių turinčių ir jų neturinčių tiriamųjų

Rodiklis	Tiriamųjų skaičius	Kortizolio koncentracija (ng/g) (mediana (IQR))	P reikšmė	Kortizono koncentracija (ng/g) (mediana (IQR))	P reikšmė	DHEA koncentracija (ng/g) (mediana (IQR))	P reikšmė
KMI (kg/m²)							
18,5–24,9	57	3,12 (3,86)		5,83 (4,02) ^{***}		4,52 (4,37)	
25,0–29,9	40	2,95 (5,99)	0,235*	5,71 (3,81) ^{***}	0,002*	4,04 (2,98)	0,595*
≥30,0	48	4,68 (8,05)		7,42 (9,30) ^{***}		3,62 (4,07)	
Liemens apimtis (cm)							
<80	44	2,82 (3,52)		5,71 (3,60)		3,57 (4,78)	
≥80	101	4,08 (7,57)	0,074**	6,89 (7,53)	0,006**	4,00 (3,59)	0,930**
SKS (mmHg)							
<140	112	3,10 (6,26)		6,15 (4,04)		3,45 (4,31)	0,237**
≥140	33	4,74 (7,27)	0,044**	8,23 (8,77)	0,041**	4,32 (2,97)	
DKS (mmHg)							
<90	112	3,10 (6,20)		5,99 (4,18)		3,58 (4,34)	0,103**
≥90	33	5,42 (7,98)	0,045**	7,80 (6,78)	0,103**	4,46 (3,49)	
TAG (mmol/l)							
<1,70	113	3,62 (6,58)		6,58 (4,26)		4,12 (3,64)	0,131**
≥1,70	32	3,09 (11,28)	0,602**	6,88 (10,43)	0,266**	3,04 (4,55)	
MTL-cholesterolis (mmol/l)							
<2,60	24	6,15 (15,06)		6,67 (3,93)		4,20 (3,93)	0,468**
≥2,60	121	3,13 (6,41)	0,178**	6,65 (5,37)	0,686**	3,60 (5,37)	

16 lentelė (tęsinys). Steroidinių hormonų koncentracijų plaukuose palyginimas tarp ŠKL rizikos veiksnių turinčių ir jų neturinčių tiriamųjų

Rodiklis	Tiriamųjų skaičius	Kortizolio koncentracija (ng/g) (mediana (IQR))	p reikšmė	Kortizono koncentracija (ng/g) (mediana (IQR))	p reikšmė	DHEA koncentracija (ng/g) (mediana (IQR))	p reikšmė
Ne DTL-cholesterolis (mmol/l)							
<3,40	35	4,14 (9,66)	0,549**	6,78 (3,55)	0,264**	4,55 (3,18)	0,114**
≥ 3,40	110	3,13 (6,21)		6,09 (5,39)		3,58 (4,41)	
Apo B (g/l)							
<1,00	71	2,85 (5,77)	0,227**	6,18 (3,48)	0,806**	3,39 (3,61)	0,814**
≥1,00	44	3,90 (9,81)		5,69 (5,91)		4,10 (3,60)	

*Kruskalo–Voliso ranginis kriterijus

**Mano–Vitnio–Vilkoksono rangų sumų kriterijus

***Duno kriterijus su Bonferonio korekcija: normalus kūno svoris ($18,5 \leq \text{KMI} \leq 24,9$) vs. nutukimas ($\text{KMI} \geq 30,0$), $p = 0,003$, antsvoris ($25,0 \leq \text{KMI} \leq 29,9$) vs. nutukimas ($\text{KMI} \geq 30,0$), $p = 0,033$.

Santrumpos: KMI – kūno masės indeksas, SKS – sistolinis kraujo spaudimas, DKS – diastolinis kraujo spaudimas, MTL – mažo tankio lipoproteinai, ne DTL – ne didelio tankio lipoproteinai, TAG – triacilgliceroliai, Apo B – apolipoproteinas B

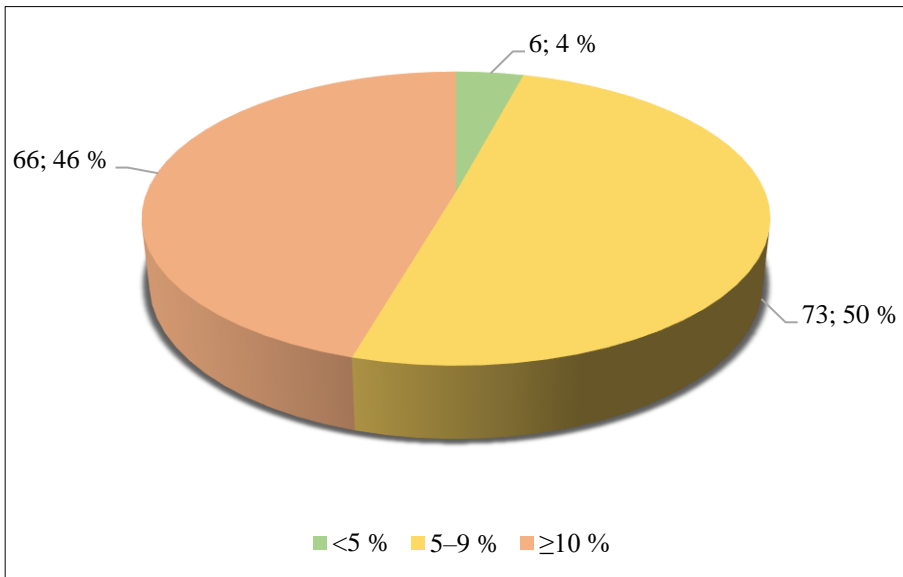
Atlikus koreliacinę analizę nustatyti silpni, tačiau statistiškai reikšmingi ryšiai tarp tyrimo dalyvių liemens apimties, sistolinio ir diastolinio kraujo spaudimo bei apolipoproteino E koncentracijos ir kortizolio koncentracijos plaukuose verčių. Taip pat nustatytos statistiškai reikšmingos tiesioginės priklausomybės tarp kortizono koncentracijos plaukuose ir tiriamųjų KMI, liemens apimties, sistolinio ir diastolinio kraujo spaudimo bei gliukozės koncentracijos kraujo serume ir atvirkštinė priklausomybė tarp kortizono koncentracijos plaukuose ir DTL-cholesterolio koncentracijos kraujo serume. Vertinant ŠKL rizikos veiksnių ir DHEA koncentracijos plaukuose sąsajas nustatyti silpni statistiškai reikšmingi ryšiai tarp minėto hormono koncentracijos ir sistolinio bei diastolinio kraujo spaudimo verčių (17 lentelė).

17 lentelė. Sąsajos tarp steroidinių hormonų koncentracijų plaukuose ir ŠKL rizikos veiksnių

Rodiklis	Kortizolio koncentracija (ng/g)		Kortizono koncentracija (ng/g)		DHEA koncentracija (ng/g)	
	r _s	p reikšmė	r _s	p reikšmė	r _s	p reikšmė
KMI (kg/m ²)	0,155	0,064	0,307	1,85×10⁻⁴	0,002	0,978
Liemens apimtis (cm)	0,170	0,042	0,344	2,38×10⁻⁵	0,012	0,886
SKS (mmHg)	0,246	0,003	0,271	1,03×10⁻³	0,194	0,024
DKS (mmHg)	0,227	0,006	0,276	7,98×10⁻⁴	0,197	0,022
ŠSD (k./min)	0,0003	0,997	0,130	0,122	0,023	0,795
Gliukozė (mmol/l)	0,124	0,139	0,177	0,033	0,003	0,969
Bendrasis cholesterolis (mmol/l)	-0,069	0,411	-0,127	0,129	-0,090	0,299
DTL-cholesterolis (mmol/l)	-0,044	0,600	-0,249	0,003	-0,018	0,838
MTL-cholesterolis (mmol/l)	-0,010	0,234	-0,107	0,201	-0,078	0,366
Ne DTL-cholesterolis (mmol/l)	-0,079	0,344	-0,080	0,339	-0,110	0,205
TAG (mmol/l)	0,090	0,283	0,077	0,356	-0,082	0,343
Apo B (g/l)	0,098	0,300	0,070	0,462	-0,019	0,845
Apo A1 (g/l)	0,049	0,607	-0,158	0,093	0,030	0,762
Apo A2 (g/l)	0,054	0,571	-0,126	0,180	0,018	0,857
Apo E (mg/l)	0,191	0,041	0,128	0,176	0,085	0,384
Apo A1/Apo B	-0,024	0,803	-0,102	0,279	0,027	0,781

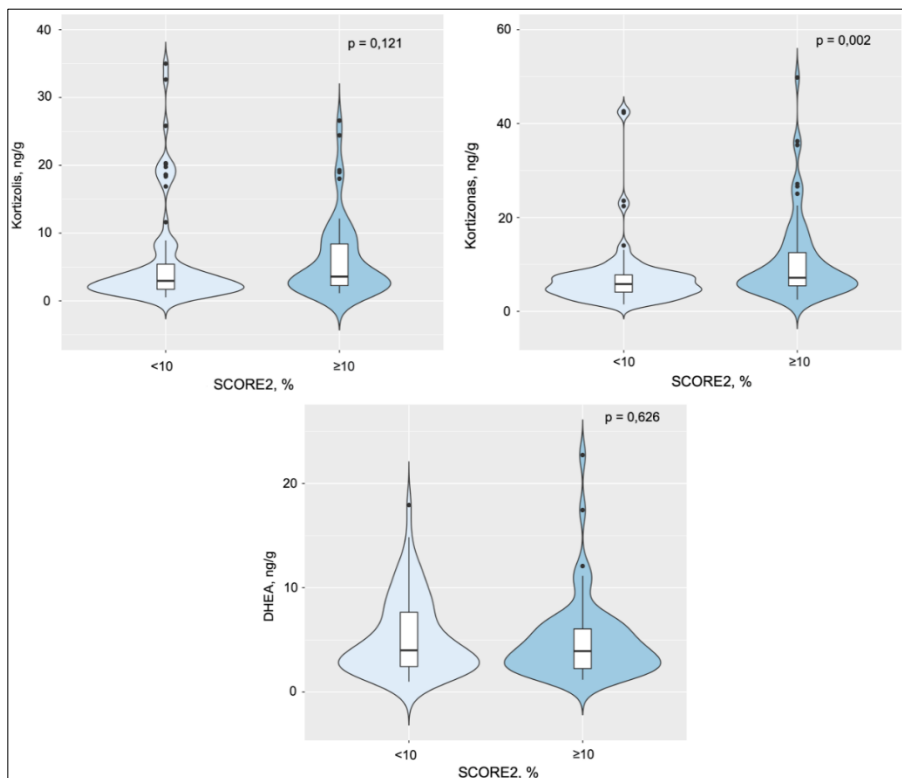
Santrumpos: r_s – Spirmeno koreliacijos koeficientas, KMI – kūno masės indeksas, SKS – sistolinis kraujo spaudimas, DKS – diastolinis kraujo spaudimas, ŠSD – širdies susitraukimų dažnis, DTL – didelio tankio lipoproteinai, MTL – mažo tankio lipoproteinai, ne DTL – ne didelio tankio lipoproteinai, TAG – triacilgliceroliai, Apo B – apolipoproteinas B, Apo A1 – apolipoproteinas A1, Apo A2 – apolipoproteinas A2, Apo E – apolipoproteinas E.

Siekiant įvertinti tyrimo dalyvių absoliučiąją riziką per 10 metų išsivystyti širdies ir kraujagyslių ligai, visoms tiramosioms buvo apskaičiuotas SCORE2 įvertis. Nustatyta, jog SCORE2 įverčio mediana (IQR) yra 8(6) %, minimali vertė – 4 %, maksimali vertė – 27 %. Tik nedidelei daliai tiriamųjų (4,14 %) SCORE2 vertė buvo <5 %, 50,34 % asmenų SCORE2 įvertis siekė 5–9 % ir 45,52 % tiriamųjų apskaičiuotas SCORE2 įvertis buvo ≥ 10 % (15 pav.).



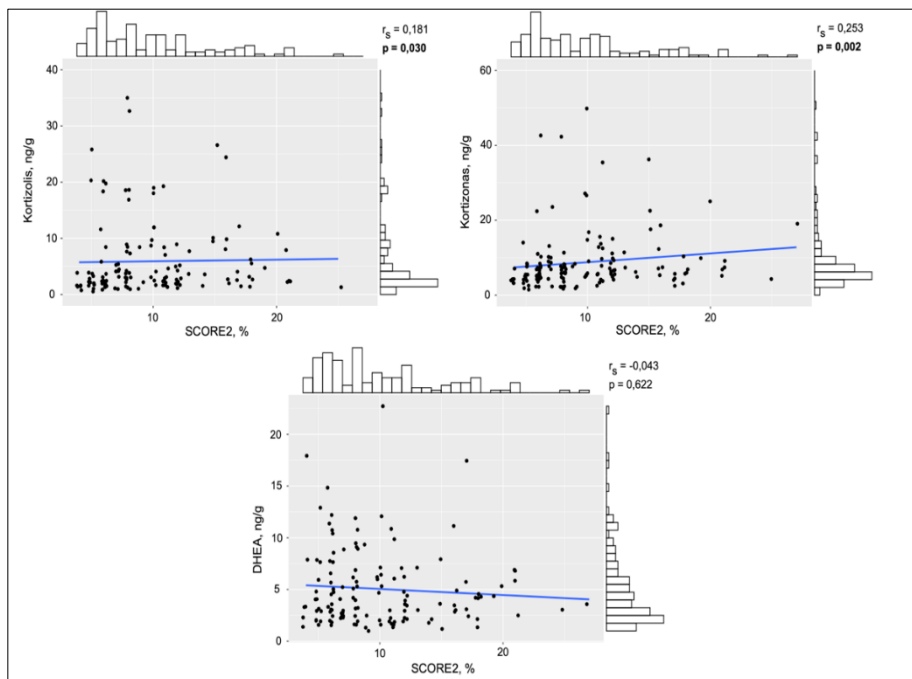
15 pav. Tiriamųjų pasiskirstymas pagal SCORE2 indekso vertes

Tolesnei statistinei analizei tiramosios pagal SCORE2 įvertį suskirstytos į dvi grupes: SCORE2 <10 % (maža ir vidutinė ŠKL rizika) ir SCORE2 ≥ 10 % (didelė ŠKL rizika). Palyginus steroidinių hormonų koncentracijų medianas minėtose grupėse, nustatyta statistiškai reikšmingai didesnė kortizono koncentracijos plaukuose mediana (IQR) moterų grupėje, kurių SCORE2 ≥ 10 %, palyginti su tiramosiomis, kurių SCORE2 <10 % (atitinkamai 7,16 (7,08) ng/g vs. 5,83 (3,86) ng/g, $p = 0,002$). Statistiškai reikšmingų kortizolio bei DHEA koncentracijų medianų (IQR) skirtumų tarp dviejų minėtų grupių (SCORE2 <10 % ir SCORE2 ≥ 10 %) nustatyta nebuvo (atitinkamai 3,07 (6,48) ng/g vs. 4,07 (7,32) ng/g, $p = 0,121$ ir 4,00 (5,20) ng/g vs. 3,93 (3,81) ng/g, $p = 0,626$) (16 pav.).



16 pav. Steroidinių hormonų koncentracijų plaukuose palyginimas tarp skirtingą SCORE2 įvertį turinčių tiriamųjų

Analizuojant ryšius tarp steroidinių hormonų koncentracijų plaukuose ir SCORE2 įverčio, nustatytos statistiškai reikšmingos priklausomybės tarp SCORE2 ir kortizolio ($r_s = 0,181$, $p = 0,030$) bei kortizono ($r_s = 0,253$, $p = 0,002$) koncentracijų plaukuose. Statistiškai reikšmingos sąsajos tarp SCORE2 ir DHEA koncentracijos plaukuose nebuvo rasta ($r_s = -0,043$, $p = 0,622$) (17 pav.).



17 pav. Ryšys tarp steroidinių hormonų koncentracijų plaukuose ir SCORE2 įvertčio

5.3.4. Metabolinio sindromo sąsaja su steroidinių hormonų koncentracijomis plaukuose

Metabolinis sindromas (MS) nustatytas vadovaujantis Jungtinių Amerikos Valstijų nacionalinės cholesterolio švietimo programos suaugusiųjų gydymo kriterijais (NCEP-ATP III) [89]. Pagal 2005 m. atnaujintus NCEP-ATP III klasifikacijos kriterijus MS diagnozuojamas pacientams, turintiems bent tris iš toliau išvardytų kriterijų:

- 1) liemens apimtis vyrams ≥ 102 cm, moterims ≥ 88 cm;
- 2) padidėjusi TAG koncentracija ($\geq 1,7$ mmol/l) arba dėl to skiriamas specifinis gydymas;
- 3) sumažėjusi DTL-cholesterolio koncentracija (vyrams $< 1,0$ mmol/l, moterims $< 1,3$ mmol/l) arba dėl to skiriamas specifinis gydymas;
- 4) padidėjęs AKS: sistolinis ≥ 130 mmHg ar diastolinis ≥ 85 mmHg arba anksčiau diagnozuotos hipertenzijos gydymas;
- 5) padidėjusi gliukozės koncentracija kraujo serume nevalgius ($\geq 5,6$ mmol/l) arba anksčiau diagnozuotas 2 tipo cukrinis diabetas.

Pagal NCEP-ATP III kriterijus MS diagnozuotas 64 (44,14 %) tiriamosioms. Lyginant sergančių ir nesergančių MS tiriamųjų sociodemografinius ir gyvenimo veiksnius nustatyta, kad sergančios MS yra vyresnio amžiaus (57,5 (7) metai vs. 54,0 (6) metai). Taip pat sergančioms MS moterims nustatytos statistiškai reikšmingai didesnės kortizolio ir kortizono koncentracijų plaukuose medianos (18 lentelė).

18 lentelė. Sociodemografinių ir gyvenamosios veiksnų bei steroidinių hormonų koncentracijų plaukuose palyginimas tarp metaboliniu sindromu sergančių ir nesergančių tiriamųjų

Rodiklis	Nesergančios MS (n=81)	Sergančios MS (n=64)	χ^2 (df=1)	p reikšmė
Amžius, metai (mediana (IQR))	54,0 (6)	57,5 (7)		0,003*
Menopauzė				
Taip (n (%))	63 (78,8)	55 (85,9)	1,242	0,265**
Ne (n (%))	17 (21,2)	9 (14,1)		
Civilinė padėtis				
Ištekėjusi / turi sugyventinį (n (%))	59 (72,8)	48 (75,0)	0,086	0,769**
Netekėjusi / išsituokusi / našlė (n (%))	22 (27,2)	16 (25,0)		
Naktinis darbas				
Dirba naktinį darbą (n (%))	11 (13,6)	7 (10,9)	0,230	0,632**
Nedirba naktinio darbo (n (%))	70 (86,4)	57 (89,1)		
Rūkymas				
Rūko (n (%))	7 (8,6)	9 (14,1)	1,070	0,301**
Nerūko (n (%))	74 (91,4)	55 (85,9)		
Fizinis aktyvumas				
Mažas (n (%))	48 (55,2)	31 (55,4)	4,702×10 ⁻⁴	0,983**
Didelis (n (%))	39 (44,8)	25 (44,6)		
Kortizolio koncentracija (ng/g) (mediana (IQR))	2,93 (4,82)	4,19 (8,56)		0,019*

18 lentelė (tęsinys). Sociodemografinių ir gyvenamosios veiksmų bei steroidinių hormonų koncentracijų plaukuose palyginimas tarp metaboliniu sindromu sergančių ir nesergančių tiriamųjų

Rodiklis	Nesergančios MS (n=81)	Sergančios MS (n=64)	χ^2 (df=1)	p reikšmė
Kortizono koncentracija (ng/g) (mediana (IQR))	5,50 (3,58)	7,44 (7,20)		1,283×10⁻⁴*
DHEA koncentracija (ng/g) (mediana (IQR))	3,58 (4,25)	4,18 (3,45)		0,384*
PSS (vidurkis±SN)	15,22±5,51	16,06±6,30		0,394***
STAI-T (vidurkis±SN)	39,53±8,45	41,27±9,34		0,244***
PMKI (mediana (IQR))	5 (4)	6 (5)		0,118*

*Mano–Vitnio–Vilkoksono rangų sumų kriterijus, ** χ^2 kriterijus, ***Stjudento t kriterijus nepriklausomoms imtims.

Santrumpos: DHEA – dehidroepiandrosteronas, IQR – tarpkvartilinis plotis, MS – metabolinis sindromas, PSS – subjektyviai suvokto streso skalė, STAI-T – asmenybinio nerimastingumo skalė, PMKI – Pitsburgo miego kokybės indeksas, SN – standartinis nuokrypis.

Siekiant įvertinti amžiaus, kortizolio bei kortizono koncentracijų plaukuose reikšmę prognozuojant MS išsivystymą, atlikta vienalypės regresijos analizė. Nustatyta, jog didėjant amžiui bei kortizono koncentracijai plaukuose statistiškai reikšmingai didėja rizika sirgti MS. Statistiškai reikšmingos priklausomybės tarp rizikos sirgti MS ir kortizolio koncentracijos plaukuose nebuvo rasta (19 lentelė).

19 lentelė. Vienalypė logistinės regresijos analizė (priklausomas kintamasis – MS diagnozė)

Rodiklis	ŠS	95 % PI	p reikšmė
Amžius, metai	1,13	[1,04; 1,23]	0,003
Kortizolio koncentracija (ng/g)	1,01	[0,99; 1,03]	0,218
Kortizono koncentracija (ng/g)	1,07	[1,02; 1,13]	0,008

Santrumpos: PI – pasikliautinis intervalas, ŠS – šansų santykis

Į daugialypės logistinės regresijos analizę buvo įtraukti amžiaus ir kortizono koncentracijos plaukuose kintamieji (20 lentelė).

20 lentelė. Daugialypė logistinės regresijos analizė (priklausomas kintamasis – MS diagnozė)

Rodiklis	ŠS	95 % PI	p reikšmė
Amžius, metai	1,11	[1,02; 1,22]	0,014
Kortizono koncentracija (ng/g)	1,06	[1,02; 1,13]	0,015

Santrumpos: PI – pasikliautinis intervalas, ŠS – šansų santykis

Sudaryto daugialypės logistinės regresijos modelio vidutinis teisingas klasifikuojamumas – 65,95 %, jautrumas – 0,81 (95 % PI [0,71; 0,89]), specifiškumas – 0,46 (95 % PI [0,33; 0,59]), teigiama prognostinė reikšmė – 0,66 (95 % PI [0,56; 0,75]), neigiama prognostinė reikšmė – 0,66 (95 % PI [0,50; 0,80]), teigiamas tikėtinumo santykis – 1,51 (95 % PI [1,18; 1,94]), neigiamas tikėtinumo santykis – 0,40 (95 % PI [0,24; 0,68]). Vertinant modelio tinkamumą buvo apskaičiuoti pseudodeterminacijos koeficientai: Makfadeno – 0,134, Kokso–Snello – 0,169, Nagelkerkės – 0,226.

Tolesnei statistinei analizei pagal kortizolio koncentracijos plaukuose tercilius (T1, T2, T3) tiriamosios buvo suskirstytos į tris grupes, kuriose taikant χ^2 kriterijų palygintas MS dažnis (21 lentelė).

21 lentelė. Tiriamųjų skirstymas į grupes pagal kortizolio koncentracijos plaukuose tercilius

Tercilis	Kortizolio koncentracija (ng/g)	Sergančios MS n (%)	Nesergančios MS n (%)	χ^2 (df=2)	P reikšmė
T1	[0,53; 2,32]	15 (31,2)	33 (68,8)		
T2	(2,32; 5,65]	21 (44,7)	26 (55,3)	6,59	0,037
T3	(5,65; 117,55]	28 (57,1)	21 (42,9)		

Santrumpos: MS – metabolinis sindromas

Nustatyta, jog MS dažnis statistiškai reikšmingai ($p = 0,037$) didėja su kiekvienu kortizolio koncentracijos plaukuose terciliu (T1 – 31,2 %, T2 – 44,7 %, T3 – 57,1 %).

Nagrinėjant metabolinio sindromo priklausomybę nuo kortizolio koncentracijos plaukuose, taikyta logistinė regresija, kurioje kaip priklausomas kintamasis pasirinkta MS diagnozė, o kaip nepriklausomas kintamasis – kortizolio koncentracijos plaukuose tercilis (Modelis Nr. 1). Nustatyta, jog kortizolio koncentracija plaukuose, patenkanti į T3 intervalą, didina metabolinio sindromo šansų santykį 2,93 (95 % PI [1,28; 6,74], $p = 0,011$) karto. Į logistinės regresijos modelį papildomai kaip kovariantę įtraukę anksčiau kintamąjį (Modelis Nr. 2), matome, jog tiriamosioms, kurių kortizolio koncentracija plaukuose yra T3 intervale, būdingas 2,66 (95 % PI [1,14; 6,24], $p = 0,024$) karto didesnis šansų santykis, palyginti su tiriamosiomis, kurių kortizolio koncentracija plaukuose yra T1 intervale. Logistinės regresijos analizės rezultatai pateikiami 22 lentelėje.

22 lentelė. Logistinės regresijos analizė (priklausomas kintamasis – MS diagnozė)

Kortizolio koncentracijos tercilis	Modelis Nr. 1 ŠS [95 % PI]	p reikšmė	Modelis Nr. 2 ŠS [95 % PI]	p reikšmė
T1	1,00 (referentinis)		1,00 (referentinis)	
T2	1,78 [0,77; 4,11]	0,179	1,76 [0,74; 4,17]	0,198
T3	2,93 [1,28; 6,74]	0,011	2,66 [1,14; 6,24]	0,024

Santrumpos: ŠS – šansų santykis, PI – pasikliautinis intervalas

Analogiška statistinė analizė atlikta suskirsčius tiriamąsias į tris grupes pagal kortizono koncentracijos plaukuose tercilius. Nustatyta, jog MS dažnis statistiškai reikšmingai ($p = 7,218 \times 10^{-4}$) didėja su kiekvienu kortizono koncentracijos plaukuose terciliu (T1 – 25,0 %, T2 – 42,6 %, T3 – 63,3 %) (23 lentelė).

23 lentelė. Tiriamųjų skirstymas į grupes pagal kortizono koncentracijos plaukuose tercilius

Tercilis	Kortizono koncentracija (ng/g)	Sergančios MS n (%)	Nesergančios MS n (%)	χ^2 (df=2)	p reikšmė
T1	[1,49; 5,18]	12 (25,0)	36 (75,0)	14,47	7,218×10⁻⁴
T2	(5,18; 7,80]	20 (42,6)	27 (57,4)		
T3	(7,80; 73,33]	31 (63,3)	18 (36,7)		

Santrumpos: MS – metabolinis sindromas

Atlikus logistinės regresijos analizę nustatyta, jog tiek į modelį neįtraukus kitų veiksnių (Modelis Nr. 1), tiek atsižvelgus į amžių (Modelis Nr. 2) kortizono koncentracija T3 intervale yra statistiškai reikšmingas veiksnys prognozuojant riziką sirgti MS (24 lentelė).

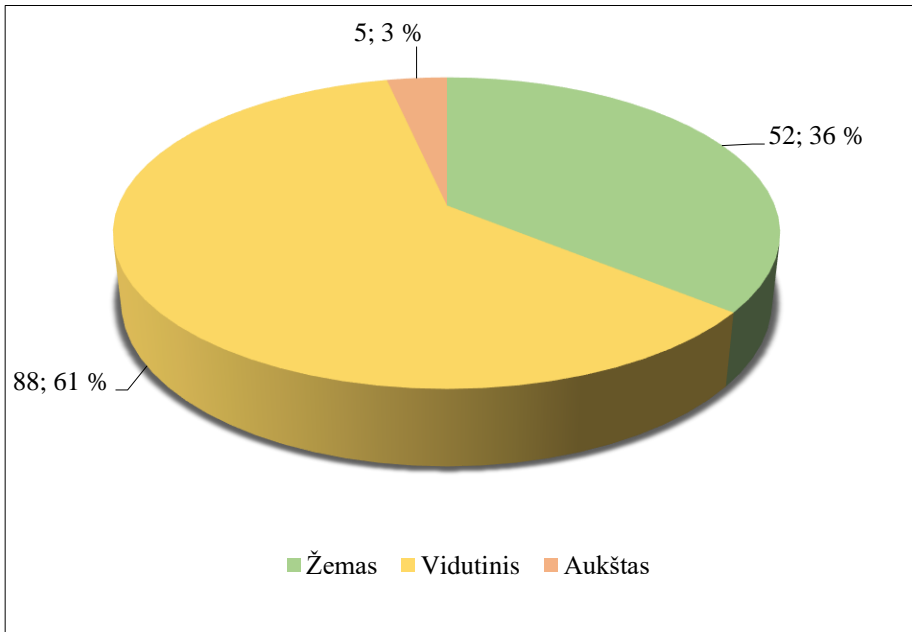
24 lentelė. Logistinės regresijos analizė (priklausomas kintamasis – MS diagnozė)

Kortizono koncentracijos tercilis	Modelis Nr. 1 ŠS [95 % PI]	p reikšmė	Modelis Nr. 2 ŠS [95 % PI]	p reikšmė
T1	1,00 (referentinis)		1,00 (referentinis)	
T2	2,22 [0,93; 5,32]	0,073	2,07 [0,85; 5,04]	0,111
T3	5,17 [2,16; 12,38]	2,31×10⁻⁴	4,74 [1,94; 11,58]	6,36×10⁻⁴

Santrumpos: ŠS – šansų santykis, PI – pasikliautinis intervalas

5.3.5. Streso, nerimo, miego kokybės vertinimas ir sąsaja su širdies ir kraujagyslių ligų rizikos veiksniais

Tiriamųjų patiriamo streso lygiui įvertinti buvo naudojama subjektyviai suvokto streso skalė (PSS, angl. *Perceived Stress Scale*). Nustatyta, jog didžioji dalis tiriamųjų (60,69 %) patiria vidutinio lygio stresą, 35,86 % būdingas žemas subjektyviai suvokiamo streso lygis ir tik 3,45 % teigia patiriantys aukšto lygio stresą (18 pav.).



18 pav. Tyrimo dalyvių pasiskirstymas pagal subjektyviai patiriamo streso lygį

Vertinant miego kokybę naudotas Pitsburgo miego kokybės indeksas (PMKI, angl. *Pittsburgh sleep quality index*). Nustatyta, jog 42 % moterų būdinga prasta subjektyviai vertinama miego kokybė (PMKI ≥ 5 balai), o 58 % tiriamųjų teigia, kad jų miego kokybė yra gera (PMKI < 5 balai).

Palyginus skirtingą streso lygį (žemas vs. vidutinis ir aukštas) patiriančių bei skirtingą miego kokybę (gera vs. prasta) pasižyminčių tiriamųjų gyvenimosi rodiklius, statistiškai reikšmingų gyvenimosi veiksmų (rūkymas, mažas fizinis aktyvumas) dažnių skirtumų tarp grupių nenustatyta (χ^2 arba Fišerio tikslusis kriterijus $p > 0,05$).

Išanalizavus antropometrinių, arterinio kraujo spaudimo, širdies susitraukimų dažnio, lipidų ir angliavandenių apykaitos rodiklių skirtumus tarp žemo ir vidutinio bei aukšto lygio stresą patiriančių tiriamųjų, statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta. Pažymėtina, jog statistiškai reikšmingai didesnės KMI vertės bei gliukozės ir triacilglicerolių koncentracijos nustatytos tiriamosioms, kurių miego kokybė yra blogesnė (25 lentelė).

25 lentelė. Antropometrinių, arterinio kraujo spaudimo, širdies susitraukimų dažnio, lipidų ir angliavandenių apykaitos rodiklių palyginimas tarp tiriamųjų grupių, sudarytų pagal patiriamo streso lygį ir miego kokybės įvertį

Rodiklis	Subjektyviai suvokto streso lygis			Miego kokybė		p reikšmė
	Žemas	Vidutinis ir aukštas	p reikšmė	Gera	Prasta	
KMI (kg/m ²), mediana (IQR)	27,10 (8,16)	26,70 (8,77)	0,939	26,81 (7,30)	27,71 (8,88)	0,037 **
Liemens apimtis (cm), mediana (IQR)	84,5 (18,25)	86,0 (20,00)	0,646	85,0 (18,00)	89,0 (21,00)	0,067**
SKS (mmHg), mediana (IQR)	129,50 (17,25)	125,0 (23,00)	0,207	127 (19,50)	126 (23,50)	0,726**
DKS (mmHg), vidurkis±SN	81,40±8,55	80,68±9,40	0,646	80,61±8,67	81,00±9,46	0,470*
ŠSD (k./min), mediana (IQR)	76 (14,25)	75 (14,00)	0,913	75 (14,00)	76 (14,25)	0,358**
Gliukozė (mmol/l), mediana (IQR)	5,38 (0,73)	5,41 (0,63)	0,323	5,29 (0,66)	5,63 (0,82)	0,001 **
Bendrasis cholesterolis (mmol/l), mediana (IQR)	5,34 (1,31)	5,97 (1,75)	0,665	5,64 (1,45)	5,98 (1,66)	0,616**
DTL-cholesterolis (mmol/l), mediana (IQR)	1,67 (0,56)	1,62 (0,64)	0,362	1,64 (0,47)	1,60 (0,64)	0,184**
MTL-cholesterolis (mmol/l), mediana (IQR)	3,41 (1,16)	3,61 (1,42)	0,519	3,46 (1,29)	3,57 (1,29)	0,677**

25 lentelė (tęsinys). Antropometrinių, arterinio kraujo spaudimo, širdies susitraukimų dažnio, lipidų ir angliavandenių apykaitos rodiklių palyginimas tarp tiriamųjų grupių, sudarytų pagal patiriamo streso lygį ir miego kokybės įvertį

Rodiklis	Subjektyviai suvokto streso lygis		p reikšmė	Miego kokybė		p reikšmė
	Žemas	Vidutinis ir aukštas		Gera	Prasta	
Ne DTL-cholesterolis (mmol/l), mediana (IQR)	3,99 (1,40)	4,15 (1,67)	0,490	3,97 (1,41)	4,13 (1,71)	0,303**
TAG (mmol/l), mediana (IQR)	1,02 (0,70)	1,19 (0,77)	0,186	1,05 (0,64)	1,22 (0,93)	0,013**
Apo B (g/l), mediana (IQR)	0,87 (0,26)	0,95 (0,37)	0,217	0,88 (0,32)	0,96 (0,40)	0,069**
Apo A1 (g/l), vidurkis±SN	1,59±0,25	1,54±0,26	0,359	1,55±0,23	1,55±0,29	0,955*
Apo A2 (g/l), mediana (IQR)	0,35 (0,07)	0,34 (0,06)	0,434	0,35 (0,07)	0,34 (0,05)	0,913**
Apo E (mg/l), mediana (IQR)	42,90 (12,95)	45,05 (16,70)	0,484	42,70 (14,80)	45,3 (20,30)	0,162**
ApoA1/Apo B, mediana (IQR)	1,69 (0,66)	1,56 (0,79)	0,147	1,64 (0,67)	1,59 (0,79)	0,143**
SCORE2 (%), mediana (IQR)	9,5 (7,0)	8,0 (5,0)	0,188	8,0 (5,50)	10,0 (8,00)	0,103**

* Stjudento t kriterijus nepriklausomoms mintims, ** Mano–Vitnio–Vilkoksono rangų sumų kriterijus

Santrumpos: SN – standartinis nuokrypis, IQR – tarpkvartilinis plotis, KMI – kūno masės indeksas, SKS – sistolinis kraujo spaudimas, DKS – diastolinis kraujo spaudimas, ŠSD – širdies susitraukimų dažnis, DTL – didelio tankio lipoproteinai, MTL – mažo tankio lipoproteinai, ne DTL – ne didelio tankio lipoproteinai, TAG – triacilgliceroliai, Apo B – apolipoproteinas B, Apo A1 – apolipoproteinas A1, Apo A2 – apolipoproteinas A2, Apo E – apolipoproteinas E.

Atlikus koreliacinę analizę nustatytos silpnos, tačiau statistiškai reikšmingos tiesioginės priklausomybės tarp PSS skalės bei PMKI verčių ir gliukozės koncentracijos kraujo serume bei PMKI ir SCORE2 įverčių. Statistiškai reikšmingų klausimynų įverčių sąsajų su kitais rodikliais nenustatyta (26 lentelė).

26 lentelė. Ryšys tarp antropometrinių, arterinio kraujo spaudimo, širdies susitraukimų dažnio, lipidų, angliavandenių apykaitos rodiklių ir subjektyviai suvokto streso skalės, STAI-T klausimyno bei Pitsburgo miego kokybės indekso įverčių

Rodiklis	PSS		STAI-T		PMKI	
	r_s ar r_p	p reikšmė	r_s ar r_p	p reikšmė	r_s ar r_p	p reikšmė
KMI (kg/m ²)	0,071	0,394	0,035	0,680	0,122	0,145
Liemens apimtis (cm)	0,066	0,428	0,034	0,685	0,109	0,195
SKS (mmHg)	-0,040	0,636	-0,036	0,666	-0,044	0,597
DKS (mmHg)	0,008*	0,925	0,025*	0,763	-0,053	0,527
ŠSD (k./min)	0,033	0,693	-0,023	0,785	0,036	0,667
Gliukozė (mmol/l)	0,170	0,041	0,117	0,159	0,265	0,001
Bendrasis cholesterolis (mmol/l)	0,033	0,695	-0,001	0,986	0,007	0,930
DTL-cholesterolis (mmol/l)	-0,062	0,461	-0,092	0,274	-0,140	0,094
MTL-cholesterolis (mmol/l)	0,050	0,551	0,011	0,899	0,013	0,877
Ne DTL-cholesterolis (mmol/l)	0,040	0,629	0,031	0,709	0,050	0,549
TAG (mmol/l)	0,078	0,353	0,108	0,194	0,155	0,063
Apo B (g/l)	0,122	0,193	0,078	0,408	0,126	0,180
Apo A1 (g/l)	-0,058*	0,537	-0,028*	0,765	-0,006	0,946
Apo A2 (g/l)	-0,133	0,157	0,044	0,638	0,010	0,915
Apo E (mg/l)	0,124	0,187	0,138	0,142	0,083	0,379
Apo A1/Apo B	-0,132	0,159	-0,052	0,584	-0,113	0,230
SCORE2 (%)	-0,045	0,595	0,023	0,784	0,194	0,020

*Pirsono koreliacijos koeficientas

Santrumpos: r_s – Spirmeno koreliacijos koeficientas, r_p – Pirsono koreliacijos koeficientas, KMI – kūno masės indeksas, SKS – sistolinis kraujo spaudimas, DKS – diastolinis kraujo spaudimas, ŠSD – širdies susitraukimų dažnis, DTL – didelio tankio lipoproteinai, MTL – mažo tankio lipoproteinai, ne DTL – ne didelio tankio lipoproteinai, TAG – triacilgliceroliai, Apo B – apolipoproteinas B, Apo A1 – apolipoproteinas A1, Apo A2 – apolipoproteinas A2, Apo E – apolipoproteinas E

5.3.6. Streso, nerimo ir miego kokybės sąsaja su steroidinių hormonų koncentracijomis plaukuose

Lyginant steroidinių hormonų koncentracijų plaukuose medianas tarp skirtingą streso lygį patiriančių bei skirtinga miego kokybe pasižyminčių tyrimo dalyvių nustatyti statistiškai reikšmingi kortizolio koncentracijos plaukuose medianų skirtumai tarp gera ir prasta miego kokybe pasižyminčių tiriamųjų grupių (27 lentelė).

27 lentelė. Steroidinių hormonų koncentracijų plaukuose palyginimas tarp tiriamųjų grupių, sudarytų pagal patiriamo streso lygį ir miego kokybės įvertį

Rodiklis	Tiriamųjų skaičius	Kortizolio koncentracija (ng/g), mediana (IQR)	p reikšmė	Kortizono koncentracija (ng/g), mediana (IQR)	p reikšmė	DHEA koncentracija (ng/g), mediana (IQR)	p reikšmė
Subjektyviai suvokto streso lygis							
Žemas	52	2,95 (6,64)	0,374	5,90 (3,41)	0,430	3,46 (3,83)	0,182
Vidutinis ir aukštas	93	3,89 (6,81)		6,90 (5,44)		4,20 (4,42)	
Miego kokybė							
Gera	83	3,04 (4,96)	0,039	5,90 (3,71)	0,230	3,75 (3,82)	0,890
Prasta	60	4,32 (11,25)		6,88 (5,72)		4,04 (3,64)	

Analizuojant ryšius tarp steroidinių hormonų koncentracijų plaukuose ir streso, nerimo lygį bei miego kokybę vertinančių klausimynų įverčių nustatyta silpna tiesioginė priklausomybė tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir subjektyviai suvokto streso skalės (PSS) bei Pitsburgo miego kokybės indekso (PMKI) verčių (28 lentelė).

28 lentelė. Ryšys tarp steroidinių hormonų koncentracijų plaukuose ir streso, nerimo lygį bei miego kokybę vertinančių klausimynų įverčių

Rodiklis	Kortizolio koncentracija (ng/g)		Kortizono koncentracija (ng/g)		DHEA koncentracija (ng/g)	
	r_s	p reikšmė	r_s	p reikšmė	r_s	p reikšmė
PSS	0,183	0,029	0,151	0,072	0,083	0,341
STAI-T	0,155	0,063	0,074	0,378	-0,045	0,604
PMKI	0,181	0,030	0,104	0,216	-0,018	0,835

Santrumpos: r_s – Spirmeno koreliacijos koeficientas, DHEA – dehidroepiandrosteronas, PSS – subjektyviai suvokto streso skalė, STAI-T – asmenybinio nerimastingumo skalė, PMKI – Pitsburgo miego kokybės indeksas

6. REZULTATŲ APTARIMAS

6.1. Efektyviosios skysčių chromatografijos ir tandeminės masių spektrometrijos pritaikymas steroidinių hormonų tyrimams plaukų ėminiuose

Šiame moksliniame darbe optimizuotos plaukų ėminių paruošimo analizei procedūros ir chromatografinio atskyrimo sąlygos, parinktos MS/MS detektavimo sąlygos septynių steroidinių hormonų (kortizolio, kortizono, dehidroepiandrosterono, progesterono, 17α -hidroksiprogestero, estradiolio, testosterono) kiekybiniam įvertinimui plaukų ėminiuose.

Analitėms atskirti judri fazė buvo formuojama iš dviejų eliuentų: metanolio ir 0,05 % acto rūgšties vandeninio tirpalo. Steroidinių hormonų tyrimams buvo naudojama teigiama elektropurkštuvinė jonizacija, todėl kaip vienas iš eliuentų pasirinktas 0,05 % acto rūgšties vandeninis tirpalas tokiu būdu padidinant jonizacijos efektyvumą. Kitų tyrėjų publikuotose metodikose pateikiami įvairūs chromatografiniam atskyrimui naudojamų tirpiklių deriniai: 0,1 % skruzdžių rūgšties vandeninis tirpalas su 10 mM amonio formiato priedu / acetonitrilas ir metanolis (1:1, v/v) su 0,1 % skruzdžių rūgšties ir 1 mM amonio formiato priedu [76], 1,25 mM amonio acetato vandeninis tirpalas / metanolis su 1,25 mM amonio acetato priedu [77], vanduo ir metanolis su 0,2 mM amonio fluorida priedu (97:3, v/v) / vanduo ir metanolis su 0,2 mM amonio fluorida priedu (3:97, v/v) [78], metanolis ir vanduo su 2,0 mM amonio acetato priedu (90:10, v/v) / metanolis ir vanduo su 2,0 mM amonio acetato priedu (5:95, v/v) [63]. Mūsų tyrime naudoto judrios fazės srauto greitis – 0,4 ml/min, įleidžiamo mėginio tūris – 10 µl. Literatūros duomenimis, kituose tyrimuose naudotas panašus judrios fazės srauto greitis, varijuojantis nuo 0,25 ml/min iki 0,5 ml/min [63,76–78], tačiau didesnis įleidžiamo mėginio tūris (40–100 µl) [63, 77].

Parinkdami optimalias MS/MS detektavimo sąlygas naudojome elektro-srauto jonizacijos šaltinį, esant teigiamai jonizacijai. Daugumoje anksčiau aprašytų metodikų taip pat naudoti elektro-srauto jonizacijos šaltiniai [76–78], išskyrus W. Gao su kolegomis [63] publikuotą metodiką, kurioje kortizolio, kortizono, testosterono, progesterono, kortikosterono, DHEA ir androstenediono jonizacijai parinktas atmosferos slėgio cheminės jonizacijos šaltinis (teigiama jonizacija). Tiek šiame moksliniame darbe, tiek kitų autorių darbuose pasirinktas itin dideliu detektavimo jautriu pasižymintis daugialypių reakcijų stebėjimo režimas.

Vertindami pagrindines metodo analizines charakteristikas nustatėme, jog mūsų įdiegtas metodas turi labai panašias [76, 78] arba net žemesnes [77] analičių aptikimo ir nustatymo ribas nei anksčiau publikuotuose tyrimuose. Išskirtiniu jautrumu pasižymi W. Gao ir bendraautorių [63] įdiegta metodika, kurioje visų tirtų hormonų nustatymo ribų vertės yra apie 10 kartų mažesnės, palyginti su mūsų ir kitų tyrėjų įdiegtais metodais. Pažymėtina, jog pastarajame tyrime autoriai į metodiką įtraukė papildomą ekstrakto gryninimo etapą – automatizuotą kietafazę ekstrakciją (angl. *on-line solid phase extraction*). Aprašytoje metodikoje nurodoma, jog kietafazės ekstrakcijos metodu išgrynintas mėginys yra tiesiogiai įleidžiamas į chromatografinę sistemą taip sumažinant laiko sąnaudas ir pagerinant analičių nustatymo jautrį [63]. Nors mūsų laboratorijoje įdiegto metodo jautrumas yra palyginimas su kitų tyrėjų darbuose pateikiamomis LoQ vertėmis, dirbant su realiais plaukų ėminiais dėl nepakankamo analizei ėminio kiekio ir (ar) per mažo metodo analizinio jautrumo ne visuose plaukų ėminiuose pavyko kiekybiškai patikimai įvertinti steroidinių hormonų koncentracijas. Mūsų tirtoje imtyje tik 68 (46,9 %) tiriamosioms pavyko nustatyti 17α -hidroksiprogesterono koncentraciją, estradiolio koncentraciją plaukuose įvertinome tik 21 (14,5 %) tiriamajai, o testosterono koncentracija plaukuose nustatyta 78 (53,8 %) tiriamosioms (5.3.1 poskyrio 15 lentelė). Tokius rezultatus iš dalies galima paaiškinti į mūsų tyrimą įtrauktų tiriamųjų amžiaus grupe – tyrime dalyvavo 50–64 m. amžiaus moterys, todėl tikėtina, jog lytinių hormonų koncentracijos net ir taikant dideliu jautrumu pasižyminčius metodus yra labai mažos ir neišmatuojamos dėl fiziologinių priežasčių, t. y. prasidėjusio perimenopauzės ar menopauzės laikotarpio. Šiaip ar taip, siekiant dar labiau padidinti analizės jautrį, būtina tobulinti steroidinių hormonų tyrimams naudojamus ėminio paruošimo analizei metodus, chromatografinio atskyrimo bei MS/MS detektavimo sąlygas.

6.2. Steroidiniai hormonai plaukuose ir antropometriniai bei arterinio kraujo spaudimo rodikliai

Šio darbo rezultatai parodė, jog intensyvesnė gliukokortikoidų sekrecija (didesnės kortizolio ir/ar kortizono koncentracijos plaukuose) yra statistiškai reikšmingai susijusi su didesnėmis pagrindinių antropometrinių rodiklių (KMI, liemens apimties) vertėmis. Pažymėtina, jog vidutinio ir vyresnio amžiaus moterų imtyje tik kortizono koncentraciją plaukuose siejo statistiškai reikšmingas ryšys su KMI vertėmis. Tokie tyrimų rezultatai papildė Eline van der Valk su kolegomis [90] publikuotas 115 skirtingų tyrimų duomenis apibendrinančios metaanalizės rezultatus, kurie atskleidė labai silpnus ($0,10 \leq$

$r \leq 0,18$), tačiau statistiškai reikšmingus ryšius tarp gliukokortikoidų koncentracijų plaukuose ir KMI bei liemens apimties verčių. Gali būti, kad padidėjusią kortizolio koncentraciją ir nutukimą sieja tiesioginis priežastinis ryšys: tiek gyvūnų modeliuose, tiek tiriant žmogaus audinių biopsinę medžiagą nustatyta sąsaja tarp padidėjusios 11β -HSD1 raiškos adipocituose ir centrinio tipo nutukimo. Tiriant kepenų biopsinę medžiagą bei gliukokortikoidų ekskreciją nustatyta, jog nutukusiems asmenims būdingas padidėjęs kortizono ir kortizolio koncentracijų santykis šlapime ir sumažėjusi 11β -HSD1 raiška hepatocituose, o tai galimai lemia kompensacinio mechanizmo aktyvaciją – padidėjusią kortizolio sekreciją antinksčiuose [91]. Nagrinėjant ryšį tarp lėtinio streso ir nutukimo neatmestina ir kitų kintamųjų įtaka: tiriant aukštą lėtinio streso lygį patiriančias 20–50 metų amžiaus moteris parodyta, kad joms būdingas centrinio tipo nutukimas, dažnesnis kaloringo maisto vartojimas ir sumažėjusi kortizolio sekrecija, palyginti su moterimis, kurių patiriamo streso lygis žemas [92]. Manoma, jog patiriant nuolatinį stresą keičiasi mitybos įpročiai, o dažnas kaloringo maisto vartojimas yra neabejotinai siejamas su didesne nutukimo rizika ir lemia intensyvių opioidų išsiskyrimą, siejamą su sumažėjusiu PHA ašies aktyvumu. Kita vertus, tikėtina, kad susilpnėjusi kortizolio sekrecija antinksčiuose yra pakitusios 11β -HSD1 raiškos nulemtas sutrikusio kortizolio metabolizmo adipocituose ir hepatocituose rezultatas [91].

Analizuodami steroidinių hormonų koncentracijų plaukuose ryšius su tiriamųjų arteriniu kraujo spaudimu, nustatėme tiesioginę priklausomybę tarp kortizolio, kortizono bei DHEA koncentracijų plaukuose ir tyrimo dalyvių sistolinio bei diastolinio kraujo spaudimo. T. Stalder'io ir kolegų [93] atlikta metaanalizė, apibendrinanti 66 tyrimų, publikuotų 2004–2015 m., rezultatus, parodė, jog didesnė kortizolio koncentracija plaukuose yra susijusi su didesnėmis sistolinio, bet ne diastolinio kraujo spaudimo vertėmis. A. Nafisa su bendraautorais [94] 2021 m. publikuoto atvejo ir kontrolės tyrimo rezultatai parodė, jog kortizolio koncentracijos plaukuose mediana yra statistiškai reikšmingai didesnė pacientų, kuriems diagnozuota arterinė hipertenzija, palyginti su asmenimis, kurių arterinis kraujo spaudimas patenka į normos ribas. Kitame tyrime analizuotas hipertenzijos paplitimas dviejose tiriamųjų grupėse: nustatyta, jog asmenų, kurių kortizolio koncentracija plaukuose didesnė ar lygi tiriamoje imtyje apskaičiuotai medianai, hipertenzijos dažnis yra 2,23 (95 % PI [1,69; 3,03]) karto didesnis nei tiriamųjų, kurių kortizolio koncentracija plaukuose mažesnė nei mediana [95]. Ryšys tarp arterinės hipertenzijos ir ilgalaikės kortizolio sekrecijos iš dalies paaiškinamas literatūroje išsamiai aprašytu kortizolio biologiniu poveikiu. Gliukokortikoidai, kurių koncentracija kraujo plazmoje yra apie 100–1000

kartų didesnė nei aldosterono, pasižymi aukštu afiniškumu tiek gliukokortikoidų, tiek mineralkortikoidų receptoriams (MR) [36, 96]. Fiziologinėmis sąlygomis veikiant fermentui 11β -HSD2 kortizolis verčiamas kortizonu, kuris negali aktyvinti MR. Dėl šios priežasties intensyvi 11β -HSD2 raiška būdinga mineralkortikoidų organuose taikiniuose – inkstų žievinėje dalyje, gaubtinėje žarnoje, seilių ir prakaito liaukose. Esant ilgalaikiam hiperkortizolizmui 11β -HSD2 katalizinis aktyvumas yra nepakankamas, todėl kortizolis jungiasi prie MR ir imituoja aldosterono veikimą. Pastarasis pasireiškia padidėjusia Na^+ jonų reabsorbcija ir K^+ bei H^+ jonų sekrecija inkstų kanalėliuose, pasyvia vandens reabsorbcija ir padidėjusiu kraujo plazmos tūriu, o tai lemia hipokalemijos, metabolinės alkalozės ir hipertenzijos išsivystymą [36, 96, 97]. Paminėtini ir kiti gliukokortikoidų sukeltos hipertenzijos atsiradimo mechanizmai: renino-angiotenzino sistemos aktyvacija dėl suintensyvėjusios angiotenzinogeno sintezės, padidėjęs širdies ir kraujagyslių sistemos jautrumas vazokonstriktorių (pvz. endotelino-1) poveikiui, didesnis β adrenerginių receptorių jautrumas katecholaminams bei vazodilataciją skatinančių medžiagų (azoto oksido (NO), prostaciklino, prostaglandino E₂, kalikreino) sintezės slopinimas [36, 96].

Tyrimų, kuriuose nagrinėta kortizono koncentracijos plaukuose sąsaja su arterinio kraujo spaudimo vertėmis, rezultatai yra priešaringi. Linn K. Kuehl ir bendraautorii [98] publikuotame tyrime, kuriame dalyvavo 41 sveikas asmuo ir 44 depresija sergantys pacientai, statistiškai reikšmingų ryšių tarp kortizono koncentracijos plaukuose ir sistolinio bei diastolinio kraujo spaudimo verčių nenustatyta. Priešingi rezultatai aprašyti Vokietijos mokslininkų paskelbtame darbe, kuriame tirti 1 258 sveiki savanoriai ir nustatyti labai silpni, tačiau statistiškai reikšmingi ryšiai tarp kortizono koncentracijos plaukuose ir vidutinio arterinio spaudimo verčių tiek neatsižvelgus į kitų kintamųjų įtaką, tiek atsižvelgus į tokius veiksnius kaip lytis, amžius, plaukų priežiūros ypatumai, γ -glutamilttransferazės aktyvumas kraujo serume [99].

Šiame disertaciniame darbe nustatėme, jog tiek kortizolio, tiek kortizono koncentracijas plaukuose sieja statistiškai reikšmingi tiesioginiai ryšiai su tiriamųjų liemens apimtimi bei sistoliniu ir diastoliniu kraujo spaudimu, tačiau koreliacijos koeficientų skaitinės vertės rodo, jog stipresni ryšiai esti tarp minėtų klinikinių rodiklių ir kortizono koncentracijos plaukuose. Tikėtina, jog kortizono koncentracija plaukuose yra stabilesnė ir geriau atspindi kraujyje cirkuliuojančių gliukokortikoidų kiekį, nes kortizolio koncentracijai plaukuose įtakos gali turėti lokali PHA ašies aktyvacija, lemianti kortizolio sintezę plauko folikulo ląstelėse [7, 90].

Mūsų žiniomis, iki šiol nėra atlikta tyrimų, kuriuose būtų nagrinėtas DHEA koncentracijos plaukuose ryšys su širdies ir kraujagyslių ligų rizikos veiksniais. Manoma, jog DHEA biologinis poveikis pasireiškia hormonui prisijungus prie plazminėje membranoje esančių su G baltymais susijusių specifinių receptorių, taip pat nustatyta, jog DHEA tiesiogiai skatina endotelio NO sintazės (eNOS) fosforilinimą, o visa tai lemia suintensyvėjusią NO sintezę endotelio ląstelėse. Kaip jau minėta, NO pasižymi stipriu vazodilataciniu poveikiu ir apsaugo endotelio ląsteles nuo pažeidimo [100]. Tyrimai su žiurkėmis, kurioms atlikta ovariectomija, parodė, jog 3 savaites skiriant DHEA preparatus reikšmingai sumažėjo sistolinis ir diastolinis kraujo spaudimas, taip pat atkurtas kraujagyslių vazomotorinis atsakas į fenilefriną ir acetilcholiną [101]. Nepaisant aprašyto teigiamo DHEA poveikio širdies ir kraujagyslių sistemai, kohortinio daugiacentrio perspektyviojo MESA (angl. *Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*) tyrimo, vykdyto 2002–2007 m., rezultatai parodė, jog postmenopauzinio amžiaus moterims aukštesnė DHEA koncentracija kraujo serume yra susijusi su didesne hipertenzijos išsivystymo rizika, net ir atsižvelgus į tokius kintamuosius kaip etninė grupė, gyvensenos veiksniai, kūno masės indeksas (SR = 1,54 (95 % PI [1,02; 2,31]) [102]. F. Wang su kolegomis atlikta metaanalizė, į kurią įtraukta 18 klinikinių atsitiktinių imčių tyrimų, kurių trukmė ne mažesnė nei 2 savaitės, parodė, jog DHEA preparatų vartojimas neturi reikšmingo poveikio arterinio kraujo spaudimo vertėms, tačiau lemia sumažėjusią kūno riebalų ir padidėjusią kūno liesąją masę [103].

6.3. Steroidiniai hormonai plaukuose ir lipidų bei angliavandenių apykaitos rodikliai

Tiriamieji lipidų apykaitos rodiklių sąsajas su streso biologiniais žymenimis jaunų ir vidutinio amžiaus vyrų imtyje nustatyti statistiškai reikšmingi tiesioginiai ryšiai tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir bendrojo cholesterolio, MTL-cholesterolio, ne DTL-cholesterolio koncentracijų kraujo serume. Vidutinio ir vyresnio amžiaus moterų imtyje nustatyta atvirkštinė priklausomybė tarp kortizono koncentracijos plaukuose ir DTL-cholesterolio koncentracijos kraujo serume. Analizuojant mūsų ir kitų tyrėjų vykdytų tyrimų rezultatus apibendrinančių išvadų apie streso biožymenų ryšį su lipidų apykaitos rodikliais suformuluoti negalime, nes gauti rezultatai yra prieštaringi. T. Stalder'io ir kt. [99] atliktame tyrime, atsižvelgus į lytį, amžių, plaukų priežiūros ypatumus ir γ -glutamilttransferazės aktyvumą kraujo serume, nustatytos labai silpnos, tačiau statistiškai reikšmingos atvirkštinės priklausomybės tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir MTL-

cholesterolio koncentracijos kraujo serume bei kortizono koncentracijos plaukuose ir DTL-cholesterolio koncentracijos kraujo serume. L. K. Kuehl ir kt. [98] vykdytame tyrime atsižvelgus į tiriamųjų lytį nustatyta kortizolio ir kortizono koncentracijų plaukuose sąsaja su TAG koncentracija kraujo serume (atitinkamai $r_p = 0,342$ ir $r_p = 0,458$, $p < 0,01$).

Siekdami išsamiau įvertinti lipidų apykaitos sąsajas su lėtinio streso biologiniais žymenimis, moterų imtyje papildomai tyrėme apolipoproteinų B, A1, A2 ir E koncentracijas kraujo serume. Nustatėme statistiškai reikšmingą tiesioginę priklausomybę tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir apolipoproteino E (apo E) koncentracijos kraujo serume. Apo E yra 34 kDa dydžio glikoproteinas, daugiausiai sintetinamas kepenyse ir įeinantis į didelį kiekį TAG turinčių lipoproteinų, t. y. chilomikronų ir labai mažo tankio lipoproteinų (LMTL), sudėtį. Apo E svarba lipoproteinų metabolizme yra neabejotina, nes šis glikoproteinas yra hepatocitų plazminėje membranoje išsidėsčiusių heparano sulfato proteoglikanų ir MTL receptorių šeimai priklausančių baltymų ligandas. Apo E prisijungimas prie minėtų receptorių lemia efektyvų chilomikronų liekanų ir tarpinio tankio lipoproteinų (TTL) metabolizmą kepenyse. Pažymėtina, jog yra trys skirtingos apo E izoformos – apo E2, apo E3, apo E4, kurių pasiskirstymas paaiškina apie 4 % bendrojo cholesterolio koncentracijos kraujo serume variacijos, o skirtingų apo E izoformų buvimas lemia skirtingą chilomikronų liekanų ir TTL metabolizmo kepenyse efektyvumą. Nustatyta, jog apo E2 yra siejamas su mažesnėmis MTL-cholesterolio ir apo B koncentracijomis kraujo serume, o apo E4 izoforma lemia didesnes MTL-cholesterolio, apo B ir Lp(a) koncentracijas bei yra siejama su didesniu miego arterijos vidinio ir vidurinio dangalo storiu. Dėl šių priežasčių disertaciniame darbe nustatytos sąsajos tarp kortizolio ir bendrosios apo E koncentracijos reikšmei įvertinti būtų tikslinga ištirti atskirų apoE izoformų kiekius arba atlikti apoE genotipo nustatymo tyrimus [104].

Vertindami streso biožymenų ryšį su angliavandenių apykaitos rodikliais tiek moterų, tiek vyrų imtyje nustatėme silpnus, tačiau statistiškai reikšmingus tiesioginius ryšius tarp gliukokortikoidų koncentracijų plaukuose ir gliukozės kiekio kraujo serume. Gliukokortikoidų sukelta hiperglikemija aiškinama keliais molekuliniais mechanizmais [105]:

1. Kepenyse gliukokortikoidai indukuoja genų, koduojančių gliukoneogenezėje dalyvaujančius fermentus, raišką. Intensyviau vykdoma PC (angl. *pyruvate carboxylase*), PCK1 (angl. *phosphoenolpyruvate carboxykinase 1*), FBP1 (angl. *fructose-1,6-bisphosphatase 1*), PFKFB1 (angl. *6-phosphofructo-2-*

kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 1), *G6PC* (angl. *glucose-6-phosphatase*) genų raiška.

2. Griausių raumenyse ir baltajame riebaliniame audinyje gliukokortikoidai slopina gliukozės patekimą į ląsteles – slopinama insulino indukuotą GLUT4 (angl. *glucose transporter 4*) nešiklių pernaša į ląstelių plazminę membraną.
3. Griausių raumenyse gliukokortikoidai skatina baltymų katabolizmą, o baltajame riebaliniame audinyje aktyvina lipolizę – susidariusios aminorūgštys ir glicerolis naudojami kaip gliukoneogenezės substratai.
4. Hiperkortizolizmas yra susijęs su atsparumo insulinui išsivystymu periferiniuose audiniuose, o tai lemia kasos β ląstelių hiperplaziją ir hiperinsulinemiją. Esant ilgalaikiai gliukokortikoidų sekrecijai kasos β ląstelių pajėgumas silpnėja ir sintetinamas nepakankamas insulino kiekis.

Nors kitų mokslininkų vykdytuose tyrimuose sąsajų tarp lėtinio streso žymenų ir momentinės gliukozės koncentracijos kraujo serume nustatyta nebuvo [98, 99], kai kurių anksčiau atliktų tyrimų rezultatai parodė statistiškai reikšmingus tiesioginius ryšius tarp ilgalaikės PHA ašies aktyvacijos ir aukštesnių glikozilinto hemoglobino verčių [99, 106] bei didesnio 2 tipo cukrinio diabeto dažnio [53, 107, 108].

6.4. Steroidiniai hormonai plaukuose ir uždegimo rodikliai

Literatūros duomenimis, gliukokortikoidų prisijungimas prie monocitų ir neutrofilų citoplazmoje esančių gliukokortikoidų receptorių (GR) bei katecholaminų prisijungimas prie plazminėje membranoje išsidėsčiusių α ir β adrenerginių receptorių lemia pakitusią uždegiminių ir uždegimą slopinančių citokinų sekreciją. Besitęsiančio streso poveikį skirtingų tipų citokinų išsiskyrimui galima suskirstyti į tris etapus [109]:

1. Pirmajame etape mažėja uždegimą skatinančių (interleukino-1 β , interleukino-6, naviko nekrozės veiksnio α , interferono γ) ir didėja uždegimą slopinančių (interleukino-4, interleukino-10, interleukino-13) citokinų išsiskyrimas. Kortizolio ir GR kompleksas patenka į branduolį ir minėtų uždegimą skatinančių citokinų raišką slopina transkripcijos lygmenyje inaktyvindamas tam tikrus transkripcijos veiksnius ir reguliacinius baltymus: branduolio veiksnį κ B (NF- κ B), AP-1 (angl. *activator protein 1*), STAT3 (angl. *signal transducer and activator of transcription 3*) JAK-STAT (angl. *the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) signalinio

kelio veiksnius, mitogenų aktyvinamas baltymų kinazės (MAPK, angl. *mitogen-activated protein kinase*).

2. Antrajame etape dėl PHA ašies „išsekimo“ atsakas į stresą susilpnėja, išsivysto atsparumas gliukokortikoidams. Pastarojo reiškinio atsiradimas aiškinamas GR koduojančio geno raiškos slopinimu, kuri sukelia padidėjusi adrenalino ir noradrenalino koncentracija ar gliukokortikoidų indukuotas GR prisijungimas prie neigiamo gliukokortikoidų atsako elemento bei GR fosforilinimas veikiant p38 MAPK (angl. *p38 mitogen activated protein kinase*). Dėl atsparumo gliukokortikoidams slopinama IκBα (angl. *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*) raiška ir NF-κB transkripcijos veiksnys nebėra inaktyvinamas, todėl skatinama genų, atsakingų už uždegimą skatinančių citokinų sintezę, raiška.
3. Nepašalinus stresoriaus, prasideda trečiasis etapas: dėl atsparumo gliukokortikoidams ir aktyvaus NF-κB toliau didėja uždegimą skatinančių citokinų sekrecija, kuri sukelia uždegiminį procesą, siejamą su ateroskleroze ir kitomis ligomis.

Vyrų imtyje nustatėme statistiškai reikšmingus ryšius tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir neutrofilų absoliučios skaitinės vertės bei neutrofilų ir limfocitų procentinių dalių kraujyje (atitinkamai $r_s = 0,176$, $p = 0,026$, $r_s = 0,197$, $p = 0,012$; $r_s = -0,217$, $p = 0,006$), tačiau reikšmingų hormono koncentracijos sąsajų su C reaktyviojo baltymo koncentracija kraujo serume nustatyti nepavyko. Tikėtina, jog gliukokortikoidai reguliuoja tam tikrų chemokinių ir chemoatraktantų raišką, todėl turi įtakos leukocitų migracijos ir apoptozės procesams, o tai gali lemti kraujyje cirkuliuojančių leukocitų skaičiaus pokyčius [110]. Gali būti, kad lėtinio streso sukelti leukocitų tipų pasiskirstymo pokyčiai pastebėti M. Penz ir kt. [110] vykdytame tyrime: nustatyta, jog lėtinis stresas per vienerių metų stebėjimo laikotarpį lemia reikšmingai padidėjusį neutrofilų kiekį ir kortizolio koncentraciją plaukuose, o minėtų rodiklių pokyčiai reikšmingai koreliuoja tarpusavyje. Atsiranda vis daugiau duomenų, jog formuodami neutrofilų užląstelinis spąstus (angl. *neutrophil extracellular traps*) neutrofilai atlieka svarbų vaidmenį susidarant aterosklerozinei plokštei. Manoma, jog neutrofilų užląsteliniai spąstai aktyvina makrofagus, kurie išskiria IL-1β, o šis aktyvina T limfocitus pagalbininkus 17 (Th17), kurie palaiko uždegiminį procesą pritraukdami imunines ląsteles į aterosklerozinės plokštelės formavimosi vietą [111, 112].

6.5. Steroidiniai hormonai plaukuose ir rizika sirgti širdies ir kraujagyslių ligomis

Klinikinėje praktikoje sąlyginai sveikiems asmenims širdies ir kraujagyslių ligų rizika vertinama pagal Europos kardiologų draugijos rekomendacijas. 2016 m. pradėtas naudoti SCORE (angl. *Systemic Coronary Risk Estimation*) algoritmas, kuris aprašo absoliučiąją riziką mirti nuo širdies ir kraujagyslių ligų (miokardo infarkto, insulto) per artimiausius 10 metų. Algoritmas buvo pritaikytas 40–65 m. asmenims ir atsižvelgiant į tai, kokiam ŠKL rizikos regionui (didelės ar mažos rizikos) asmuo priklauso. SCORE įvertinimui apskaičiuoti buvo naudojami tokie rodikliai ar rizikos veiksniai kaip lytis, amžius, bendrojo cholesterolio koncentracija kraujo serume, sistolinis kraujo spaudimas bei rūkymas. Priklausomai nuo minėtų rodiklių verčių ar rizikos veiksnių buvimo galima SCORE įvertimo skaitinė vertė mažos ŠKL rizikos regiono asmenims svyruoja nuo 0 % iki 26 %, didelės ŠKL rizikos regiono asmenims – nuo 0 % iki 47 % [113].

2021 m. SCORE algoritmas buvo atnaujintas ir pasiūlyta naudoti SCORE2 (angl. *Systemic Coronary Risk Estimation 2*) algoritmą [5], kuris aprašo absoliučiąją riziką pirmą kartą susirgti širdies ir kraujagyslių ligomis per artimiausius 10 metų. Algoritmas buvo pritaikytas 40–69 m. asmenims ir atsižvelgiant į tai, kokiam ŠKL rizikos regionui (labai didelės, didelės, vidutinės, mažos rizikos) asmuo priklauso. SCORE2 įvertinimui apskaičiuoti naudojami tokie rodikliai ar rizikos veiksniai kaip lytis, amžius, ne DTL-cholesterolio koncentracija, sistolinis kraujo spaudimas bei rūkymas. Pažymėtina, jog skaičiuojant SCORE2 įvertį vietoje bendrojo cholesterolio koncentracijos pradėta naudoti ne DTL-cholesterolio koncentracijos skaitinė vertė. Ne DTL-cholesterolio koncentracijos nustatymas leidžia įvertinti cholesterolio koncentraciją aterogeniniuose, savo strukturoje apoB turinčiuose lipoproteinuose (chilomikronuose, LMTL, TTL, MTL). 2021 m. Europos kardiologų draugijos rekomendacijose teigiama, jog ne DTL-cholesterolio koncentracija padeda tiksliau įvertinti širdies ir kraujagyslių ligų riziką, o ypač tikslinga šį rodiklį naudoti pacientams, kuriems diagnozuota hipertriacilglicerolemija ar cukrinis diabetas. SCORE2 įvertimo skaitinė vertė mažos ŠKL rizikos regiono asmenims svyruoja nuo 1 % iki 19 %, vidutinės ŠKL rizikos regiono asmenims – nuo 1 % iki 25 %, didelės ŠKL rizikos regiono asmenims – nuo 1 % iki 32 %, labai didelės ŠKL rizikos regiono asmenims – nuo 2 % iki 46 %. Pažymėtina, jog dėl itin didelio mirtingumo nuo ŠKL Lietuva priklauso labai didelės ŠKL rizikos regionui.

Mūsų žiniomis, šis tyrimas yra pirmasis darbas, kuriame vertintas ryšys tarp SCORE2 įvertimo ir su stresu siejamų steroidinių hormonų koncentracijų.

Moterų imtyje nustatėme statistiškai reikšmingas priklausomybes tarp SCORE2 ir kortizolio ($r_s = 0,181$, $p = 0,030$) bei kortizono ($r_s = 0,253$, $p = 0,002$) koncentracijų plaukuose. Vidutinio amžiaus (40–54 m.) vyrų grupėje statistiškai reikšmingų ryšių nustatyti nepavyko. Jaunų vyrų (25–39 m.) imtyje pastebėjome tendenciją, jog didėjant ŠKL rizikos veiksnių (rūkymas, ne DTL-cholesterolis $>3,4$ mmol/l, SKS ≥ 140 mmHg) skaičiui, didėja ir kortizolio koncentracijos plaukuose vertės ($r_s = 0,211$, $p = 0,057$). S. Izawa'os ir bendraautorių [114] vykdytame tyrime nustatyta, jog atsižvelgus į tradicinius ŠKL rizikos veiksnius vidutinio ir vyresnio amžiaus vyrų imtyje didesnė kortizolio koncentracija plaukuose yra susijusi su 3,27 (95 % PI [1,28; 8,33]) karto didesne ūminio koronarinio sindromo rizika. Panašūs rezultatai publikuoti ir kitame atvejo ir kontrolės tyrime, kuriame parodyta, jog pacientų, patyrusių miokardo infarktą, kortizolio koncentracija plaukuose, atspindinti kortizolio sekreciją vieno mėnesio laikotarpiu iki miokardo infarkto, yra statistiškai reikšmingai didesnė negu kontrolinės grupės tiriamųjų (53,2 pg/mg vs. 22,2 pg/mg, $p < 0,001$) [115]. A. Nafisa ir kt. [94] publikuotame darbe pacientams, kuriems angiografiškai patvirtinta širdies vainikinių arterijų aterosklerozė, nustatyta statistiškai reikšmingai didesnė kortizolio koncentracijos plaukuose mediana negu kontrolinės grupės asmenimis (158,86 pg/mg vs. 72,77 pg/mg, $p = 0,001$). Priešingai nei aptartuose tyrimuose, šiame disertaciniame darbe gauti rezultatai rodo lėtinio streso biožymenų sąsajas su didesne ŠKL rizika sąlyginai sveikų, lėtinėmis ir ūminėmis ligomis nesergančių asmenų grupėje. Todėl tikėtina, jog ateityje objektyvūs lėtinio streso biožymenys galėtų būti naudojami ŠKL rizikai įvertinti ir šios ligos prevencijai.

Mūsų tyrimo rezultatai parodė, jog SCORE2 ir kortizono koncentracijos plaukuose ryšys yra stipresnis nei sąsaja tarp SCORE2 ir kortizolio koncentracijos plaukuose. Taip pat lyginant hormonų koncentracijų medianas pagal SCORE2 įvertį sudarytose tiriamųjų grupėse, statistiškai reikšmingi skirtumai tarp grupių nustatyti tik vertinant kortizono koncentraciją plaukuose. Todėl lėtinio streso tyrimams rekomenduojame matuoti tiek kortizolio, tiek jo biologiškai neaktyvaus metabolito kortizono koncentracijas, nes tikėtina, jog šių dviejų hormonų įvertinimas geriau atspindi ilgalaikę PHA ašies aktyvumą ir lėtinio streso lygį.

6.6. Steroidiniai hormonai plaukuose ir metabolinis sindromas

Metabolinis sindromas yra laikomas vienu iš pagrindinių širdies ir kraujagyslių ligų rizikos veiksnių. Mokslinių tyrimų duomenimis, MS yra susijęs su apie du kartus didesne ŠKL rizika ir net penkis kartus didesne 2 tipo

cukrinio diabeto išsivystymo rizika [116, 117]. Manoma, jog maždaug ketvirtadalis pasaulio suaugusių gyventojų serga MS [118].

Kadangi ilgalaikė PHA ašies aktyvacija yra siejama su centrinio tipo nutukimu, hipertenzija ir angliavandenių apykaitos sutrikimais, manoma, kad stresas galėtų būti svarbus veiksnys MS etiopatogenezėje [119–121]. Ankstesnių tyrimų rezultatai parodė, jog ilgalaikis ir labai intensyvus stresas arba ypatingą stresą sukėlusių įvykių patirtis (pvz.: atominės elektrinės sprogimas, žemės drebėjimas) yra susijusi su didesniu metabolinio sindromo ar atskirų jo kriterijų dažniu [122, 123].

Šiame disertaciniame darbe nustatėme, jog MS dažnis statistiškai reikšmingai didėja su kiekvienu kortizolio ir kortizono koncentracijų plaukuose terciliu. Taip pat pritaikę logistinės regresijos modelį parodėme, jog atsižvelgus į amžių tiriamiesiems, kurių kortizolio koncentracija plaukuose yra trečiojo tercilio intervale, būdingas 2,66 (95 % PI [1,14; 6,24], $p = 0,024$) karto didesnis šansų santykis sirgti MS, palyginti su asmenimis, kurių kortizolio koncentracija plaukuose yra pirmojo tercilio intervale. Atlikus analogišką analizę su kortizono koncentracijos plaukuose terciliais, nustatėme, jog kortizolio koncentracijoms patenkant į trečiojo tercilio intervalą šansų santykis sirgti metaboliniu sindromu didėja net 4,74 (95 % PI [1,94; 11,58]) karto. Šie rezultatai papildė L. K. Kuehl ir bendraautorių [98] vykdyto tyrimo rezultatus, kurie atskleidė reikšmingą ryšį tarp kortizolio bei kortizono koncentracijos plaukuose tercilių ir metabolinio sindromo kriterijų skaičiaus sveikų ir depresija sergančių asmenų imtyje. Atvejo ir kontrolės tyrime, kuriame dalyvavo 216 Pietų Afrikos populiacijos moterų, ryšys tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir metabolinio sindromo diagnozės nebuvo nustatytas. Taip pat kortizolio koncentracija plaukuose nebuvo susijusi su potrauminio streso sindromo ir metabolinio sindromo komorbidiskumu [124]. Tikėtina, jog tokius nevienareikšmius rezultatus gali lemti kitų, tarpininkaujančių veiksnių buvimas. Pavyzdžiui, H. M. Lehrer'io ir kt. [125] publikuotame darbe pademonstruota, jog mažesnis tiriamųjų psichologinis atsparumas ir aukštesnė kortizolio koncentracija plaukuose buvo susijusi su didesniu metabolinio sindromo sunkumo įverčiu (angl. *metabolic syndrome severity score*). Atlikus išsamesnę statistinę analizę paaiškėjo, jog psichologinis atsparumas veikia kaip tarpininkaujantis veiksnys, kuris paaiškina ryšį tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir metabolinio sindromo.

6.7. Subjektyviai vertinamas stresas, nerimas, miego kokybė ir širdies ir kraujagyslių ligų rizikos veiksniai

Nustatėme, jog pagal Pitsburgo miego kokybės indeksą prasta miego kokybė pasižymi didesnėmis tiriamosioms būdingoms statistiškai reikšmingai didesnės KMI vertės bei gliukozės ir triacilglicerolių koncentracijos kraujo serume. Taip pat rezultatai parodė statistiškai reikšmingą ryšį tarp PMKI ir riziką sirgti ŠKL atspindinčio SCORE2 įverčio. Y. Zhang su kolegomis [126] 2021 m. publikuotos metaanalizės duomenimis, nemiga yra susijusi su didesne hipertenzijos (ŠS = 1,41 (95 % PI [1,19; 1,67])), hiperglikemijos (ŠS = 1,29 (95 % PI [1,11; 1,50])) ir nutukimo rizika (ŠS = 1,31 (95 % PI [1,03; 1,67])). Turkijos mokslininkai analizavo miego kokybės ir trukmės sąsajas su Framinghamo rizikos skalės, vertinančios riziką per 10 metų susirgti koronarine širdies liga, įverčiais. Nustatyta, jog tiek trumpa (<6 val.), tiek per daug ilga (≥8 val.) miego trukmė reikšmingai didina riziką sirgti KŠL, tačiau miego kokybė, įvertinta naudojantis PMKI, reikšmingos įtakos KŠL rizikai neturi [127]. Tikslūs biologiniai mechanizmai, kaip miego trukmė ir kokybė gali būti siejamos su ŠKL, nėra žinomi. Tikėtina, jog prasta miego kokybė ar nepakankama miego trukmė skatina hormonų leptino ir grelino išsiskyrimą, o padidėjusi jų koncentracija siejama su alkio jausmo atsiradimu bei kaloringo maisto vartojimu. Minėtas fiziologinis poveikis pasireiškia didėjančia nutukimo ir angliavandenių apykaitos sutrikimų rizika [127, 128].

6.8. Subjektyvūs streso, nerimo, miego kokybės vertinimo rodikliai, alostatinio krūvio įvertis ir steroidinių hormonų koncentracijos plaukuose

Nors kortizolio, kortizono bei dehidroepiandrosterono tyrimai plaukų ėminiuose yra aprašomi kaip vertingi psichologinio ar fizinio lėtinio streso biologiniai žymenys [28, 129], tyrimų, kuriuose analizuotas ryšys tarp minėtų rodiklių ir subjektyvių streso vertinimo metodų, rezultatai yra priešaringi. Šiame disertaciniame darbe nustatėme silpną tiesioginę priklausomybę tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir subjektyviai suvokto streso skalės įverčių. Įdomu tai, jog panašūs rezultatai gauti tik keliuose anksčiau publikuotuose tyrimuose. Jungtinių Amerikos Valstijų mokslininkai ištyrė 135 savanorių (18–66 m. amžiaus) kortizolio koncentraciją plaukuose ir naudodamiesi specializuotais klausimynais įvertino bendrą subjektyviai vertinamo streso lygį (angl. *total subjective stress*), apimančią stresą namų ir kaimyninėje aplinkoje bei subjektyviai suvoktą stresą. Minėtame tyrime parodyta, jog kortizolio koncentracija plaukuose koreliuoja su bendruoju

subjektyviai vertinamo streso lygiu ($r = 0,19$, $p < 0,05$) [130]. Kito tyrimo duomenimis, didesnė kortizolio koncentracija plaukuose susijusi su didesniu respondentų subjektyviai vertinamu nerimu ($p = 0,033$), o didesnė DHEA koncentracija – su mažesniu stiprų stresą per pastaruosius tris mėnesius sukėlusių įvykių dažniu ($p = 0,025$) [29]. Kitų mokslininkų darbuose publikuoti rezultatai skiriasi nuo pirmiau apžvelgtų tyrimų. J. Ling ir kt. [131] paskelbtame darbe 20–42 m. amžiaus moterų imtyje ($n = 35$) nustatyta statistiškai reikšminga atvirkštinė koreliacija tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir subjektyviai suvokto streso skalės įverčių ($r = -0,49$, $p = 0,005$). Didesnės imties tyrime ($n = 164$), kuriame dalyvavo 18–79 m. amžiaus moterys, statistiškai reikšmingų kortizolio koncentracijos plaukuose ryšių su subjektyviai suvokto streso lygiu nenustatyta. Nepaisant to, parodyta reikšminga atvirkštinė asociacija ($\beta = -0,213$, $p = 0,006$) tarp ilgalaikės kortizolio sekrecijos ir Connor–Davidsono psichologinio atsparumo skalės įverčių, o tai leidžia daryti prielaidą jog didesnė kortizolio koncentracija plaukuose gali būti susilpnėjęsio psichologinio atsparumo stresoriaus poveikiui rodiklis [124].

Šiame darbe nustatėme silpną tiesioginę priklausomybę tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir Pitsburgo miego kokybės indekso verčių. Sąsaja tarp PHA ašies aktyvumo ir miego kokybės rodiklių nagrinėta tik keliuose tyrimuose. Kinijos mokslininkų vykdytame tyrime, kuriame dalyvavo 65-ies sveikatos priežiūros įstaigų darbuotojos, taip pat nustatytas ryšys tarp didesnės kortizolio koncentracijos plaukuose ir nemigos, įvertintos naudojantis Atėnų nemigos skale (angl. *Athens Insomnia Scale*) ($r = 0,504$, $p < 0,001$) [132]. Y. Zhang ir kt. [126] vykdyto tyrimo rezultatai parodė, jog kortizolio koncentracija plaukuose yra tarpininkaujantis veiksnys, kuris sieja pamaininį darbą su miego sutrikimais. Manoma, jog ryšys tarp padidėjusio PHA ašies aktyvumo ir miego sutrikimų yra dvikryptis: PHA ašies aktyvacija gali būti susijusi su nepakankama miego trukme, sutrumpėjusia lėtojo miego stadija, miego fragmentacija, o miego sutrikimai savo ruožtu lemia suintensyvėjusią gliukokortikoidų sekreciją [126]. Disertaciniame darbe nustatytos sąsajos tarp Pitsburgo miego kokybės indekso ir SCORE2 įverčio bei kortizolio koncentracijos plaukuose, taip pat kortizolio koncentracijos plaukuose ryšiai su SCORE2 ir ŠKL rizikos veiksniais galimai rodo tiesioginę ir netiesioginę (t. y. per PHA ašies aktyvaciją) prastos miego kokybės įtaką ŠKL rizikai.

Vyrų imtyje patiriamo streso lygį vertinome dviem metodais: atlikdami kortizolio koncentracijos plaukuose tyrimą bei skaičiuodami alostatinio krūvio įvertį. Į alostatinio krūvio įverčio skaičiavimo metodiką įtraukėme 18 rodiklių, atspindinčių širdies ir kraujagyslių sistemos, medžiagų apykaitos, imuninės sistemos veiklą, taip pat oksidacinio streso ir trombocitų aktyvacijos

žymenis. Anksčiau atliktuose tyrimuose oksidacinio streso ir trombocitų aktyvacijos žymenys nebuvo įtraukiami į alostatinio krūvio skaičiavimo metodiką, tačiau literatūroje vis daugėja duomenų apie psichosocialinio streso sąsajas su oksidaciniu stresu bei trombocitų aktyvacijos procesu. E. Kim ir bendraautorai [133], tyrę ūminio psichosocialinio streso sąsają su oksidaciniu stresu sveikų ir šizofrenija sergančių asmenų imtyje, nustatė, jog atlikus Triero socialinio streso testą redukcinei kraujo serume esančių antioksidantų (glutationo, askorbo rūgšties, taip pat fermentų, dalyvaujančių neutralizuojant reaktyviasias deguonies bei azoto formas) geba reikšmingai sumažėjo [133]. Kitame tyrime nustatyta reikšminga tiesioginė priklausomybė tarp respondentų subjektyviai suvokiamo streso lygio ir malono dialdehido koncentracijos bei atvirkštinė lėtinio streso koreliacija su redukuoto glutationo koncentracija kraujo serume [134]. Eksperimentuose, atliktuose su gyvūnų modeliais, parodyta, jog ūminis stresas neturi reikšmingo poveikio agonistų skatinamai trombocitų agregacijai, tačiau lėtinis stresas didina trombino ir ADP stimuliuojamą trombocitų agregaciją. Taip pat nustatyta, jog toks poveikis nepastebimas atlikus adrenalektomiją, todėl tikėtina, jog PHA ašies aktyvacija ir intensyvi kortizolio sekrecija veikia kaip tarpininkaujantis veiksnys, kuris paaiškina lėtinio streso ir trombocitų aktyvacijos ryšį [135]. Skirtingai nei kitų autorių publikuotose alostatinio krūvio skaičiavimo metodikose, imuninės sistemos veiklą atspindinčių rodiklių sąrašą papildėme ciklofilino A koncentracija, tačiau neįtraukėme tokių simpatinės nervų sistemos aktyvumą rodančių kintamųjų kaip adrenalino ar noradrenalino koncentracija šlapime. Ciklofilinas A yra imunofilinų šeimai priklausantis baltymas, pasižymintis peptidil-proлил *cis-trans* izomeraziniu aktyvumu ir dalyvaujantis susidarant baltymų erdvinei struktūrai. Taip pat tai sąlyginai naujas ir mažai tyrinėtas uždegimo mediatorius, skatinantis uždegiminių citokinų, ypač IL-1 β , sekreciją [136, 137]. Padidėjusi ciklofilino A koncentracija siejama su senėjimo procesu, širdies ir kraujagyslių bei kai kuriomis onkologinėmis ligomis, Alzheimerio liga, šonine amiotrofine skleroze [137].

Šiame darbe nustatyta statistiškai reikšminga tiesioginė priklausomybė tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir alostatinio krūvio įverčių papildoma anksčiau atlikto tyrimo [138] rezultatus, kurie taip pat atskleidė vidutinio stiprumo ryšį tarp minėtų rodiklių. Pastarajame tyrime [138] alostatiniam krūviui skaičiuoti buvo naudojami rodikliai, apibūdinantys SNS (adrenalino ir noradrenalino koncentracija šlapime), širdies ir kraujagyslių sistemos (liemens ir klubų apimčių santykis, KMI, SKS, DKS), imuninės sistemos (IL-6, ICAM-1, CRB, E-selektinas, fibrinogenas) veiklą, PHA ašies (kortizolio koncentracija šlapime, DHEA koncentracija kraujo serume) aktyvumą,

angliavandenių (glikozilintas hemoglobinas, HOMA-IR) ir lipidų (TAG, DTL-cholesterolio, MTL-cholesterolio koncentracija) metabolizmą. Taip pat vertindami kortizolio koncentracijos plaukuose ir alostatinio krūvio įverčio patikimumą tyrėjai pritaikė pakartotinio tyrimo metodiką (angl. *test-retest reliability*): tiriamiesiems minėtų rodiklių ir analizių tyrimai buvo atliekami dvi dienas iš eilės ir įvertintas intraklasinis koreliacijos koeficientas (ICC, angl. *intraclass correlation coefficient*). Parodyta, jog tiek kortizolio koncentracijos plaukuose matavimas, tiek alostatinio krūvio skaičiavimas yra itin patikimi rodikliai (atitinkamai ICC = 0,94 (95 % PI [0,82; 0,98], ICC = 0,88 (95 % PI [0,66; 0,96])), kurie gali būti naudojami lėtiniam stresui vertinti [138]. Pažymėtina, jog steroidinių hormonų koncentracijos plaukuose tyrimams naudojamos įvairios mėginio ruošimo technologijos bei analizės metodai [139], o į alostatinio krūvio skaičiavimus įtraukiami įvairių rodiklių deriniai, kurie taip pat gana stipriai varijuoja tarp skirtingų tyrimų [38–40, 140]. Todėl abiejų lėtinio streso vertinimo metodikų standartizavimas vis dar išlieka aktualiu ateities mokslinių tyrimų klausimu.

6.9. Tyrimo trūkumai

Šiame disertaciniame darbe vykdytas vienmomentis skerspjūvio tyrimas. Šio tipo tyrimuose nustatomas ligų ar rizikos veiksnių paplitimas, taip pat ryšiai tarp kintamųjų tiriamojoje imtyje tam tikru laiko momentu. Siekiant įvertinti priežastingumo ryšius tarp ilgalaikės su stresu siejamų steroidinių hormonų sekrecijos ir ŠKL išsivystymo rizikos ar atskirų rizikos veiksnių paplitimo tikslinga atlikti tęstinius (longitudinius) tyrimus. Taip pat tirtose moterų ir vyrų imtyse taikytos skirtingos plaukų ėminių ruošimo analizei procedūros bei skirtingi steroidinių hormonų analizės metodai. Dėl šių priežasčių neturėjome galimybės atlikti statistinės analizės bendroje tiriamųjų grupėje bei palyginti steroidinių hormonų koncentracijų plaukuose verčių vyrų ir moterų imtyse.

IŠVADOS

1. Įdiegtas dideliu jautrumu ir specifiškumu pasižymintis ESCh-MS/MS metodas septynių steroidinių hormonų (kortizolio, kortizono, dehidroepiandrosterono, testosterono, 17 α -hidroksiprogesterono, progesterono, estradiolio) koncentracijoms plaukų ėminiuose įvertinti.
2. Vertinant kortizolio, kortizono ir dehidroepiandrosterono koncentracijų plaukuose sąsajas su širdies ir kraujagyslių ligų rizikos veiksniais nustatyti statistiškai reikšmingi tiesioginiai ryšiai:
 - a) tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir liemens apimties bei arterinio kraujo spaudimo verčių moterų ir vyrų imtyse;
 - b) tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir kūno masės indekso, gliukozės, bendrojo cholesterolio, MTL-cholesterolio ir ne DTL-cholesterolio koncentracijų kraujo serume vyrų imtyje bei apolipoproteino E koncentracijos kraujo serume moterų imtyje;
 - c) tarp kortizono koncentracijos plaukuose ir kūno masės indekso, liemens apimties, arterinio kraujo spaudimo verčių, gliukozės koncentracijos kraujo serume bei dehidroepiandrosterono koncentracijos plaukuose ir arterinio kraujo spaudimo moterų imtyje.
3. Nustatyti statistiškai reikšmingi tiesioginiai ryšiai tarp gliukokortikoidų koncentracijų plaukuose ir SCORE2 įverčio, rodančio absoliučiąją riziką per 10 metų išsivystyti širdies ir kraujagyslių ligai.
4. Didesnės kortizolio ir kortizono koncentracijų plaukuose vertės statistiškai reikšmingai didina riziką sirgti metaboliniu sindromu.
5. Vyrų imtyje nustatyti statistiškai reikšmingi tiesioginiai ryšiai tarp kortizolio koncentracijos plaukuose ir alostatinio krūvio įverčio, o moterų imtyje parodyta tik labai silpna tiesioginė kortizolio koncentracijos plaukuose koreliacija su subjektyviai suvokto streso skalės bei Pitsburgo miego kokybės indekso vertėmis.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. World Health Organisation. Cardiovascular diseases (CVDs). Prieiga internete: [https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (žiūrėta 2022 m. gegužės 12 d.).
2. *Lietuva: šalies sveikatos profilis 2021*; OECD: Paryžius, **2021**; ISBN 9789264492981.
3. Jagannathan, R.; Patel, S.A.; Ali, M.K.; Narayan, K.M.V. Global updates on cardiovascular disease mortality trends and attribution of traditional risk factors. *Curr. Diab. Rep.* **2019**, *19*, 1–12, doi:10.1007/s11892-019-1161-2.
4. Steptoe, A.; Kivimaki, M. Stress and cardiovascular disease: an update on current knowledge. *Annu. Rev. Public Health* **2013**, *34*, 337–354, doi:10.1146/annurev-publhealth-031912-114452.
5. Visseren, F.L.J.; Mach, F.; Smulders, Y.M.; Carballo, D.; Koskinas, K.C.; Böck, M.; Benetos, A.; Biffi, A.; Boavida, J.-M.; Capodanno, D.; et al. 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur. J. Prev. Cardiol.* **2021**, 1–111, doi:10.1093/eurjpc/zwab154.
6. Nicolaides, N.C.; Kyratzi, E.; Lamprokostopoulou, A.; Chrousos, G.P.; Charmandari, E. Stress, the stress system and the role of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation* **2014**, *22*, 6–19, doi:10.1159/000362736.
7. Iob, E.; Steptoe, A. Cardiovascular disease and hair cortisol: a novel biomarker of chronic stress. *Curr. Cardiol. Rep.* **2019**, *21*, doi:10.1007/s11886-019-1208-7.
8. Dar, T.; Radfar, A.; Abohashem, S.; Pitman, R.K.; Tawakol, A.; Osborne, M.T. Psychosocial stress and cardiovascular disease. *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.* **2019**, *21*, 1–17, doi:10.1007/s11936-019-0724-5.
9. Gray, M.J.; Litz, B.T.; Hsu, J.L.; Lombardo, T.W. Psychometric properties of the life events checklist. *Assessment* **2004**, *11*, 330–341, doi:10.1177/1073191104269954.
10. Cohen, S., Kamarck, T., Mermelstein, R. A global measure of perceived stress. *J. Health Soc. Behav.* **1983**, *24*, 385–396.
11. Ostiguy, C.S.; Ellenbogen, M.A.; Linnen, A.M.; Walker, E.F.; Hammen, C.; Hodgins, S. Chronic stress and stressful life events in the offspring of parents with bipolar disorder. *J. Affect. Disord.* **2009**, *114*, 74–84, doi:10.1016/j.jad.2008.08.006.
12. Mauss, D.; Jarczok, M.N. The streamlined allostatic load index is associated with perceived stress in life–findings from the MIDUS study. *Stress* **2021**, *24*, 404–412, doi:10.1080/10253890.2020.1869935.
13. Phillips, R.; Kraeuter, A.K.; McDermott, B.; Lupien, S.; Sarnyai, Z.

- Human nail cortisol as a retrospective biomarker of chronic stress: a systematic review. *Psychoneuroendocrinology* **2021**, *123*, doi:10.1016/j.psyneuen.2020.104903.
14. Russell, G.; Lightman, S. The human stress response. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2019**, *15*, 525–534, doi:10.1038/s41574-019-0228-0.
 15. Hellhammer, D.H.; Wüst, S.; Kudielka, B.M. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology* **2009**, *34*, 163–171, doi:10.1016/j.psyneuen.2008.10.026.
 16. Van Uum, S.H.M.; Sauv e, B.; Fraser, L.A.; Morley-Forster, P.; Paul, T.L.; Koren, G. Elevated content of cortisol in hair of patients with severe chronic pain: a novel biomarker for stress. *Stress* **2008**, *11*, 483–488, doi:10.1080/10253890801887388.
 17. El Mili, N.; Ahabrach, H.; Cauli, O. Hair cortisol concentration as a biomarker of sleep quality and related disorders. *Life* **2021**, *11*, 1–19, doi:10.3390/life11020081.
 18. Steudte-Schmiedgen, S.; Wichmann, S.; Stalder, T.; Hilbert, K.; Muehlhan, M.; Lueken, U.; Beesdo-Baum, K. Hair cortisol concentrations and cortisol stress reactivity in generalized anxiety disorder, major depression and their comorbidity. *J. Psychiatr. Res.* **2017**, *84*, 184–190, doi:10.1016/j.jpsychires.2016.09.024.
 19. Coello, K.; Munkholm, K.; Nielsen, F.; Vinberg, M.; Kessing, L.V. Hair cortisol in newly diagnosed bipolar disorder and unaffected first-degree relatives. *Psychoneuroendocrinology* **2019**, *99*, 183–190, doi:10.1016/j.psyneuen.2018.09.020.
 20. Kristenson, M.; Orth-Gom er, K.; Kucinskiene, Z.; Bergdahl, B.; Calkauskas, H.; Balinkyniene, I.; Olsson, A.G. Attenuated cortisol response to a standardized stress test in Lithuanian versus Swedish men: The LiVicordia study. *Int. J. Behav. Med.* **1998**, *5*, 17–30, doi:10.1207/s15327558ijbm0501_2.
 21. Townsend, N.; Kazakiewicz, D.; Lucy Wright, F.; Timmis, A.; Huculeci, R.; Torbica, A.; Gale, C.P.; Achenbach, S.; Weidinger, F.; Vardas, P. Epidemiology of cardiovascular disease in Europe. *Nat. Rev. Cardiol.* **2022**, *19*, 133–143, doi:10.1038/s41569-021-00607-3.
 22. Oken, B.S.; Chamine, I.; Wakeland, W. A systems approach to stress, stressors and resilience in humans. *Behav. Brain Res.* **2015**, *282*, 144–154, doi:10.1016/j.bbr.2014.12.047.
 23. Burford, N.G.; Webster, N.A.; Cruz-Topete, D. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis modulation of glucocorticoids in the cardiovascular system. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1–16, doi:10.3390/ijms18102150.
 24. Tsigos, C.; Chrousos, G.P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosom. Res.* **2002**, *53*, 865–871, doi:10.1016/S0022-3999(02)00429-4.
 25. Crosswell, A.D.; Lockwood, K.G. Best practices for stress measurement: How to measure psychological stress in health research.

- Heal. Psychol. Open* **2020**, *7*, 1–12, doi:10.1177/2055102920933072.
26. Guidi, J.; Lucente, M.; Sonino, N.; Fava, G.A. Allostatic load and its impact on health: a systematic review. *Psychother. Psychosom.* **2020**, *90*, 11–27, doi:10.1159/000510696.
 27. Smyth, N.; Hucklebridge, F.; Thorn, L.; Evans, P.; Clow, A. Salivary cortisol as a biomarker in social science research. *Soc. Personal. Psychol. Compass* **2013**, *7*, 605–625, doi:10.1111/spc3.12057.
 28. Ullmann, E.; Barthel, A.; Petrowski, K.; Stalder, T.; Kirschbaum, C.; Bornstein, S.R. Pilot study of adrenal steroid hormones in hair as an indicator of chronic mental and physical stress. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–7, doi:10.1038/srep25842.
 29. Qiao, S.; Li, X.; Zilioli, S.; Chen, Z.; Deng, H.; Pan, J.; Guo, W. Hair measurements of cortisol, DHEA, and DHEA to cortisol ratio as biomarkers of chronic stress among people living with HIV in China: Known-group validation. *PLoS One* **2017**, *12*, 1–15, doi:10.1371/journal.pone.0169827.
 30. Storbeck, K.H.; Schiffer, L.; Baranowski, E.S.; Chortis, V.; Prete, A.; Barnard, L.; Gilligan, L.C.; Taylor, A.E.; Idkowiak, J.; Arlt, W.; et al. Steroid metabolome analysis in disorders of adrenal steroid biosynthesis and metabolism. *Endocr. Rev.* **2019**, *40*, 1605–1625, doi:10.1210/er.2018-00262.
 31. Schiffer, L.; Barnard, L.; Baranowski, E.S.; Gilligan, L.C.; Taylor, A.E.; Arlt, W.; Shackleton, C.H.L.; Storbeck, K.H. Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: a comprehensive review. *J. steroid Biochem. Mol. Biol. Biochem. Mol. Biol.* **2019**, *194*, 105439, doi:10.1016/j.jsbmb.2019.105439.
 32. Bacila, I.-A.; Elder, C.; Krone, N. Update on adrenal steroid hormone biosynthesis and clinical implications. *Arch. Dis. Child.* **2019**, *104*, 1223–1228, doi:10.1136/archdischild-2017-313873.
 33. Cole, T.J.; Short, K.L.; Hooper, S.B. The science of steroids. *Semin. Fetal Neonatal Med.* **2019**, *24*, 170–175, doi:10.1016/j.siny.2019.05.005.
 34. Ghayee, H.K.; Auchus, R.J. Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2007**, *8*, 289–300, doi:10.1007/s11154-007-9052-2.
 35. Dagklis, T.; Ravanos, K.; Makedou, K.; Kourtis, A.; Rousso, D. Common features and differences of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in male and female. *Gynecol. Endocrinol.* **2015**, *31*, 14–17, doi:10.3109/09513590.2014.959917.
 36. Barbot, M.; Ceccato, F.; Scaroni, C. The pathophysiology and treatment of hypertension in patients with Cushing’s syndrome. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 1–9, doi:10.3389/fendo.2019.00321.
 37. McEwen, B.S.; Stellar, E. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med.* **1993**, *153*, 2093–2101,

- doi:10.1001/archinte.1993.00410180039004.
38. Duong, M.T.; Bingham, B.A.; Aldana, P.C.; Chung, S.T.; Sumner, A.E. Variation in the calculation of allostatic load score: twenty-one examples from NHANES. *J Racial Ethn Heal. Disparities* **2017**, *4*, 455–461, doi:10.1007/s40615-016-0246-8.
 39. Wippert, P.-M.; Honold, V.; Wang, V.C.; Kirschbaum, C. Assessment of chronic stress: comparison of hair biomarkers and allostatic load indices. *Psychol. Res.* **2014**, *4*, 517–524, doi:10.17265/2159-5542/2014.07.001.
 40. Edes, A.N.; Crews, D.E. Allostatic load and biological anthropology. *Am. J. Phys. Anthropol.* **2017**, *162*, 44–70, doi:10.1002/ajpa.23146.
 41. Parker, H.W.; Abreu, A.M.; Sullivan, M.C.; Vadiveloo, M.K. Allostatic load and mortality: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Prev. Med.* **2022**, doi:10.1016/j.amepre.2022.02.003.
 42. Lewis, J.G. Steroid analysis in saliva: an overview. *Clin. Biochem. Rev.* **2006**, *27*, 139–46.
 43. French, D. Advances in bioanalytical techniques to measure steroid hormones in serum. *Bioanalysis* **2016**, *8*, 1203–1219, doi:10.4155/bio-2015-0025.
 44. Phillips, R.; Kraeuter, A.K.; McDermott, B.; Lupien, S.; Sarnyai, Z. Human nail cortisol as a retrospective biomarker of chronic stress: a systematic review. *Psychoneuroendocrinology* **2021**, *123*, 1–16, doi:10.1016/j.psyneuen.2020.104903.
 45. Malon, R.S.P.; Sadir, S.; Balakrishnan, M.; Córcoles, E.P. Saliva-based biosensors: noninvasive monitoring tool for clinical diagnostics. *Biomed Res. Int.* **2014**, 1–20, doi:10.1155/2014/962903.
 46. Behringer, V.; Deschner, T. Non-invasive monitoring of physiological markers in primates. *Horm. Behav.* **2017**, *91*, 3–18, doi:10.1016/j.yhbeh.2017.02.001.
 47. Greff, M.J.E.; Levine, J.M.; Abuzgaia, A.M.; Elzagallaai, A.A.; Rieder, M.J.; van Uum, S.H.M. Hair cortisol analysis: An update on methodological considerations and clinical applications. *Clin. Biochem.* **2019**, *63*, 1–9, doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.09.010.
 48. Gerber, M.; Brand, S.; Lindwall, M.; Elliot, C.; Kalak, N.; Christian, H.; Pühse, U.; Jonsdottir, I.H. Concerns regarding hair cortisol as a biomarker of chronic stress in exercise and sport science. *J. Sport. Sci. Med.* **2012**, *11*, 571–581.
 49. Koren, L.; Mokady, O.; Karaskov, T.; Klein, J.; Koren, G.; Geffen, E. A novel method using hair for determining hormonal levels in wildlife. *Anim. Behav.* **2002**, *63*, 403–406, doi:10.1006/anbe.2001.1907.
 50. Wright, K.D.; Hickman, R.; Laudenslager, M.L. Hair cortisol analysis: a promising biomarker of HPA activation in older adults. *Gerontologist* **2015**, *55*, S140–S145, doi:10.1093/geront/gnu174.
 51. Wester, V.L.; Van Rossum, E.F.C. Clinical applications of cortisol measurements in hair. *Eur. J. Endocrinol.* **2015**, *173*, M1–M10,

- doi:10.1530/EJE-15-0313.
52. Gow, R.; Thomson, S.; Rieder, M.; Uum, S. Van; Koren, G. An assessment of cortisol analysis in hair and its clinical applications. *Forensic Sci. Int.* **2010**, *196*, 32–37, doi:10.1016/j.forsciint.2009.12.040.
 53. Abell, J.G.; Stalder, T.; Ferrie, J.E.; Shipley, M.J.; Kirschbaum, C.; Kivimäki, M.; Kumari, M. Assessing cortisol from hair samples in a large observational cohort: the Whitehall II study. *Psychoneuroendocrinology* **2016**, *73*, 148–156, doi:10.1016/j.psyneuen.2016.07.214.
 54. Noppe, G. Long-term steroid hormone concentrations in healthy children, in obesity, and in disease. Doktoro disertacija, Roterdamo Erasmus universitetas, 2015, ISBN: 978-94-6182-725-8.
 55. Fischer, S.; Schumacher, S.; Skoluda, N.; Strahler, J. Fingernail cortisol – state of research and future directions. *Front. Neuroendocrinol.* **2020**, *58*, 1–6, doi:10.1016/j.yfrne.2020.100855.
 56. Meyer, J.S.; Novak, M.A. Minireview: Hair cortisol: a novel biomarker of hypothalamic-pituitary- adrenocortical activity. *Endocrinology* **2012**, *153*, 4120–4127, doi:10.1210/en.2012-1226.
 57. Lee, D.Y.; Kim, E.; Choi, M.H. Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. *BMB Rep.* **2015**, *48*, 209–216.
 58. 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*, 92–99, doi:10.1016/j.jsbmb.2015.12.022.
 59. Kroshko, T.; Kapronczai, L.; Cattet, M.R.L.; Macbeth, B.J.; Stenhouse, G.B.; Obbard, M.E.; Janz, D.M. 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, doi:10.1016/j.mex.2017.01.004.
 60. 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*, 353–358, doi:10.1016/j.talanta.2015.05.004.
 61. Herane Vives, A.; De Angel, V.; Papadopoulos, A.; Strawbridge, R.; Wise, T.; Young, A.H.; Arnone, D.; Cleare, A.J. The relationship between cortisol, stress and psychiatric illness: New insights using hair analysis. *J. Psychiatr. Res.* **2015**, *70*, 38–49, doi:10.1016/j.jpsychires.2015.08.007.
 62. Xiang, L.; Sunesara, I.; Rehm, K.E.; Marshall, G.D. A modified and cost-effective method for hair cortisol analysis. *Biomarkers* **2016**, *21*, 200–203, doi:10.3109/1354750X.2015.1130748.
 63. 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, doi:10.1016/j.jchromb.2013.03.008.
64. Taylor, A.E.; Keevil, B.; Huhtaniemi, I.T. Mass spectrometry and immunoassay: how to measure steroid hormones today and tomorrow. *Eur. J. Endocrinol.* **2015**, *173*, D1–D12, doi:10.1530/EJE-15-0338.
 65. 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*, 578–588, doi:10.3109/10253890.2012.654479.
 66. Gao, W.; Xie, Q.; Jin, J.; Qiao, T.; Wang, H.; Chen, L.; Deng, H.; Lu, Z. HPLC-FLU detection of cortisol distribution in human hair. *Clin. Biochem.* **2010**, *43*, 677–682, doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.01.014.
 67. Couchman, L.; Vincent, R.P.; Ghataore, L.; Moniz, C.F.; Taylor, N.F. Challenges and benefits of endogenous steroid analysis by LC-MS/MS. *Bioanalysis* **2011**, *3*, 2549–2572, doi:10.4155/bio.11.254.
 68. Skoluda, N.; Dettenborn, L.; Stalder, T.; Kirschbaum, C. Elevated hair cortisol concentrations in endurance athletes. *Psychoneuroendocrinology* **2012**, *37*, 611–617, doi:10.1016/j.psyneuen.2011.09.001.
 69. Gao, W.E.I.; Zhong, P.; Xie, Q.; Wang, H.; Jin, J.; Deng, H.; Lu, Z. Temporal features of elevated hair cortisol among earthquake survivors. *Psychophysiology* **2014**, *51*, 319–326, doi:10.1111/psyp.12179.
 70. Grunau, R.E.; Cepeda, I.L.; Chau, C.M.Y.; Brummelte, S.; Weinberg, J.; Lavoie, P.M.; Ladd, M.; Hirschfeld, A.F.; Russell, E.; Koren, G.; et al. Neonatal pain-related stress and *NFKBIA* genotype are associated with altered cortisol levels in preterm boys at school age. *PLoS One* **2013**, *8*, 1–10, doi:10.1371/journal.pone.0073926.
 71. Wei, J.; Sun, G.; Zhao, L.; Yang, X.; Liu, X.; Lin, D.; Li, T.; Ma, X. 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, doi:10.1016/j.jad.2015.01.023.
 72. Slominski, R.; Rovnaghi, C.R.; Anand, K.J.S. Methodological considerations for hair cortisol measurements in children. *Ther. Drug Monit.* **2015**, *37*, 812–820, doi:10.1097/FTD.0000000000000209.
 73. Karlén, J.; Ludvigsson, J.; Frostell, A.; Theodorsson, E.; Faresjö, T. Cortisol in hair measured in young adults - a biomarker of major life stressors? *BMC Clin. Pathol.* **2011**, *11*, 2–7.
 74. Hobo, Y.; Nishikawa, J.; Miyashiro, Y.; Fujikata, A. Measurement of steroid hormones by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with small amounts of hair. *Steroids* **2020**, *164*, 108732, doi:10.1016/j.steroids.2020.108732.
 75. Gaudl, A.; Kratzsch, J.; Bae, Y.J.; Kiess, W.; Thiery, 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, doi:10.1016/j.chroma.2016.07.087.
76. Dong, Z.; Wang, C.; Zhang, J.; Wang, Z. A UHPLC-MS/MS method for profiling multifunctional steroids in human hair. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 4751–4769, doi:10.1007/s00216-017-0419-2.
77. Noppe, G.; De Rijke, Y.B.; Dorst, K.; Van Den Akker, E.L.T.; Van Rossum, E.F.C. LC-MS/MS-based method for long-term steroid profiling in human scalp hair. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **2015**, *83*, 162–166, doi:10.1111/cen.12781.
78. Voegel, C.D.; Hofmann, M.; Kraemer, T.; Baumgartner, M.R.; Binz, T.M. Endogenous steroid hormones in hair: investigations on different hair types, pigmentation effects and correlation to nails. *Steroids* **2020**, *154*, 108547, doi:10.1016/j.steroids.2019.108547.
79. Raul, J.-S.; Cirimele, V.; Ludes, B.; Kintz, P. Detection of physiological concentrations of cortisol and cortisone in human hair. *Clin. Biochem.* **2004**, *37*, 1105–1111, doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.02.010.
80. Giannoglou, G.D.; Koskinas, K.C. Mental stress and cardiovascular disease: growing evidence into the complex interrelation between mind and heart. *Angiology* **2015**, *66*, 5–7, doi:10.1177/0003319714525032.
81. Rosengren, A.; Hawken, S.; Ōunpuu, S.; Sliwa, K.; Zubaid, M.; Almahmeed, W.A.; Blackett, K.N. Association of psychosocial risk factors with risk of acute myocardial infarction in 11 119 cases and 13 648 controls from 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* **2004**, *364*, 953–962.
82. Booth, J.; Connelly, L.; Lawrence, M.; Chalmers, C.; Joice, S.; Becker, C.; Dougall, N. Evidence of perceived psychosocial stress as a risk factor for stroke in adults: a meta-analysis. *BMC Neurol.* **2015**, *15*, 1–12, doi:10.1186/s12883-015-0456-4.
83. Andreou, E.; Alexopoulos, E.C.; Lionis, C.; Varvogli, L.; Gnardellis, C.; Chrousos, G.P.; Darviri, C. Perceived stress scale: reliability and validity study in Greece. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2011**, *8*, 3287–3298, doi:10.3390/ijerph8083287.
84. Julian, L.J. Measures of anxiety. *Arthritis Care Res* **2011**, *63*, 1–11, doi:10.1002/acr.20561.Measures.
85. Buysse, D.J.; Reynolds, C.F.; Monk, T.H.; Berman, S.R.; Kupfer, D.J. The Pittsburgh sleep quality index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res.* **1989**, *28*, 193–213, doi:10.1016/0165-1781(89)90047-4.
86. de Palo, E.F.; 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*, 60–65, doi:10.1016/j.cca.2009.04.006.
87. Khoschsorur, G.A.; Winklhofer-Roob, B.M.; Rabl, H.; Auer, T.; Peng,

- Z.; Schaur, R.J. Evaluation of a sensitive HPLC method for the determination of malondialdehyde, and application of the method to different biological materials. *Chromatographia* **2000**, *52*, 181–184, doi:10.1007/BF02490453.
88. Benzie, I.F.; Strain, J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76, doi:10.1006/abio.1996.0292.
89. Alberti, G.; Zimmet, P.; Shaw, J.; Grundy, S.M. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. *IDF Commun.* **2006**, 1–24.
90. van der Valk, E.; Abawi, O.; Mohseni, M.; Abdelmoumen, A.; Wester, V.; van der Voorn, B.; Iyer, A.; van den Akker, E.; Hoeks, S.; van den Berg, S.; et al. Cross-sectional relation of long-term glucocorticoids in hair with anthropometric measurements and their possible determinants: a systematic review and meta-analysis. *Obes. Rev.* **2022**, *23*, 1–21, doi:10.1111/obr.13376.
91. Incollingo Rodriguez, A.C.; Epel, E.S.; White, M.L.; Standen, E.C.; Seckl, J.R.; Tomiyama, A.J. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and cortisol activity in obesity: a systematic review. *Psychoneuroendocrinology* **2015**, *62*, 301–318, doi:10.1016/j.psyneuen.2015.08.014.
92. Tomiyama, A.J.; Dallman, M.F.; Epel, E.S. Comfort food is comforting to those most stressed: evidence of the chronic stress response network in high stress women. *Psychoneuroendocrinology* **2011**, *36*, 1513–1519, doi:10.1016/j.psyneuen.2011.04.005.
93. Stalder, T.; Steudte-Schmiedgen, S.; Alexander, N.; Klucken, T.; Vater, A.; Wichmann, S.; Kirschbaum, C.; Miller, R. Stress-related and basic determinants of hair cortisol in humans: a meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* **2017**, *77*, 261–274, doi:10.1016/j.psyneuen.2016.12.017.
94. Nafisa, A.; Wattoo, F.H.; Qayyum, M.; Gulfraz, M. The association between chronic stress, hair cortisol, and angiographically documented coronary atherosclerosis, a case-control study. *Stress* **2021**, *24*, 1008–1015, doi:10.1080/10253890.2021.1985994.
95. Bautista, L.E.; Bajwa, P.K.; Shafer, M.M.; Malecki, K.M.C.; McWilliams, C.A.; Palloni, A. The relationship between chronic stress, hair cortisol and hypertension. *Int. J. Cardiol. Hypertens.* **2019**, *2*, 1–6, doi:10.1016/j.ijchy.2019.100012.
96. Cicala, M.V.; Mantero, F. Hypertension in Cushing’s syndrome: from pathogenesis to treatment. *Neuroendocrinology* **2010**, *92*, 44–49, doi:10.1159/000314315.
97. Goodwin, J.E.; Geller, D.S. Glucocorticoid-induced hypertension. *Pediatr Nephrol* **2012**, *27*, 1059–1066, doi:10.1007/s00467-011-1928-4.
98. Kuehl, L.K.; Hinkelmann, K.; Muhtz, C.; Dettenborn, L.; Wingenfeld,

- K.; Spitzer, C.; Kirschbaum, C.; Wiedemann, K.; Otte, C. Hair cortisol and cortisol awakening response are associated with criteria of the metabolic syndrome in opposite directions. *Psychoneuroendocrinology* **2015**, *51*, 365–370, doi:10.1016/j.psyneuen.2014.09.012.
99. Stalder, T.; Kirschbaum, C.; Alexander, N.; Bornstein, S.R.; Gao, W.; Miller, R.; Stark, S.; Bosch, J.A.; Fischer, J.E. Cortisol in hair and the metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, 2573–2580, doi:10.1210/jc.2013-1056.
 100. Savineau, J.-P.; Marthan, R.; Dumas De La Roque, E. Role of DHEA in cardiovascular diseases. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85*, 718–726, doi:10.1016/j.bcp.2012.12.004.
 101. Camporez, J.P.G.; Akamine, E.H.; Davel, A.P.; Franci, C.R.; Rossoni, L.V.; De Oliveira Carvalho, C.R. Dehydroepiandrosterone protects against oxidative stress-induced endothelial dysfunction in ovariectomized rats. *J. Physiol.* **2011**, *589*, 2585–2596, doi:10.1113/jphysiol.2011.206078.
 102. Wang, L.; Szklo, M.; Folsom, A.R.; Cook, N.R.; Gapstur, S.M.; Ouyang, P. Endogenous sex hormones, blood pressure change, and risk of hypertension in postmenopausal women: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Atherosclerosis* **2012**, *224*, 228–234, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.005.
 103. Wang, F.; He, Y.; O. Santos, H.; Sathian, B.; C. Price, J.; Diao, J. The effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation on body composition and blood pressure: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Steroids* **2020**, *163*, 1–9, doi:10.1016/j.steroids.2020.108710.
 104. Marais, A.D. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. *Pathology* **2019**, *51*, 165–176, doi:10.1016/j.pathol.2018.11.002.
 105. Geraghty, A.C.; Kaufer, D. Glucocorticoid Signaling. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2015**, *872*, 253–78 ISBN 978-1-4939-2894-1.
 106. Lehrer, H.M.; Dubois, S.K.; Maslowsky, J.; Laudenslager, M.L.; Steinhardt, M.A. Hair cortisol concentration and glycated hemoglobin in African American adults. *Psychoneuroendocrinology* **2016**, *72*, 212–218, doi:10.1016/j.psyneuen.2016.06.018.
 107. Staufenbiel, S.M.; Penninx, B.W.J.H.; de Rijke, Y.B.; van den Akker, E.L.T.; van Rossum, E.F.C. Determinants of hair cortisol and hair cortisone concentrations in adults. *Psychoneuroendocrinology* **2015**, *60*, 182–194, doi:10.1016/j.psyneuen.2015.06.011.
 108. Manenschijn, L.; Schaap, L.; Van Schoor, N.M.; Van Der Pas, S.; Peeters, G.M.E.E.; Lips, P.; Koper, J.W.; Van Rossum, E.F.C. High long-term cortisol levels, measured in scalp hair, are associated with a history of cardiovascular disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, 2078–2083, doi:10.1210/jc.2012-3663.

109. Tian, R.; Hou, G.; Li, D.; Yuan, T. A possible change process of inflammatory cytokines in the prolonged chronic stress and its ultimate implications for health. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 1–8, doi:10.1155/2014/780616.
110. Penz, M.; Kirschbaum, C.; Buske-Kirschbaum, A.; Wekenborg, M.K.; Miller, R. Stressful life events predict one-year change of leukocyte composition in peripheral blood. *Psychoneuroendocrinology* **2018**, *94*, 17–24, doi:10.1016/j.psyneuen.2018.05.006.
111. Warnatsch, A.; Ioannou, M.; Wang, Q.; Papayannopoulos, V. Neutrophil extracellular traps license macrophages and Th17 cells for cytokine production in atherosclerosis. *Science* **2016**, *349*, 316–320, doi:10.1126/science.aaa8064.Neutrophil.
112. Döring, Y.; Soehnlein, O.; Weber, C. Neutrophil Extracellular Traps in Atherosclerosis and Atherothrombosis. *Circ. Res.* **2017**, *120*, 736–744, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309692.
113. Piepoli, M.F.; Hoes, A.W.; Agewall, S.; Albus, C.; Brotons, C.; Catapano, A.L.; Cooney, M.T.; Corrà, U.; Cosyns, B.; Deaton, C.; et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur. Heart J.* **2016**, *37*, 2315–2381, doi:10.1093/eurheartj/ehw106.
114. Izawa, S.; Miki, K.; Tsuchiya, M.; Yamada, H.; Nagayama, M. Hair and fingernail cortisol and the onset of acute coronary syndrome in the middle-aged and elderly men. *Psychoneuroendocrinology* **2019**, *101*, 240–245, doi:10.1016/j.psyneuen.2018.11.021.
115. Faresjö, T.; Strömberg, S.; Jones, M.; Stomby, A.; Karlsson, J.E.; Östgren, C.J.; Faresjö, Å.; Theodorsson, E. Elevated levels of cortisol in hair precede acute myocardial infarction. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–8, doi:10.1038/s41598-020-80559-9.
116. Wang, H.H.; Lee, D.K.; Liu, M.; Portincasa, P.; Wang, D.Q.H. Novel insights into the pathogenesis and management of the metabolic syndrome. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* **2020**, *23*, 189–230, doi:10.5223/pghn.2020.23.3.189.
117. Han, T.S.; Lean, M.E. A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *J. R. Soc. Med. Cardiovasc. Dis.* **2016**, *5*, 1–13, doi:10.1177/2048004016633371.
118. Saklayen, M.G. The global epidemic of the metabolic syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.* **2018**, *20*, 1–8, doi:10.1007/s11906-018-0812-z.
119. Jeong, I.-K. The role of cortisol in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Diabetes Metab. J.* **2012**, *36*, 207–210, doi:http://dx.doi.org/10.4093/dmj.2012.36.3.207.
120. Constantinopoulos, P.; Michalaki, M.; Kottorou, A.; Habeos, I.; Psyrogiannis, A.; Kalfarentzos, F.; Kyriazopoulou, V. Cortisol in tissue and systemic level as a contributing factor to the development of metabolic syndrome in severely obese patients. *Eur. J. Endocrinol.* **2015**, *172*, 69–78, doi:10.1530/EJE-14-0626.

121. Wester, V.L.; van Rossum, E.F.C. Obesity and metabolic syndrome: a phenotype of mild long-term hypercortisolism? *The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Health and Disease: Cushing's Syndrome and Beyond* 2017, 303–313, doi:10.1007/978-3-319-45950-9_15.
122. Branth, S.; Ronquist, G.; Stridsberg, M.; Hambraeus, L.; Kindgren, E.; Olsson, R.; Carlander, D.; Arnetz, B. Development of abdominal fat and incipient metabolic syndrome in young healthy men exposed to long-term stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2007**, *17*, 427–435, doi:10.1016/j.numecd.2006.03.001.
123. Takahashi, A.; Ohira, T.; Okazaki, K.; Yasumura, S.; Sakai, A.; Maeda, M.; Yabe, H.; Hosoya, M.; Ohtsuru, A.; Kawasaki, Y.; et al. Effects of psychological and lifestyle factors on metabolic syndrome following the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident: The Fukushima health management survey. *J. Atheroscler. Thromb.* **2020**, *27*, 1010–1018, doi:10.5551/jat.52225.
124. van den Heuvel, L.L.; Acker, D.; du Plessis, S.; Stalder, T.; Suliman, S.; Thorne, M.Y.; Kirschbaum, C.; Seedat, S. Hair cortisol as a biomarker of stress and resilience in South African mixed ancestry females. *Psychoneuroendocrinology* **2020**, *113*, 1–11, doi:10.1016/j.psyneuen.2019.104543.
125. Lehrer, H.M.; Steinhardt, M.A.; Dubois, S.K.; Laudenslager, M.L. Perceived stress, psychological resilience, hair cortisol concentration, and metabolic syndrome severity: a moderated mediation model. *Psychoneuroendocrinology* **2020**, *113*, 1–8, doi:10.1016/j.psyneuen.2019.104510.
126. Zhang, Y.; Shen, J.; Zhou, Z.; Sang, L.; Zhuang, X.; Chu, M.; Tian, T.; Xiao, J.; Lian, Y. Relationships among shift work, hair cortisol concentration and sleep disorders: a cross-sectional study in China. *BMJ Open* **2020**, *10*, 1–7, doi:10.1136/bmjopen-2020-038786.
127. Çakır, H.; Güneş, A.; Er, F.; Çakır, H.; Karagöz, A.; Yılmaz, F.; Öcal, L.; Zehir, R.; Emiroğlu, M.Y.; Demir, M.; et al. Evaluating the relationship of sleep quality and sleep duration with Framingham coronary heart disease risk score. *Chronobiol. Int.* **2022**, 1–8, doi:10.1080/07420528.2021.2018453.
128. Kwok, C.S.; Kontopantelis, E.; Kuligowski, G.; Gray, M.; Muhyaldeen, A.; Gale, C.P.; Peat, G.M.; Cleator, J.; Chew-Graham, C.; Loke, Y.K.; et al. Self-reported sleep duration and quality and cardiovascular disease and mortality: a dose-response meta-analysis. *J. Am. Heart Assoc.* **2018**, *7*, 1–26, doi:10.1161/JAHA.118.008552.
129. 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*, 589–601, doi:10.1016/j.psyneuen.2011.09.009.
130. O'Brien, K.M.; Tronick, E.Z.; Moore, C.L. Relationship between hair cortisol and perceived chronic stress in a diverse sample. *Stress Heal.*

- 2013**, 29, 337–344, doi:10.1002/smi.2475.
131. Ling, J.; Xu, D.; Robbins, L.B.; Meyer, J.S. Does hair cortisol really reflect perceived stress? Findings from low-income mother-preschooler dyads. *Psychoneuroendocrinology* **2020**, *111*, 1–8, doi:10.1016/j.psyneuen.2019.104478.
 132. Wang, C.; Dai, J.; Li, J. Mediating effects of hair cortisol on the mutual association of job burnout and insomnia: A retrospective exploratory study. *J. Psychiatr. Res.* **2019**, *117*, 62–67, doi:10.1016/j.jpsychires.2019.07.001.
 133. Kim, E.; Zhao, Z.; Rzasas, J.R.; Glassman, M.; Bentley, W.E.; Chen, S.; Kelly, D.L.; Payne, G.F. Association of acute psychosocial stress with oxidative stress: evidence from serum analysis. *Redox Biol.* **2021**, *47*, 102138, doi:10.1016/j.redox.2021.102138.
 134. Siddiqui, A.; Desai, N. G.; Sharma, S. B.; Aslam, M.; Sinha, U. K.; Madhu, S. V. Association of oxidative stress and inflammatory markers with chronic stress in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **2019**, *35*, 1–8, doi:10.1002/dmrr.3147.
 135. Matsuhisa, F.; Kitamura, N.; Satoh, E. Effects of acute and chronic psychological stress on platelet aggregation in mice. *Stress* **2014**, *17*, 186–192, doi:10.3109/10253890.2014.888548.
 136. Yang, W.; Bai, X.; Luan, X.; Min, J.; Tian, X.; Li, H.; Li, H.; Sun, W.; Liu, W.; Fan, W.; et al. Delicate regulation of IL-1 β -mediated inflammation by cyclophilin A. *Cell Rep.* **2022**, *38*, 110513, doi:10.1016/j.celrep.2022.110513.
 137. Nigro, P.; Pompilio, G.; Capogrossi, M. C. Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, 1–10, doi:10.1038/cddis.2013.410.
 138. Wippert, P.-M.; Honold, J.; Wang, V.; Kirschbaum, C. Assessment of chronic stress: comparison of hair biomarkers and allostatic load indices. *J. Psychol. Res.* **2014**, *4*, 517–524, doi:10.17265/2159-5542/2014.07.001.
 139. 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*, 92–99, doi:10.1016/j.jsbmb.2015.12.022.
 140. Petrovic, D.; Pivin, E.; Ponte, B.; Dhayat, N.; Pruijm, M.; Ehret, G.; Ackermann, D.; Guessous, I.; Estoppey, S.; Pechère-Bertschi, A.; et al. Sociodemographic, behavioral and genetic determinants of allostatic load in a Swiss population-based study. *Psychoneuroendocrinology* **2016**, *67*, 76–85.

DARBO APROBACIJA

Darbo rezultatai paskelbti Lietuvos ir užsienio leidiniuose, pristatyti nacionalinėse ir tarptautinėse mokslinėse konferencijose.

Straipsniai disertacijos tema:

1. **Mazgelytė E**, Burokienė N, Vysocka A, Narkevičius M, Petrėnas T, Kaminskas A, Songailienė J, Utkus A, Karčiauskaitė D. Higher levels of stress-related hair steroid hormones are associated with the increased SCORE2 risk prediction algorithm in apparently healthy women. *Journal of cardiovascular development and disease*. Basel: MDPI. eISSN 2308-3425. 2022, vol. 9, No. 3, art. no. 70, p. [1–17]. DOI: 10.3390/jcdd9030070. Citavimo rodiklis – 3,948.
2. **Mazgelytė E**, Mažeikienė A, Burokienė N, Matuzevičienė R, Linkevičiūtė A, Kučinskienė ZA, Karčiauskaitė D. Association between hair cortisol concentration and metabolic syndrome. *Open medicine*. Warszawa: Walter de Gruyter Poland. eISSN 2391-5463. 2021, vol. 16, p. 873–881. DOI: 10.1515/med-2021-0298. Citavimo rodiklis – 2,199.
3. **Mazgelytė E**, Karčiauskaitė D, Linkevičiūtė A, Mažeikienė A, Burokienė N, Matuzevičienė R, Radzevičius M, Janulionienė A, Jakaitienė A, Dindienė L, Kučinskienė ZA. Association of hair cortisol concentration with prevalence of major cardiovascular risk factors and allostatic load. *Medical Science monitor*. Melville, NY: International scientific information. ISSN 1234-1010. eISSN 1643-3750. 2019, vol. 25, p. 3573–3582. DOI: 10.12659/MSM.913532. Citavimo rodiklis – 1,918.
4. Aleknavičiūtė G, **Mazgelytė E**, Mažeikienė A, Karčiauskaitė D, Kučinskienė ZA. Steroidinių hormonų nustatymas plaukuose ir seilėse: tyrimo metodų apžvalga. *Laboratorinė medicina*. Vilnius: Lietuvos laboratorinės medicinos draugija. ISSN 1392-6470. 2019, t. 21, Nr. 3(83), p. 138–145.

5. **Mazgelytė E**, Karčiauskaitė D, Linkevičiūtė A, Kučinskienė ZA. Kortizolio koncentracijos plaukuose tyrimas ir jo reikšmė klinikinėje praktikoje bei moksliniuose tyrimuose. *Laboratorinė medicina*. Vilnius: Lietuvos laboratorinės medicinos draugija. ISSN 1392-6470. 2018, t. 20, nr. 2, p. 160–167.

Straipsniai, iš dalies susiję su disertacijos tema:

1. Bekešienė S, Smaliukienė R, Vaičaitienė R, Mažeikienė A, Larsson UG, Karčiauskaitė D, **Mazgelytė E**. Three-faceted approach to perceived stress: a longitudinal study of stress hormones, personality, and group cohesion in the real-life setting of compulsory basic military training. *Sustainability: Security Challenges in the Context of Sustainability*. Basel: MDPI. ISSN 2071-1050. 2022, vol. 14, iss. 3, art. no. 1046, p. 1–13. DOI: 10.3390/su14031046. Citavimo rodiklis – 3,251.
2. Larsson UG, Smaliukienė R, Mažeikienė A, Vaičaitienė R, Bekešienė S, **Mazgelytė E**, Karčiauskaitė D. Perceived stress and hair cortisol levels amongst conscripts during basic military training: a repeated measures study. *Military psychology*. Abingdon: Routledge Journals. ISSN 0899-5605. eISSN 1532-7876. 2022, first online, p. [1–10]. DOI: 10.1080/08995605.2021.2018902. Citavimo rodiklis – 1,298.
3. Smaliukienė R, Bekešienė S, Mažeikienė A, Larsson UG, Karčiauskaitė D, **Mazgelytė E**, Vaičaitienė R. Hair cortisol, perceived stress, and the effect of group dynamics: a longitudinal study of young men during compulsory military training in Lithuania. *International Journal of Environmental Research and Public Health: Emergent Topics in Young Adult Health Disparities*. Basel: MDPI. ISSN 1661-7827. eISSN 1660-4601. 2022, vol. 19, iss. 3, art. no. 1663, p. 1–15. DOI: 10.3390/ijerph19031663. Citavimo rodiklis – 3,390.

4. Mažeikienė A, Bekešienė S, Karčiauskaitė D, **Mazgelytė E**, Larsson UG, Petrėnas T, Kaminskas A, Songailienė J, Utkus A, Vaičaitienė R, Smaliukienė R. The association between endogenous hair steroid hormones and social environmental factors in a group of conscripts during basic military training. *International journal of environmental research and public health*. Basel: MDPI. eISSN 1660-4601. 2021, vol. 18, no. 22, art. no. 12239, p. [1–18]. DOI: 10.3390/ijerph182212239. Citavimo rodiklis – 3,390.
5. **Mazgelytė E**, Chomentauskas G, Dereškevičiūtė E, Rekienė V, Jakaitienė A, Petrėnas T, Songailienė J, Utkus A, Kučinskienė ZA, Karčiauskaitė D. Association of salivary steroid hormones and their ratios with time-domain heart rate variability indices in healthy individuals. *Journal of medical biochemistry*. Belgrade: Society of Medical Biochemists of Serbia. ISSN 1452-8258. eISSN 1452-8266. 2021, vol. 40, no. 2, p. 173-180. DOI: 10.5937/jomb0-26045. Citavimo rodiklis – 3,402.
6. **Mazgelytė E**, Rekienė V, Dereškevičiūtė E, Petrėnas T, Songailienė J, Utkus A, Chomentauskas G, Karčiauskaitė D. Effects of virtual reality-based relaxation techniques on psychological, physiological, and biochemical stress indicators. *Healthcare*. Basel: MDPI. eISSN 2227-9032. 2021, vol. 9, art. no. 1729, p. [1–14]. DOI: 10.3390/healthcare9121729. Citavimo rodiklis – 2,645.
7. Mažeikienė A, **Mazgelytė E**, Karčiauskaitė D, Burokienė N, Jablonskienė V, Linkevičiūtė A, Kučinskienė ZA. Oksidacinės ir antioksidacinės sistemos rodiklių sąsajos su psichosocialinio streso lygiu ir kortizolio koncentracija kraujo serume, seilėse bei plaukuose. *Laboratorinė medicina*. Vilnius: Laboratorinė medicina. ISSN 1392-6470. 2019, t. 21, Nr. 4, p. 163–171.
8. Strauzaitė I, **Mazgelytė E**, Karčiauskaitė D, Chomentauskas G. Biocheminių, fiziologinių ir psichologinių streso vertinimo metodų taikymas tiriant streso valdymo algoritmo efektyvumą sveikų asmenų grupėje. *Laboratorinė medicina*. Vilnius: Lietuvos laboratorinės medicinos draugija. ISSN 1392-6470. 2021, t. 23, Nr. 1, p. 26–32.

Žodiniai pranešimai:

1. **Mazgelytė E** (pranešėja), Burokienė N, Kučinskienė ZA, Karčiauskaitė D. Association between metabolic syndrome and hair steroid hormone levels in women participating in the national cardiovascular disease prevention program. 5-oji tarptautinė Evoliucinės medicinos konferencija, Vilnius, Lietuva, 2022 m. rugpjūčio 24–27 d. Pranešimas įvertintas kaip geriausias doktorantų žodinis pranešimas.
2. **Mazgelytė E.** MODY diabetas – genetinės diagnostikos iššūkiai. Virtualus mokslinis-praktinis seminaras „Genetika daugiadisciplininėje sergančiųjų retomis ligomis priežiūroje“, Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas, Lietuvos žmogaus genetikos draugija, 2022 m. kovo 25 d.
3. **Mazgelytė E.** Cukrinio diabeto tipai ir genomo veiksniai. Virtualus mokslinis-praktinis seminaras „Įgimtos ir/ar paveldimos genetinės ligos: diagnostikos iššūkiai“, Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas, 2021 m. rugsėjo 30 d.
4. **Mazgelytė E** (pranešėja), Burokienė N, Karčiauskaitė D, Kučinskienė ZA. Steroidiniai hormonai plaukuose: tyrimo metodai, sąsaja su patiriamu lėtinio streso lygiu bei rizika sirgti širdies ir kraujagyslių ligomis. 14-oji Lietuvos jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“, Kaunas, Lietuva, 2021 m. lapkričio 25 d. Pranešimas įvertintas II vieta.
5. **Mazgelytė E.** Analysis of steroid hormones in human hair samples. 15-asis Baltijos šalių laboratorinės medicinos kongresas, Ryga, Latvija, 2020 m. lapkričio 6–7 d.
6. **Mazgelytė E** (pranešėja), Kučinskienė ZA. The comparison of objective and subjective chronic stress assessment techniques. Tarptautinė doktorantų ir rezidentų konferencija, Kaunas, Lietuva, 2019 m. balandžio 9 d. Pranešimas įvertintas I vieta.

7. **Mazgelytė E** (pranešėja), Karčiauskaitė D, Linkevičiūtė A, Kučinskienė ZA. Methodological considerations for measuring hair cortisol level as a biological marker of chronic stress. Konferencija „Evoliucinė medicina: sveikata ir ligos besikeičiančioje aplinkoje“, Vilnius, Lietuva, 2018 m. birželio 5–10 d.

Stendiniai pranešimai:

1. Černiauskas L, **Mazgelytė E**, Burokienė N, Karčiauskaitė D. Discordance between low-density lipoprotein cholesterol or non-high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B based classification of atherosclerosis risk in female patients. 5-oji tarptautinė evoliucinės medicinos konferencija, Vilnius, Lietuva, 2022 m. rugpjūčio 24–27 d.
2. **Mazgelytė E**, Vysocka A, Narkevičius M, Burokienė N, Petrėnas T, Kaminskas A, Songailienė J, Utkus A, Karčiauskaitė D. Association between hair steroid hormone levels and cardiometabolic risk factors in a group of women participating in the national CVD prevention program: a cross-sectional study. 90-asis Europos aterosklerozės draugijos kongresas, Milanai, Italija, 2022 m. gegužės 22–25 d.
3. Mažeikienė A, Karčiauskaitė D, **Mazgelytė E**, Petrėnas T, Kaminskas A, Songailienė J, Utkus A. Reference values for scalp hair cortisol, cortisone, DHEA, and testosterone by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in healthy young man cohort. 24-asis IFCC-EFLM Europos šalių klinikinės chemijos ir laboratorinės medicinos kongresas, Miunchenas, Vokietija, 2022 m. balandžio 10–14 d. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. Berlin: Walter de Gruyter GmbH. ISSN 1434-6621. eISSN 1437-4331. 2021, vol. 59, suppl. 1, p. S754. DOI: 10.1515/cclm-2021-5034.
4. Černiauskas L, Radzevičius M, Matuzevičienė R, Mažeikienė A, Burokienė N, **Mazgelytė E**, Kučinskienė ZA, Karčiauskaitė D. Cholesterol efflux capacity is associated with inflammation level and monocyte-platelet aggregates in healthy men. 89-asis Europos aterosklerozės draugijos virtualus kongresas, 2021 m. gegužės 30 d. – birželio 2 d. *Atherosclerosis*. Park Shannon: Elsevier. ISSN 0021-9150. eISSN 1879-1484. 2021, vol. 331, p. e129. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2021.06.384.

5. **Mazgelytė E**, Vysocka A, Narkevičius M, Burokienė N, Petrėnas T, Kaminskas A, Songailienė J, Utkus A, Karčiauskaitė D. Association of hair steroid hormone levels with habitual sleep quality in middle-aged and older women. 51-asis tarptautinės psichoneuroendokrinologijos draugijos virtualus kongresas, 2021 m. rugsėjo 7-9 d. Psychoneuroendocrinology: vol. 131, suppl.: ISPNE 2021 Annual Meeting Abstracts. Oxford: Pergamon-Elsevier science. ISSN 0306-4530. eISSN 1873-3360. 2021, vol. 131, suppl. p. s12. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2021.105495.
6. **Mazgelytė E**, Karčiauskaitė D, Mažeikienė A, Matuzevičienė R, Burokienė N, Linkevičiūtė A, Kučinskienė ZA. Association of hair cortisol concentration with systematic coronary risk evaluation (SCORE) index. 88-asis Europos aterosklerozės draugijos virtualus kongresas, 2020 m. spalio 4–7 d. Atherosclerosis. East Park Shannon: Elsevier Ireland. ISSN 0021-9150. eISSN 1879-1484. 2020, vol. 315, abstract no. 381, p. e130. DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2020.10.400.
7. Gao W, **Mazgelytė E**, Leutner L, Kirschbaum C. Differential washout effect of five steroid hormones incorporated into hair: Can we compute a retrospective stress hormone calendar? 49-asis tarptautinis psichoneuroendokrinologijos draugijos kongresas, Milanai, Italija, 2019 m. rugpjūčio 29–31 d. Psychoneuroendocrinology. Oxford: Pergamon-Elsevier science. ISSN 0306-4530. 2019, vol. 107, suppl. S, p. 42. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2019.07.121.
8. Gao W, **Mazgelytė E**, Leutner L, Kirschbaum C. Differential washout effect of five steroid hormones incorporated into hair: Can we compute a retrospective stress hormone calendar? 45-oji kasmetinė konferencija „Psichologija ir smegenys“, Drezdenas, Vokietija, 2019 m. birželio 20–22 d., Abstract book, p. 136–137.
9. **Mazgelytė E**, Karčiauskaitė D, Matuzevičienė R, Burokienė N, Mažeikienė A, Linkevičiūtė A, Kučinskienė ZA. Association of hair cortisol concentration with the prevalence of traditional cardiovascular risk factors. 87-asis Europos aterosklerozės draugijos kongresas, Maastrichtas, Nyderlandai, 2019 m. gegužės 25–29 d. Atherosclerosis. East Park Shannon: Elsevier Ireland Ltd. ISSN 0021-9150. eISSN 1879-1484. 2019, vol. 287, p. e255–e256. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.06.787.

10. **Mazgelytė E**, Karčiauskaitė D, Matuzevičienė R, Burokienė N, Mažeikienė A, Linkevičiūtė A, Kučinskienė ZA. Objectively, but not subjectively, measured stress is associated with the prevalence of metabolic syndrome. 23-iasis IFCC-EFLM Europos šalių klinikinės chemijos ir laboratorinės medicinos kongresas, Barselona, Ispanija, 2019 m. gegužės 19–23 d. Clinica chimica acta: Amsterdam: Elsevier Science BV. ISSN 0009-8981. eISSN 1873-3492. 2019, vol. 493, suppl. 1, p. S281. DOI: 10.1016/j.cca.2019.03.580.
11. Karčiauskaitė D, **Mazgelytė E**, Matuzevičienė R, Burokienė N, Mažeikienė A, Linkevičiūtė A, Kučinskienė ZA. Association between hair cortisol concentration and atherosclerosis risk factors in healthy Lithuanian men. 14-asis Baltijos šalių laboratorinės medicinos kongresas, Vilnius, Lietuva, 2018 m. gegužės 10–12 d. Abstract book T.20 special. suppl.

Stažuotės:

1. Drezdeno technikos universitetas, Drezdenas, Vokietija (vadovas: prof. C. Kirschbaum), nuo 2019 m. vasario 18 d. iki 2019 m. kovo 2 d.
2. Tarptautinė ateroskleozės tyrimų vasaros mokykla, Praha, Čekija, nuo 2019 m. rugpjūčio 17 d. iki 2019 m. rugpjūčio 23 d.

“One thing I have learned in a long life: that all our science, measured against reality, is primitive and childlike — and yet it is the most precious thing we have.”

Albert Einstein

SUMMARY

1. ABBREVIATIONS

AL – allostatic load
BMI – body mass index
CHD – coronary heart disease
CI – confidence interval
CRP – C-reactive protein
CypA – cyclophilin A
CVD – cardiovascular disease
ESC – European Society of Cardiology
FRAP – ferric reducing ability of plasma
HDL – high-density lipoproteins
HPA axis – hypothalamic-pituitary-adrenal axis
HPLC-MS/MS – high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry
IHD – ischaemic heart disease
IQR – interquartile range
LDL – low-density lipoproteins
MDA – malondialdehyde
MetS – metabolic syndrome
non HDL – non high-density lipoproteins
US NCEP-ATP III – the United States National Cholesterol Education Program Expert Panel and Adult Treatment Panel III
OD – odds ratio
PSQI – Pittsburgh Sleep Quality Index
PSS – Perceived Stress Scale
SD – standard deviation
STAI-T – State-Trait Anxiety Inventory
TAG – triacylglycerols
UV – ultraviolet
WBC – white blood cells
WC – waist circumference

2. INTRODUCTION

2.1. Relevance of the thesis

Cardiovascular diseases (CVDs) still account for the majority of noncommunicable disease deaths with 17.9 million people affected annually [1]. Ischaemic heart disease (IHD) is the leading cause of death in Lithuania, accounting for more than one third of deaths and exceeding the European Union average 4-fold [2].

It is generally accepted that lifestyle risk factors, including unhealthy diet, low physical activity and smoking are linked to conventional CVD risk factors, such as: hypertension, obesity, dyslipidemia and hyperglycemia. Other well-known non-modifiable risk factors are older age, male gender, genetic susceptibility and family history of CVD [3]. Currently, psychosocial stress is considered an independent CVD risk factor: epidemiological data suggest that chronic stress at work and in private life is associated with a 40–50% increased occurrence of coronary heart disease (CHD) [4].

It is suggested that psychosocial stress has both a direct and indirect impact on the cardiovascular system [5]. The direct biological effect is associated with the secretion of stress hormones which leads to insulin resistance, increased heart rate and arterial blood pressure, abdominal obesity, immune system impairment, systemic and local inflammation [6–8]. An indirect effect is related to behavioural risk factors such as: smoking, unhealthy diet, alcohol consumption, low physical activity and poor adherence [7]. Although the attention to psychosocial risk factors is increasing and the impact of psychosocial stress is highlighted in the recently published European Society of Cardiology (ESC) guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice [5], the recognition of stress as a risk factor and the implementation of stress management techniques in clinical practice are still limited.

2.2. Novelty and significance of the thesis

A major obstacle in chronic stress research is the lack of a universal and validated stress measurement tool or biomarker, as distinct studies use different chronic stress evaluation techniques including: self-reported questionnaires [9, 10], interviews [11] and allostatic load index calculation [12] or measurement of cortisol in a variety of biological samples [13–15]. In this study, we evaluated chronic stress level by using questionnaires, calculating allostatic load index and measuring hair cortisol concentration.

Although all aforementioned techniques are widely used for chronic stress assessment, analysis of cortisol in scalp hair was found to be the most promising methodological approach for the evaluation of chronic stress level. Previous studies showed that an increased hair cortisol concentration is associated with severe chronic pain [16], sleep disorders [17] and psychopathologies, including major depression, anxiety [18] and bipolar disorder [19]. There are numerous studies that investigated the association between hair cortisol concentration and CVD risk factors and morbidity [7]. However, there are no data on the analysis of other stress-related steroid hormones (i.e., cortisone, dehydroepiandrosterone) and their importance in predicting CVD risk.

To date, there are no studies in Lithuania that have examined the association between objectively measured stress level and CVD risk. However, the hypothesis that psychosocial stress might be an important risk factor which could explain a very high prevalence of CVD in Lithuania was introduced in the Lithuania-Sweden project LiVicordia. It should be noted that during the project implementation period, middle-aged Lithuanian men had a 4-fold higher risk for CHD mortality compared with Swedish men. The results of the LiVicordia study showed a tendency toward higher baseline salivary and blood serum cortisol levels, as well as attenuated cortisol response to a standardized stress test in Lithuanian men compared with Swedish men [20]. These findings suggested that there might be a causal relationship between psychosocial stress and CVD morbidity and mortality in Lithuania.

The high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of 7 steroid hormones (cortisol, cortisone, dehydroepiandrosterone, 17α -hydroxyprogesterone, progesterone, testosterone, estradiol) was implemented in the current study. The study was conducted in two different study groups: apparently healthy young and middle-aged (25–55 y.o.) males and middle-aged and elderly (50–64 y.o.) females. Although epidemiological data suggest that in Europe more women than men die from CVD (2.0 vs. 1.76 million deaths annually), age-standardized rates of mortality are higher in men (women – 441 deaths/100,000 vs. men – 551 deaths/100,000), and these differences in rates are greatest in individuals aged <70 years [21].

The results of the current study are important for both fundamental and practical aspects. Understanding the association between chronic stress and CVD risk would be useful in estimating personal CVD risk and timely implementation of more effective prevention programs. Also, the development of the HPLC-MS/MS method for the quantitative determination of stress-related steroid hormones in human hair samples could be beneficial

in assessing long-term effectiveness of specific interventions like stress reduction programs for example.

2.3. Aim of the thesis

The study aimed to examine the link between stress-related hair steroid hormone levels and CVD risk factors, as well as 10-year fatal and non-fatal CVD risk in a group of apparently healthy males (25–55 y.o.) and females (50–64 y.o.).

2.4. Objectives of the thesis

1. To develop the HPLC-MS/MS method for the quantitative determination of steroid hormone levels in human hair samples.
2. To evaluate the associations between stress-related hair steroid hormone (cortisol, cortisone, dehydroepiandrosterone) levels and anthropometric measures, glucose and lipid metabolism biomarkers, as well as the SCORE2 risk prediction algorithm.
3. To evaluate the association between stress-related hair steroid hormone (cortisol, cortisone, dehydroepiandrosterone) levels and the risk of metabolic syndrome.
4. To investigate the relationship between the objective stress indicators (hair steroid hormones, allostatic load index) and self-reported stress, anxiety level and sleep quality.

2.5. Statements to be defended

1. HPLC-MS/MS is a highly specific and sensitive method for the quantitative determination of steroid hormones in human hair samples.
2. The increased long-term secretion of glucocorticoids is associated with the higher prevalence of conventional CVD risk factors and metabolic syndrome, as well as an increased 10-year fatal and non-fatal CVD risk.
3. There is a significant positive relationship between hair cortisol concentration and the allostatic load index, but only weak positive associations were observed among objective chronic stress biomarkers and self-reported stress level or sleep quality.

3. MATERIAL AND METHODS

3.1. Study participants

The research consisted of two sub-studies:

1st study (male group): The study was funded by the Research Council of Lithuania (Grant No. MIP-050/2015). The project title: “Impact of Chronic Stress on the Atherosclerosis Process: Search and Investigation of New Biomarkers” (ATEROSTRES). The project was conducted from 2015 to 2018. The study protocol was approved by the Lithuanian Bioethics Committee (No. 15820-15-807-319). Principal investigator – Prof. Habil. Dr. Zita Aušrelė Kučinskienė. The study included 163 apparently healthy males (24–55 y.o.) who were recruited consecutively from the Outpatient Department of Vilnius University Hospital Santaros Klinikos.

2nd study (female group): The study was funded by the Faculty of Medicine, Vilnius University. The project title: “Association of Hair Steroid Hormones with Chronic Stress Level and Cardiovascular Disease Risk Factors in Middle-aged and Elderly Women”. The project was conducted from 2020 to 2022. The study protocol was approved by the Lithuanian Bioethics Committee (No. 2020/8-1254-735). Principal investigator – Assoc. Prof. Dr. Dovilė Karčiauskaitė. The study included 145 apparently healthy females (50–64 y.o.) participating in the national cardiovascular disease prevention program.

3.2. The strategy of the study

In order to accomplish the aim and the main objectives of the thesis, the research was conducted according to the scheme depicted in Figure 1.

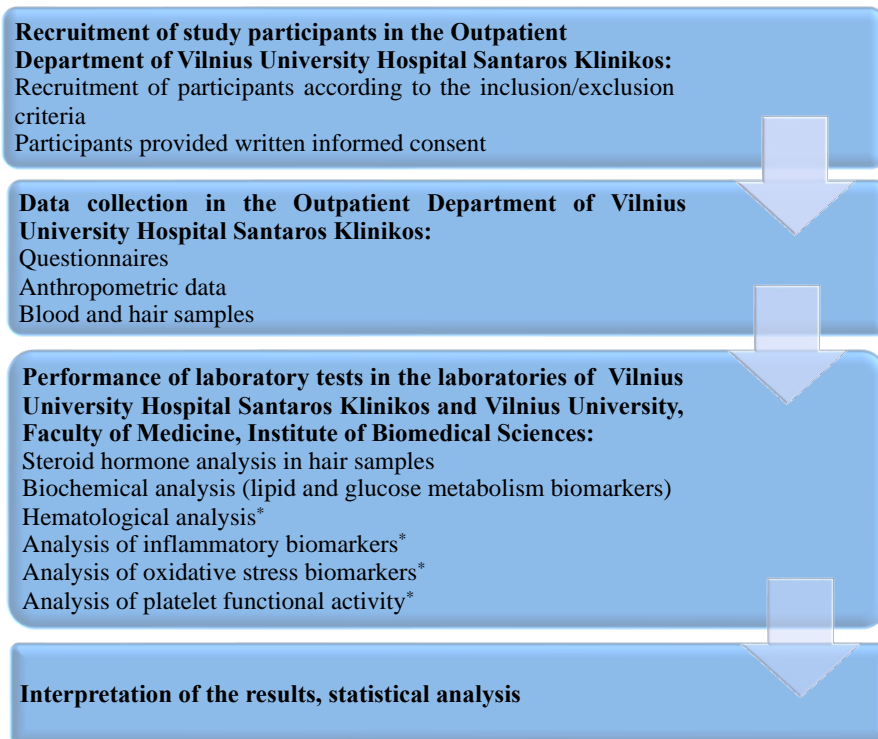


Figure 1. The strategy of the study (*marked tests were performed only in the male group)

3.3. Methods

3.3.1. Questionnaires

Each enrolled individual was asked to fill out a questionnaire in order to collect sociodemographic information (i.e., age, education level, marital status), health-related characteristics (i.e., menopause, psychologically traumatic events during the previous 3 months), data on lifestyle factors (i.e., smoking status, physical activity level).

Participants' physical activity level was assessed in different domains, including physical activity at work and during leisure time. Each physical activity domain was measured by a four-category rating scale (Score 1 – lowest physical activity, Score 4 – highest physical activity). Score 1 of physical activity at work was described as mainly sedentary work, e.g., sitting at a desk"; Score 2 – necessary to walk during work without lifting heavy items, e.g., working with clients; Score 3 – intensive walking during work, carrying heavy items, e.g., postman's work; Score 4 – intense heavy physical

work, lifting of heavy items, e.g., the work of a nurse. Score 1 of physical activity at leisure time was described as time mainly spent for reading, watching TV or theatrical performances, etc.; Score 2 – going for a walk or cycling, light work in the garden, fishing, etc. at least 4 times per week; Score 3 – time mainly spent running, swimming, playing tennis or some other similar sport; Score 4 – mainly heavy training, running, swimming, skiing, etc., and participating regularly in matches. Subjects were asked to rate their physical activity by selecting one statement from four to best describe their physical activity. The overall physical activity score was obtained by summing up the scores of both physical activity domains. Thus, a possible physical activity score could range from 2 to 8. Scores of 2 or 3 indicate a low overall physical activity level, while scores of 4–8 mean a high physical activity level.

In the 2nd sub-study (female group) we used specialized questionnaires to evaluate psychosocial stress, anxiety level and sleep quality. Psychosocial stress level was evaluated using the 10-item version of the Perceived Stress Scale (PSS), designed to measure the degree to which situations in a subject's life are appraised as stressful. Possible total PSS scores range from 0 to 40, with higher scores indicating a higher perceived stress level. PSS scores ranging from 0 to 13 are considered as low stress, 14–26 – moderate stress, and 27–40 – high stress [10]. Anxiety level was assessed by the trait scale of the State-Trait Anxiety Inventory (STAI-T). The STAI-T scale consists of 20 statements that assess how a person generally feels. Overall STAI-T scores range from 20 to 80, with higher scores indicating a greater trait anxiety level [22]. The Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI) was used to evaluate a subject's sleep quality and disturbances over the period of one month. The PSQI index consists of 19 questions, and the global PSQI index score is calculated by summing up the scores from seven different components, including: subjective sleep quality, sleep latency, sleep duration, habitual sleep efficiency, sleep disturbances, use of sleeping medications and daytime dysfunction. The global PSQI index score ranges from 0 to 21, with higher scores indicating worse sleep quality. It is estimated that a global PSQI index score lower than 5 indicates good sleep quality, while a value equal to or higher than 5 means poor sleep quality [23].

3.3.2. Steroid hormone analysis in hair samples

In the 1st sub-study (male group) samples were prepared and analyzed using the modified Raul et al. [24] and De Palo et al. [25] methods. Hair cortisol concentration was determined from the most proximal 3 cm segment of scalp hair, representing a sample of hair growth over the last 3 months.

Firstly, 20–50 mg of hair sample was weighed and finely cut with scissors, then washed twice in isopropanol and put into polypropylene tubes. Later, hair samples were incubated in 2 mL of Sorensen buffer for 16 hrs at 40°C in the presence of 10 ng 6 α -methylprednisolone as an internal standard. Each sample then was transferred to the solid-phase extraction column, which was rinsed with the sequence of solvents [25]. The supernatant was evaporated under a stream of nitrogen gas and resuspended with 100 μ L acetonitrile/water in a ratio of 2:3 (v/v). Chromatographic separation was performed on a HPLC system (Shimadzu Nexera X2). A 10- μ L sample was injected on the HPLC column (Zorbax Eclipse XDB – C8, 4.6 \times 150 mm, 5.0 μ m). The chromatographic isocratic separation was carried out with a binary mobile phase of acetonitrile and water (2:3, v/v), and UV light absorbance was measured at 245 nm wavelength. The average retention time of the cortisol was 4.12 min.

In the 2nd sub-study (female group) hair washing and steroid hormone extraction procedures were performed using the modified Gao et al. [26] method. Hair steroid hormone levels were determined from the most proximal 3 cm segment of scalp hair, representing a sample of hair growth over the last 3 months. A 10 mg of hair sample was washed by gently shaking in 3 mL of isopropanol for 3 minutes at room temperature. Samples were allowed to dry under the fume hood for at least 24 hrs. Then, 1.4 mL of methanol and 20 μ L of internal standard (cortisol-d4: 50 ng/mL, cortisone-d8: 50 ng/mL, dehydroepiandrosterone-d6: 50 ng/mL, testosterone-d3: 10 ng/mL, progesterone-d9: 20 ng/mL, estradioliol-d5: 20 ng/mL, 17 α -hydroxyprogesterone-d8: 10 ng/mL) were added, and samples were incubated for 18 hrs at 1,200 rpm at room temperature. Samples were centrifuged at 10,000 rpm for 5 min, and the clear supernatant was transferred into the polypropylene tube. The methanol was evaporated under a stream of nitrogen gas until samples were completely dried. The dry residue was resuspended with 200 μ L of methanol/water containing 0.05% acetic acid in a ratio of 1:1 (v/v). The chromatographic separation was performed on an HPLC system which consisted of two Shimadzu LC-30AD binary pumps, a Shimadzu SIL-30AC autosampler and a Shimadzu CTO-20AC column oven (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). The HPLC was coupled with a Shimadzu LCMS-8060 triple quadrupole tandem mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), which was operated in the positive ionization mode. For each analyte, two ion pairs were selected, with the most sensitive transition being used for quantification, and the rest for confirmation. The HPLC column was a YMC-Triart Bio C4 (3.0 \times 100 mm, 1.9 μ m) column. The column temperature was set at 50°C. The

method utilized a binary gradient with mobile phases containing methanol and water acidified with 0.05% acetic acid at a flow rate of 0.4 mL/min. The injection volume was 10 μ L. Data acquisition was performed by Shimadzu LabSolutions software (version 1.20).

3.3.3. Routine biochemical and hematological measurements

The biochemical and hematological analysis was performed in the Centre of Laboratory Medicine of Vilnius University Hospital Santaros Klinikos. The list of analytes, methods and analysers is shown in Table 1.

Table 1. Methods and analysers used in the Centre of Laboratory Medicine, Vilnius University Hospital Santaros Klinikos.

Analyte	Method	Analyser
Total cholesterol	Enzymatic (cholesterol esterase/cholesterol oxidase) colorimetric assay	Architect ci8200 (Abbott, USA)
LDL-cholesterol	If TAG \leq 4.5 mM calculated by Friedewald formula: LDL-cholesterol = Total cholesterol – (TAG/5) – HDL-cholesterol If TAG > 4.5 mM, selective detergent/enzymatic (cholesterol esterase/cholesterol oxidase) colorimetric assay	Architect ci8200 (Abbott, USA)
HDL-cholesterol	Selective detergent/enzymatic (cholesterol esterase/cholesterol oxidase) colorimetric assay	Architect ci8200 (Abbott, USA)
Non HDL-cholesterol	Calculated by the formula: Non HDL-cholesterol = Total cholesterol – HDL-cholesterol	
Triacylglycerols	Enzymatic (glycerol 3-phosphate oxidase) colorimetric assay	Architect ci8200 (Abbott, USA)
Apolipoprotein A1	Immunonephelometric assay	BN II (Siemens, Germany)
Apolipoprotein A2	Immunonephelometric assay	BN II (Siemens, Germany)
Apolipoprotein B	Immunonephelometric assay	BN II (Siemens, Germany)
Apolipoprotein E	Immunonephelometric assay	BN II (Siemens, Germany)

Table 1 (continued). Methods and analysers used in the Centre of Laboratory Medicine, Vilnius University Hospital Santaros Klinikos.

Analyte	Method	Analyser
Glucose	Enzymatic (hexokinase/glucose 6-phosphate dehydrogenase) colorimetric assay	Architect ci8200 (Abbott, JAV)
C-reactive protein	Immunoturbidimetric assay	Architect ci8200 (Abbott, JAV)
Hematological parameters		Sysmex XE-5000 (Sysmex Corporation, Japan)

Abbreviations: TAG – triacylglycerols, LDL – low-density lipoproteins, HDL – high-density lipoproteins, non HDL – non high-density lipoproteins.

3.3.4. Determination of cyclophilin A concentration in blood serum

Cyclophilin A (CypA) concentration in blood serum was measured using the commercial enzyme-linked immunoassay (ELISA) kit (Human CYPA (Cyclophilin A) ELISA Kit (Elabscience, China)) and the Gemini (Stratec, Germany) analyser. CypA limit of detection – 0.75 ng/mL, limit of quantification – 1.25 ng/mL, coefficient of variation – <10%

3.3.5. Analysis of oxidative stress biomarkers

Determination of malondialdehyde (MDA) concentration in blood serum was performed according to the methodology of Khoschorur et al. [27] using the HPLC with fluorescence detection. Chromatographic separation was performed on the HPLC system (Shimadzu Nexera X2). A 20- μ L sample was injected on the HPLC column (Agilent Poroshell 120 EC-C18). The chromatographic isocratic separation was carried out with a binary mobile phase of methanol and 50 mM phosphate buffer, pH 6.8 (2:3, v/v). Fluorescence detection was performed at 527 nm excitation and 551 nm emission wavelengths. The average retention time of the malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct was 1.63 min.

Antioxidant capacity was assessed by the FRAP (ferric reducing ability of plasma) assay using a slightly modified method by Benzie et al. [28]. The FRAP reagent was prepared by mixing acetate buffer (pH 3.6), TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) and FeCl₃·6H₂O solutions in the ratio 10:1:1. 100 μ L of the blood serum, 2 mL of the FRAP reagent, and 900 μ L of deionized water

were incubated for 30 min at room temperature, and the absorbance was measured at 593 nm wavelength (Shimadzu UV – 1601, Japan). All serum samples were analyzed in triplicate. FRAP value was determined from the obtained calibration curve using standard FeSO₄ solutions. Results are expressed in $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{l}$.

MDA concentration and antioxidant capacity measurements were performed by Dr. Aušra Linkevičiūtė-Dumčė.

3.3.6. Analysis of platelet functional activity

Platelet function was measured within 10 min after blood collection using flow cytometry (BD FACSCanto, BD Biosciences, USA). Data were analyzed using BD FACS Diva software (version 6.1.2). Two tubes were stained with CD42a-PerCP-Cy5.5 (glycoprotein IX) and CD61-APC (integrin $\beta 3$), which are both platelet-specific markers. A combination of forward and side scatter characteristics, together with positive expression of CD42a and CD61, was used to identify platelets. One tube was additionally stained with CD63-PE (a platelet α granule integrin), which is a marker of platelet degranulation. Another tube was additionally stained with PAC-1-FITC (platelet activation complex-1), which reacts with activated glycoprotein IIb/IIIa (integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$) and represents platelet activation/aggregation status. Platelet agonists were added to the tubes to elicit platelet activation: TRAP (thrombin receptor-activating peptide) in the tube stained with CD63, and ADP (adenosine diphosphate) in the tube with PAC-1. The results are presented as the percentage of platelets expressing the activation marker (CD63 and PAC-1) after agonist stimulation. Platelet functional activity measurements were performed by Mantas Radzevičius.

3.3.7. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the R software (version 4.0.3). The Shapiro-Wilk test was used to test the normality of variables. Quantitative variables are presented as average \pm standard deviation (SD) for normally distributed or median (IQR, interquartile range) for non-normally distributed variables. For categorical variables, absolute and relative frequencies were calculated. Spearman's (r_s , for non-normally distributed variables) or Pearson's (r_p , for normally distributed variables) correlation coefficients were used to quantify the strength of the correlation between variables. The correlation was considered as a very weak ($r \leq 0.19$), weak ($0.20 \leq r \leq 0.39$), moderate ($0.40 \leq r \leq 0.69$), strong ($0.70 \leq r \leq 0.89$) and very strong ($0.90 \leq r$

≤ 1.00). For comparison of the median (IQR) or average \pm SD values between the two groups, the Mann-Whitney U test or Student's t-test were used. The comparison of median (IQR) values among three or more groups was performed using the Kruskal-Wallis test. Dunn's post hoc test with Bonferroni correction was used for multiple comparisons. To test the hypothesis of independence between categorical variables Pearson's χ^2 or Fisher's exact test were performed. For the identification of predictors for metabolic syndrome, a binary simple and multivariable logistic regression analysis was performed, where odds ratios (OR) and 95 % confidence intervals (CI) were calculated. The level of statistical significance was set at 0.05 for two-tailed testing.

4. RESULTS

4.1. Investigation of cardiovascular disease risk in young and middle-aged men

4.1.1. Study group characteristics

The study included 163 apparently healthy men (24–55 y.o.). Self-reported data showed that most subjects were married and had attained a higher education. Also, the majority of participants were non-smokers and engaged in sedentary work. Sociodemographic and lifestyle characteristics of the study sample are shown in Table 2.

Table 2. Sociodemographic and lifestyle characteristics of the study group.

Variable	Median	IQR
Age (years)	39	16.5
Variable	n (%)	
Education¹		
Upper secondary	9 (5.6)	
Higher (university or non-university)	151 (94.4)	
Marital status¹		
Married	115 (71.9)	
Single/divorced/widowed	45 (28.1)	
Additional job¹		
Yes	39 (24.4)	
No	121 (75.6)	
Night job¹		
Yes	20 (12.5)	
No	140 (87.5)	
Smoking status¹		
Smoker	27 (16.9)	
Non-smoker	133 (83.1)	
Physical activity at work¹		
Inactive	111 (69.4)	
Walking	38 (23.8)	
Active	10 (6.2)	
Physically hard work	1 (0.6)	
Leisure-time physical activity²		
Inactive	29 (18.3)	
Walking	77 (48.4)	
Active	39 (24.5)	
Heavy exercise	14 (8.8)	

¹n=160, ²n=159

Abbreviation: IQR – interquartile range.

Descriptives of anthropometric and cardiometabolic indicators, neuroendocrine, inflammation, oxidative stress, and platelet activation biomarkers of the study sample are shown in Table 3.

Table 3. Anthropometric, cardiometabolic indicators, neuroendocrine, inflammation, oxidative stress, and platelet activation biomarkers of the study sample.

Variable	Average±SD or median (IQR)	Min	Max
Weight (kg)	84.20 (17.05)	54.30	178.00
Height (cm)	183.06±6.33	166.00	198.50
BMI (kg/m ²)	25.04 (4.75)	16.95	45.40
Waist circumference (cm)	89 (15)	69	141
Systolic blood pressure (mmHg)	129 (16.5)	93	175
Diastolic blood pressure (mmHg)	76 (13)	57	104
Heart rate (bpm)	63 (14)	40	94
Glucose (mM)	5.24 (0.52)	4.15	7.61
Total cholesterol (mM)	5.02 (1.39)	3.04	8.73
HDL-cholesterol (mM)	1.19 (0.33)	0.58	2.21
LDL-cholesterol (mM)	3.11 (1.17)	1.56	5.95
Non HDL-cholesterol (mM)	3.78 (1.49)	1.99	7.61
TAG (mM)	1.17 (0.86)	0.41	9.94
Hair cortisol (ng/g)	46.18 (119.29)	0.63	858.31
CRP (mg/L)	0.64 (0.96)	0.10	31.00
CypA (ng/mL)	43.52 (60.20)	0.33	81.00
WBC (10 ⁹ /L)	5.47 (1.52)	2.82	9.45
Neutrophils (10 ⁹ /l)	2.50 (1.02)	1.09	6.73
Lymphocytes (10 ⁹ /l)	2.09 (0.84)	0.84	4.05
Monocytes (10 ⁹ /l)	0.49 (0.21)	0.25	1.49
Neutrophils (%)	47.96±8.33	29.18	73.31
Lymphocytes (%)	38.91±8.13	14.27	59.2
Monocytes (%)	9.24±2.11	5.50	19.33
MDA (µg/L)	97.48 (35.62)	56.03	251.42
FRAP (µmol Fe ²⁺ /L)	47.67 (11.41)	28.50	79.98
CD63+ platelets stimulated with TRAP (%)	28.85 (21.05)	0.40	69.20

Table 3 (continued). Anthropometric, cardiometabolic indicators, neuroendocrine, inflammation, oxidative stress, and platelet activation biomarkers of the study sample.

Variable	Average±SD or median (IQR)	Min	Max
PAC-1+ platelets stimulated with ADP (%)	49.40 (37.20)	0.10	90.20

Abbreviations: SD – standard deviation, IQR – interquartile range, Min – minimum value, Max – maximum value, BMI – body mass index, HDL – high-density lipoproteins, LDL – low-density lipoproteins, non HDL – non high-density lipoproteins, TAG – triacylglycerols, CRP – C-reactive protein, CypA – cyclophilin A, WBC – white blood cells, MDA – malondialdehyde, FRAP – ferric reducing ability of plasma.

4.1.2. Association between cardiovascular disease risk and hair cortisol concentration

Low physical activity and smoking are the main lifestyle CVD risk factors. According to the description provided in Section 3.3.1., we evaluated individuals' overall physical activity. The results showed that 47.8% of individuals prefer an overall inactive lifestyle, while 52.2% of subjects reported being physically active. No significant differences in hair cortisol concentration median values were found between smokers and non-smokers or subjects reporting low and high physical activity levels (64.69 (130.74) ng/g vs. 39.82 (102.50) ng/g, $p = 0.113$ and 33.57 (108.35) ng/g vs. 54.90 (106.94) ng/g, $p = 0.116$, respectively).

To determine the association between hair cortisol concentration and CVD risk factors, we divided the study participants into 2 or 3 groups according to the prevalence of major risk factors including: obesity, smoking, hypertension and dyslipidemia. The manifestation of these risk factors was evaluated using the latest update of the European Society of Cardiology Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice [5]. The comparison of hair cortisol concentration between the groups based on the recommended BMI, waist circumference, systolic and diastolic blood pressure values, LDL-cholesterol, non-HDL cholesterol and TAG concentrations in blood serum is reported in **Table 4**.

Table 4. Comparison of hair cortisol concentration median values in the subject groups based on the recommended values of anthropometric, blood pressure measures and lipid metabolism biomarkers.

Variable	n	Cortisol concentration (ng/g) (median (IQR))	p-value
BMI (kg/m²)			
18.5–24.9	80	32.13 (83.25)	
25.0–29.9	57	54.68 (147.16)	0.052*
≥30.0	26	74.69 (101.85)	
Waist circumference (cm)			
<94	101	34.98 (8.41)	
≥94	61	77.16 (152.14)	0.007**
Systolic blood pressure (mmHg)			
<140	131	39.86 (118.21)	
≥140	32	52.48 (105.08)	0.253**
Diastolic blood pressure (mmHg)			
<90	144	39.22 (112.68)	
≥90	19	93.17 (101.17)	0.027**
TAG (mM)			
<1.70	120	44.38 (117.32)	
≥1.70	43	54.68 (119.88)	0.306**
LDL-cholesterol (mM)			
<2.60	38	34.09 (72.67)	
≥2.60	125	51.66 (136.15)	0.029**
Non HDL-cholesterol (mM)			
<3.40	58	36.11 (85.49)	
≥3.40	105	54.68 (134.98)	0.025**

* Kruskal–Wallis test, ** Mann–Whitney U test

Abbreviations: BMI – body mass index, TAG – triacylglycerols, LDL – low-density lipoproteins, non HDL – non high-density lipoproteins, IQR – interquartile range.

The results showed that participants with higher than recommended waist circumference and diastolic blood pressure values had a significantly higher hair cortisol concentration median (IQR) than subjects with normal waist circumference and diastolic blood pressure. Also, individuals with higher LDL-cholesterol and non HDL-cholesterol levels showed significantly higher hair cortisol concentration median (IQR) values compared to those with a normal lipid profile.

Correlation analyses revealed weak but statistically significant positive associations between hair cortisol concentration and body mass index, waist circumference, systolic and diastolic blood pressure values, glucose, total cholesterol, LDL-cholesterol and non-HDL cholesterol concentrations in blood serum, as well as the percentage of neutrophils in venous blood samples. Also, a significant negative relationship between hair cortisol concentration and the percentage of lymphocytes in venous blood samples was found in the current study (**Table 5**).

Table 5. Correlations between hair cortisol concentration and anthropometric, lipid and glucose metabolism, inflammation, oxidative stress and platelet activation biomarkers.

Variable	r_s	p-value
BMI (kg/m ²)	0.217	0.005
Waist circumference (cm)	0.211	0.007
Systolic blood pressure (mmHg)	0.339	9.55 × 10⁻⁶
Diastolic blood pressure (mmHg)	0.320	3.05 × 10⁻⁵
Glucose (mM)	0.156	0.046
Total cholesterol (mM)	0.221	0.005
HDL-cholesterol (mM)	-0.026	0.746
LDL-cholesterol (mM)	0.226	0.004
Non HDL-cholesterol (mM)	0.209	0.007
TAG (mM)	0.115	0.144
CRP (mg/L)	0.108	0.171
CypA (ng/mL)	0.090	0.260
WBC (10 ⁹ /L)	0.089	0.262
Neutrophils (10 ⁹ /l)	0,176	0,026
Lymphocytes (10 ⁹ /l)	-0,094	0,238
Monocytes (10 ⁹ /l)	0,155	0,050
Neutrophils (%)	0.197	0.012
Lymphocytes (%)	-0.217	0.006
Monocytes (%)	0.093	0.240
MDA (µg/L)	0.087	0.301
FRAP (µmol Fe ²⁺ /L)	0.102	0.203
CD63+ platelets stimulated with TRAP (%)	0.066	0.416

Table 5 (continued). Correlations between hair cortisol concentration and anthropometric, lipid and glucose metabolism, inflammation, oxidative stress and platelet activation biomarkers.

Variable	r_s	p-value
PAC-1+ platelets stimulated with ADP (%)	-0.018	0.840

Abbreviations: r_s – Spearman’s correlation coefficient, BMI – body mass index, HDL – high-density lipoproteins, LDL – low-density lipoproteins, non HDL – non high-density lipoproteins, TAG – triacylglycerols, CRP – C-reactive protein, CypA – cyclophilin A, WBC – white blood cells, MDA – malondialdehyde, FRAP – ferric reducing ability of plasma.

Further analysis was performed in two age groups of subjects: young (25–39 y.o.) and middle-aged (40–54 y.o.) males. In the group of middle-aged men, the SCORE2 risk prediction algorithm was calculated to estimate the 10-year fatal and non-fatal CVD risk. The results showed that the median (IQR) SCORE2 value is 6 (5)%, minimum value – 3%, maximum value – 19%.

According to the SCORE2 model, 15.79% of subjects had low CVD risk (SCORE2 < 5%), moderate risk ($5\% \leq \text{SCORE2} \leq 9\%$) was determined for 47.37% of men and 36.84% of subjects had high (SCORE2 $\geq 10\%$) CVD risk (Figure 2).

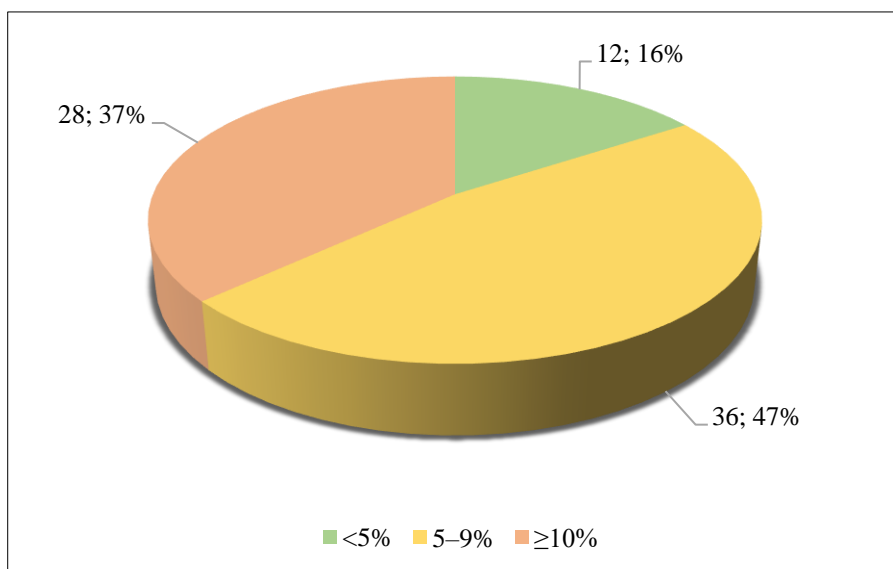


Figure 2. CVD risk based on SCORE2 values in the middle-aged male group.

The comparison of the hair cortisol concentration median (IQR) among the three groups based on SCORE2 (<5%, 5–9%, ≥10%) values revealed no statistically significant differences in hair cortisol levels (41.04 (129.02) ng/g, 63.69 (109.87) ng/g, 46.54 (115.50) ng/g, $p = 0.829$, respectively) (Figure 3).

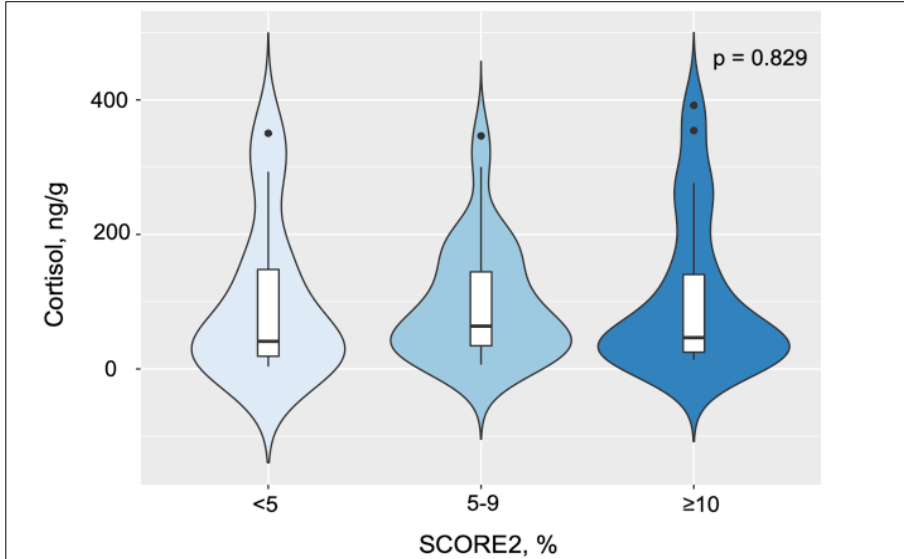


Figure 3. The comparison of hair cortisol concentration among the groups based on SCORE2 values.

Correlation analysis also revealed no statistically significant association between hair cortisol concentration and SCORE2 index ($r_s = 0.093$, $p = 0.444$) (Figure 4).

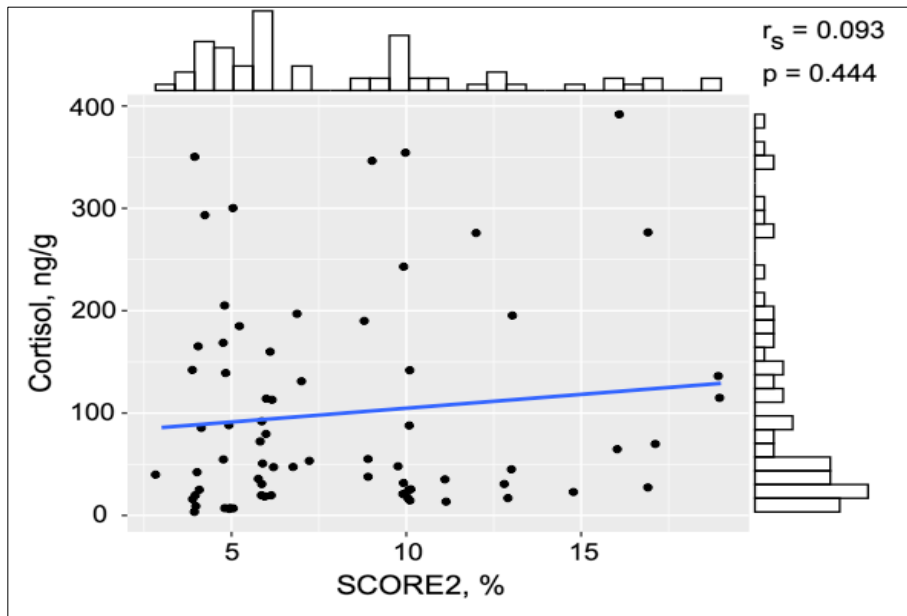


Figure 4. Correlation between hair cortisol concentration and SCORE2 index (r_s – Spearman’s correlation coefficient)

In the group of young men, the number of CVD risk factors was calculated by using biomarkers and indicators included in the SCORE2 model (smoking, non HDL-cholesterol > 3.4 mM, systolic blood pressure \geq 140 mmHg). The results indicated that 42.17% of subjects showed no evidence of increased CVD risk, 39.76% of participants had 1 risk factor, 13.25% had two risk factors and only 4.82% had 3 risk factors (Figure 5).

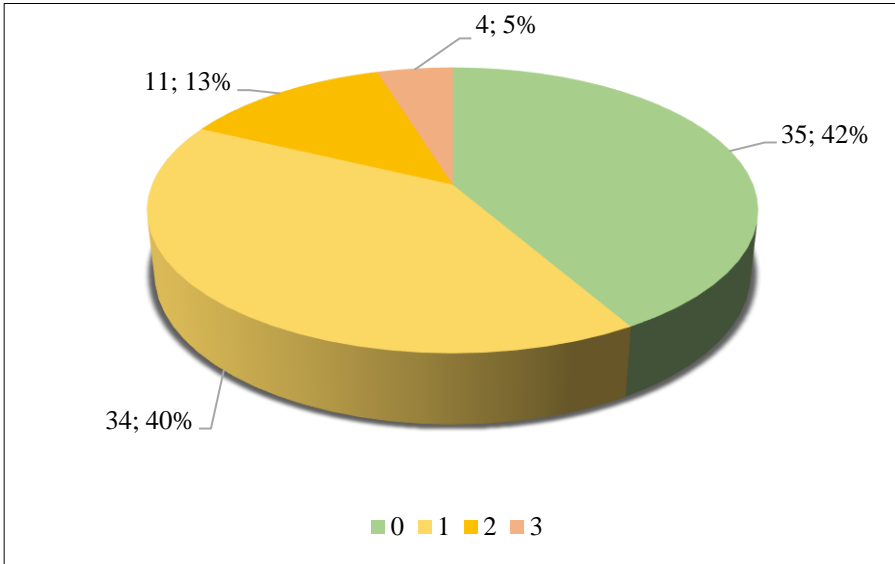


Figure 5. CVD risk based on the number of CVD risk factors in the young male group.

The comparison of the hair cortisol concentration median (IQR) among the three groups based on the number of CVD risk factors (0, 1, 2–3 risk factors) revealed a tendency toward an increasing hair cortisol level as the number of risk factors increases (15.98 (57.20) ng/g, 27.82 (61.53) ng/g, 39.54 (81.44) ng/g, respectively). However, differences in the hair cortisol concentration median (IQR) values among the three groups based on the number of CVD risk factors were not statistically significant ($p = 0.164$) (Figure 6).

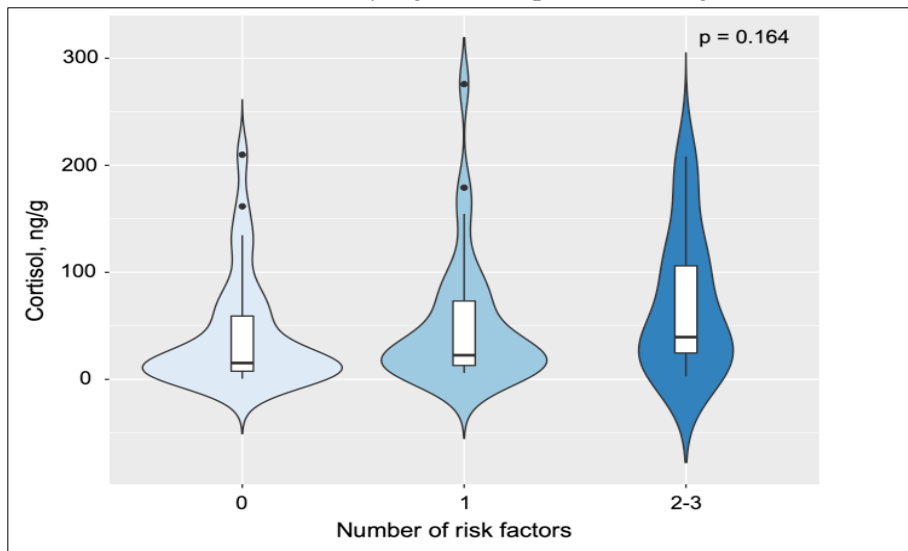


Figure 6. The comparison of hair cortisol concentration among the groups based on the number of CVD risk factors.

The correlation analysis also showed no statistically significant relationship between hair cortisol concentration and the number of CVD risk factors ($r_s = 0.211$, $p = 0.057$) (Figure 7).

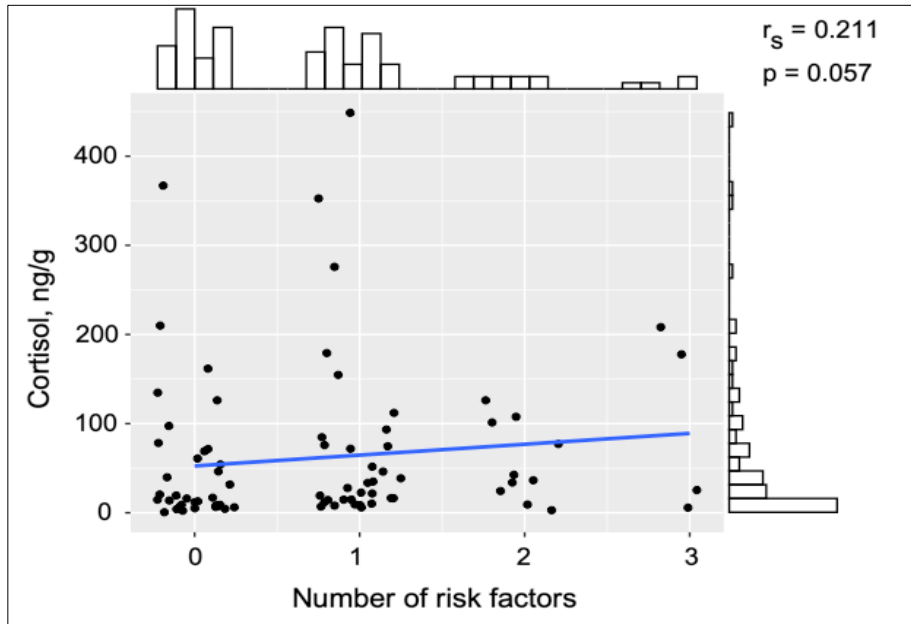


Figure 7. Correlation between hair cortisol concentration and the number of CVD risk factors (r_s – Spearman’s correlation coefficient).

4.1.3. Calculation of allostatic load index and its association with hair cortisol level

The allostatic load (AL) index was calculated as a sum of 5 separate physiological system (cardiovascular, metabolic, immune, oxidative stress, and platelet activation) risk scores. In total, 18 biomarkers were used for the calculation of AL indices. Each biomarker was dichotomized into high-risk and low-risk values: 1 point was given if the biomarker was in the high-risk range and 0 if not. Thus, the higher AL index value indicates the greater effect of chronic stress exposure on physiologic dysregulation. To determine the high-risk cut-off point values, the study sample was divided into quartiles, and high risk was defined as greater than the 75th percentile for all variables except for HDL-cholesterol and FRAP measures. For these variables, high risk was defined as a value less than the 25th percentile [27]. The overall AL index could range from 0 to 18 (Table 6).

Table 6. High-risk cut-off point values of individual biomarkers used in calculating the allostatic load index.

Group	Variable	n	Cut-off value
Cardiovascular indicators	Systolic blood pressure (mmHg)	163	≥136
	Diastolic blood pressure (mmHg)	163	≥83
	Heart rate (bpm)	163	≥71
Metabolic indicators	BMI (kg/m ²)	163	≥27.91
	Waist circumference (cm)	162	≥98
	Glucose (mM)	163	≥5.50
	TAG (mM)	163	≥1.74
	HDL-cholesterol (mM)	163	≤1.06
	LDL-cholesterol (mM)	163	≥3.79
	Total cholesterol (mM)	163	≥5.83
Immune system indicators	CRP (mg/L)	162	≥1.30
	Neutrophils (%)	161	≥52.81
	WBC (10 ⁹ /L)	161	≥6.28
	CypA (ng/mL)	160	≥81.00
Oxidative stress indicators	Malondialdehyde (μg/L)	142	≥119.30
	FRAP (μmol Fe ²⁺ /L)	158	≤42.92
Platelet activation biomarkers	CD63+ platelets stimulated with TRAP (%)	152	≥40.35
	PAC-1+ platelets stimulated with ADP (%)	129	≥66.40

Abbreviations: BMI – body mass index, TAG – triacylglycerols, HDL – high-density lipoproteins, LDL – low-density lipoproteins, CRP – C-reactive protein, WBC – white blood cells, CypA – cyclophilin A, FRAP – ferric reducing ability of plasma.

The AL index was calculated for 102 subjects. The median (IQR) value of the AL index was 4 (3), minimum value – 0, maximum value – 12. The correlation analysis revealed a weak but statistically significant association between the AL index and hair cortisol concentration ($r_s = 0.313$, $p = 0.001$) (Figure 8).

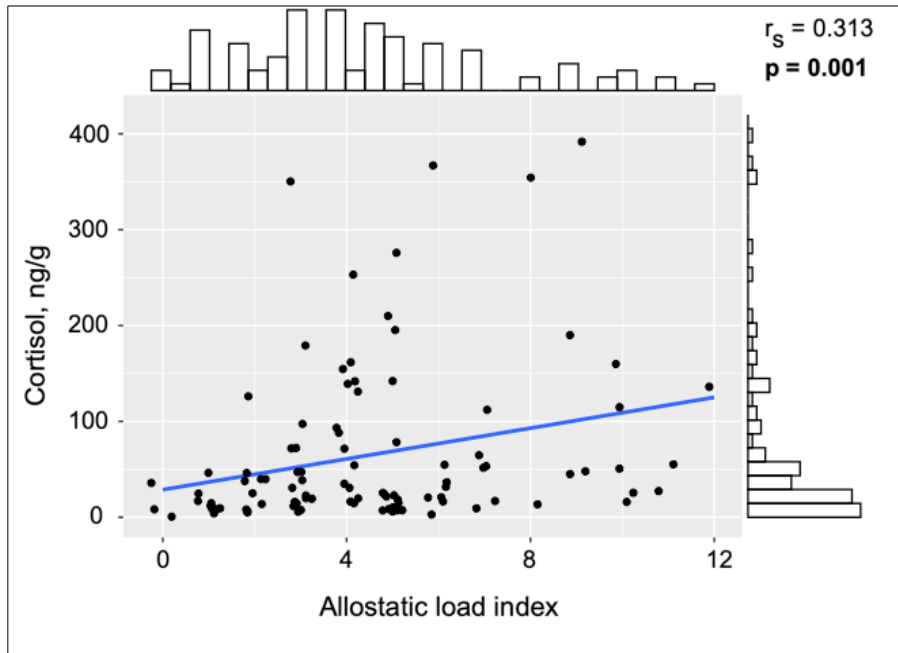


Figure 8. The correlation between allostatic load index and hair cortisol concentration (r_s – Spearman’s correlation coefficient).

4.2. Investigation of cardiovascular disease risk in middle-aged and elderly women

4.2.1. Study group characteristics

The cross-sectional study included 145 women (50–64 y.o.) participating in the national CVD prevention program. The results of the self-reported questionnaire showed that the majority of women were married (73.8%) and attained a level of higher education (84.1%). The analysis of lifestyle indicators revealed that almost 90% of study participants were non-smokers, but more than half of the women were physically inactive. Sociodemographic and lifestyle characteristics of the study group are presented in Table 7.

Table 7. Sociodemographic and lifestyle characteristics of the study group.

Variable	Median	IQR
Age (years)	55	7
Variable	n (%)	
Education		
Lower secondary	3 (2.1)	
Upper secondary	20 (13.8)	
Higher (university or non-university)	122 (84.1)	
Marital status		
Married	107 (73.8)	
Single/divorced/widowed	38 (26.2)	
Night job		
Yes	18 (12.4)	
No	127 (87.6)	
Smoking status		
Smoker	16 (11.0)	
Non-smoker	129 (89.0)	
Physical activity at work		
Inactive	85 (59.0)	
Walking	45 (31.3)	
Active	12 (8.3)	
Physically hard work	2 (1.4)	
Leisure-time physical activity		
Inactive	44 (30.6)	
Walking	91 (63.2)	
Active	9 (6.2)	
Heavy exercise	0 (0)	

¹n=144

Abbreviation: IQR – interquartile range.

The descriptive statistics of anthropometric variables, glucose and lipid metabolism biomarkers, as well as hair steroid hormone levels are depicted in Table 8.

Table 8. Anthropometric indicators, glucose and lipid metabolism biomarkers, as well as hair steroid hormone levels of the study participants.

Variable	Average±SD or median (IQR)	Min	Max
BMI (kg/m ²)	26.81 (8.18)	17.86	55.77
Waist circumference (cm)	85 (20)	62	136
Systolic blood pressure (mmHg)	127 (21)	89	180
Diastolic blood pressure (mmHg)	80±9.08	59	110
Heart rate (bpm)	76 (15)	53	135
Glucose (mM)	5.39 (0.71)	4.1	9.21
Total cholesterol (mM)	5.78 (1.49)	3.75	10.69
HDL-cholesterol (mM)	1.64 (0.62)	0.85	3.2
LDL-cholesterol (mM)	3.52 (1.32)	1.6	8.88
Non HDL-cholesterol (mM)	4.03 (1.54)	2.07	9.47
TAG (mM)	1.16 (0.74)	0.52	4.01
Apo B (g/L) ¹	0.92 (0.37)	0.093	1.85
Apo A1 (g/L) ¹	1.56±0.26	0.86	2.49
Apo A2 (g/L) ¹	0.35 (0.065)	0.22	0.57
Apo E (mg/L) ¹	44.70 (12.32)	23.20	79.00
Apo A1/Apo B ¹	1.62 (0.72)	0.62	17.31
Cortisol (ng/g) ²	3.43 (6.75)	0.53	117.55
Cortisone (ng/g) ²	6.65 (4.95)	1.49	73.33
DHEA (ng/g) ³	3.97 (4.06)	0.99	22.72
Progesterone (ng/g) ⁴	1.25 (2.42)	0.09	38.80
17 α -hydroxyprogesterone (ng/g) ⁵	0.42 (0.25)	0.20	0.94
Estradiol (ng/g) ⁶	0.15 (0.18)	0.07	1.67
Testosterone (ng/g) ⁷	0.22 (0.22)	0.06	17.59

¹n=115, ²n=144, ³n=135, ⁴n=123, ⁵n=68, ⁶n=21, ⁷n=78

Abbreviations: SD – standard deviation, IQR – interquartile range, Min – minimum value, Max – maximum value, BMI – body mass index, HDL – high-density lipoproteins, LDL – low-density lipoproteins, non HDL – non high-density lipoproteins, TAG – triacylglycerols, Apo B – apolipoprotein B, Apo A1 – apolipoprotein A1, Apo A2 – apolipoprotein A2, Apo E – apolipoprotein E, DHEA – dehydroepiandrosterone.

4.2.2. Association between cardiovascular disease risk and hair steroid hormone levels

According to the description provided in Section 3.3.1. we evaluated individuals' overall physical activity. The results showed that 60.8% of individuals prefer an overall inactive lifestyle, while 39.2% reported being physically active. No significant differences in hair cortisol, cortisone and

DHEA level median values were found between smokers and non-smokers (cortisol: 3.10 (3.50) ng/g vs. 3.58 (6.96) ng/g, $p = 0.849$, cortisone: 6.24 (3.42) ng/g vs. 7.26 (5.05) ng/g, $p = 0.257$, DHEA: 3.02 (2.47) ng/g vs. 4.07 (4.29) ng/g, $p = 0.382$, respectively) or subjects reporting low and high physical activity level (cortisol: 3.66 (9.74) ng/g vs. 3.58 (4.81) ng/g, $p = 0.333$, cortisone: 6.69 (5.73) ng/g vs. 6.50 (4.07) ng/g, $p = 0.362$, DHEA: 3.58 (3.68) ng/g vs. 4.23 (4.73) ng/g, $p = 0.333$, respectively).

To determine the association between hair cortisol, cortisone, DHEA levels and CVD risk factors, we divided the study participants into 2 or 3 groups according to the prevalence of major risk factors including: obesity, smoking, hypertension and dyslipidemia. The comparison of hair steroid hormone levels between the groups based on the recommended BMI, waist circumference, systolic and diastolic blood pressure values, LDL-cholesterol, non-HDL cholesterol, TAG and apo B concentrations in blood serum, is reported in Table 9.

Table 9. Comparison of hair cortisol, cortisone, DHEA concentration median values in the subject groups based on the recommended values of anthropometric, blood pressure measures and lipid metabolism biomarkers.

Variable	n	Cortisol concentration (ng/g), median (IQR)	p-value	Cortisone concentration (ng/g), median (IQR)	p-value	DHEA concentration (ng/g), median (IQR)	p-value
BMI (kg/m²)							
18.5–24.9	57	3.12 (3.86)	0.235*	5.83 (4.02) ^{***}	0.002*	4.52 (4.37)	0.595*
25.0–29.9	40	2.95 (5.99)		5.71 (3.81) ^{***}		4.04 (2.98)	
≥30.0	48	4.68 (8.05)		7.42 (9.30) ^{***}		3.62 (4.07)	
Waist circumference (cm)							
<80	44	2.82 (3.52)	0.074**	5.71 (3.60)	0.006**	3.57 (4.78)	0.930**
≥80	101	4.08 (7.57)		6.89 (7.53)		4.00 (3.59)	
Systolic blood pressure (mmHg)							
<140	112	3.10 (6.26)	0.044**	6.15 (4.04)	0.041**	3.45 (4.31)	0.237**
≥140	33	4.74 (7.27)		8.23 (8.77)		4.32 (2.97)	
Diastolic blood pressure (mmHg)							
<90	112	3.10 (6.20)	0.045**	5.99 (4.18)	0.103**	3.58 (4.34)	0.103**
≥90	33	5.42 (7.98)		7.80 (6.78)		4.46 (3.49)	
TAG (mM)							
<1.70	113	3.62 (6.58)	0.602**	6.58 (4.26)	0.266**	4.12 (3.64)	0.131**
≥1.70	32	3.09 (11.28)		6.88 (10.43)		3.04 (4.55)	
LDL-cholesterol (mM)							
<2.60	24	6.15 (15.06)	0.178**	6.67 (3.93)	0.686**	4.20 (3.93)	0.468**
≥2.60	121	3.13 (6.41)		6.65 (5.37)		3.60 (5.37)	
Non HDL-cholesterol (mM)							
<3.40	35	4.14 (9.66)	0.549**	6.78 (3.55)	0.264**	4.55 (3.18)	0.114**
≥3.40	110	3.13 (6.21)		6.09 (5.39)		3.58 (4.41)	

Table 9 (continued). Comparison of hair cortisol, cortisone, DHEA concentration median values in the subject groups based on the recommended values of anthropometric, blood pressure measures and lipid metabolism biomarkers.

Variable	n	Cortisol concentration (ng/g), median (IQR)	p-value	Cortisone concentration (ng/g), median (IQR)	p-value	DHEA concentration (ng/g), median (IQR)	p-value
Apo B (g/L)							
<1.00	71	2.85 (5.77)	0.227**	6.18 (3.48)	0.806**	3.39 (3.61)	0.814**
≥1.00	44	3.90 (9.81)		5.69 (5.91)		4.10 (3.60)	

*Kruskal–Wallis test

**Mann–Whitney U test

***Dunn’s test with Bonferroni correction: normal weight ($18.5 \leq \text{BMI} \leq 24.9$) vs. obesity ($\text{BMI} \geq 30.0$), $p = 0.003$; overweight ($25.0 \leq \text{BMI} \leq 29.9$) vs. obesity ($\text{BMI} \geq 30.0$), $p = 0.033$.

Abbreviations: BMI – body mass index, TAG – triacylglycerols, LDL – low-density lipoproteins, non HDL – non high-density lipoproteins, Apo B – apolipoprotein B, DHEA – dehydroepiandrosterone, IQR – interquartile range.

The results showed that obese subjects had significantly higher hair cortisone concentration compared with the overweight subjects or individuals whose BMI is within the recommended values. Also, participants with higher than recommended waist circumference values had a significantly higher hair cortisone concentration median (IQR) than subjects with normal waist circumference. Both hair cortisol and cortisone levels were elevated in a group of subjects whose systolic blood pressure was higher than recommended. Furthermore, subjects with higher diastolic blood pressure demonstrated increased hair cortisol concentration.

Correlation analyses revealed weak but statistically significant positive associations between hair cortisone concentration and waist circumference, systolic and diastolic blood pressure values and apolipoprotein E concentration in blood serum. Also, a significant positive relationship between hair cortisone concentration and body mass index, waist circumference, systolic and diastolic blood pressure values, glucose concentration in blood serum, as well as a negative correlation of hair cortisone concentration with HDL-cholesterol level in blood serum were found in the current study. Furthermore, a weak but statistically significant relationship between hair DHEA level and arterial blood pressure was observed (**Table 10**).

Table 10. Correlations between hair steroid hormone levels and anthropometric indicators, glucose and lipid metabolism biomarkers.

Variable	Cortisol concentration (ng/g)		Cortisone concentration (ng/g)		DHEA concentration (ng/g)	
	r _s	p-value	r _s	p-value	r _s	p-value
BMI (kg/m ²)	0.155	0.064	0.307	1.85×10⁻⁴	0.002	0.978
Waist circumference (cm)	0.170	0.042	0.344	2.38×10⁻⁵	0.012	0.886
Systolic blood pressure (mmHg)	0.246	0.003	0.271	1.03×10⁻³	0.194	0.024
Diastolic blood pressure (mmHg)	0.227	0.006	0.276	7.98×10⁻⁴	0.197	0.022
Heart rate (bpm)	0.0003	0.997	0.130	0.122	0.023	0.795
Glucose (mM)	0.124	0.139	0.177	0.033	0.003	0.969
Total cholesterol (mM)	-0.069	0.411	-0.127	0.129	-0.090	0.299
HDL-cholesterol (mM)	-0.044	0.600	-0.249	0.003	-0.018	0.838
LDL-cholesterol (mM)	-0.010	0.234	-0.107	0.201	-0.078	0.366
Non HDL-cholesterol (mM)	-0.079	0.344	-0.080	0.339	-0.110	0.205
TAG (mM)	0.090	0.283	0.077	0.356	-0.082	0.343
Apo B (g/L)	0.098	0.300	0.070	0.462	-0.019	0.845
Apo A1 (g/L)	0.049	0.607	-0.158	0.093	0.030	0.762
Apo A2 (g/L)	0.054	0.571	-0.126	0.180	0.018	0.857
Apo E (mg/L)	0.191	0.041	0.128	0.176	0.085	0.384
Apo A1/Apo B	-0.024	0.803	-0.102	0.279	0.027	0.781

Abbreviations: r_s – Spearman’s correlation coefficient, BMI – body mass index, HDL – high-density lipoproteins, LDL – low-density lipoproteins, non HDL – non high-density lipoproteins, TAG – triacylglycerols, Apo B – apolipoprotein B, Apo A1 – apolipoprotein A1, Apo A2 – apolipoprotein A2, Apo E – apolipoprotein E.

To examine the association between hair steroid hormone levels and CVD risk, a SCORE2 index calibrated for very high-risk regions was calculated. The median (IQR) SCORE2 index value in the study group was 8 (6)%, minimum value – 4%, maximum value – 27%. According to the SCORE2 model, 4.14% of subjects had low CVD risk (SCORE2 < 5%), moderate risk ($5\% \leq \text{SCORE2} \leq 9\%$) was determined for 50.34% of women and 45.52% of subjects had high (SCORE2 $\geq 10\%$) CVD risk (Figure 3).

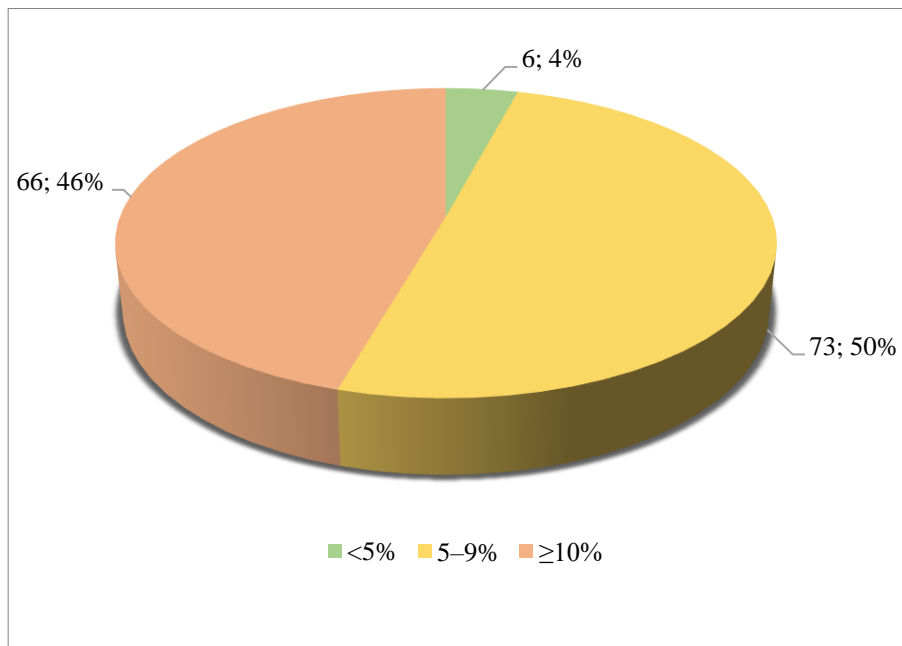


Figure 3. CVD risk based on SCORE2 values in the study group.

Since the majority of women had moderate or high CVD risk, we divided the entire study sample into two CVD risk groups: the low or moderate risk group (SCORE2 < 10%) vs. the high-risk group (SCORE2 $\geq 10\%$). Comparison of the hair steroid hormone median (IQR) values between the low or moderate and high CVD risk groups revealed statistically significant differences in hair cortisone concentration (5.83 (3.86) ng/g vs. 7.16 (7.08) ng/g, $p = 0.002$) and no significant differences in hair cortisol (3.07 (6.48) ng/g vs. 4.07 (7.32) ng/g, $p = 0.121$) and DHEA levels (4.00 (5.20) ng/g vs. 3.93 (3.81) ng/g, $p = 0.626$) (Figure 4).

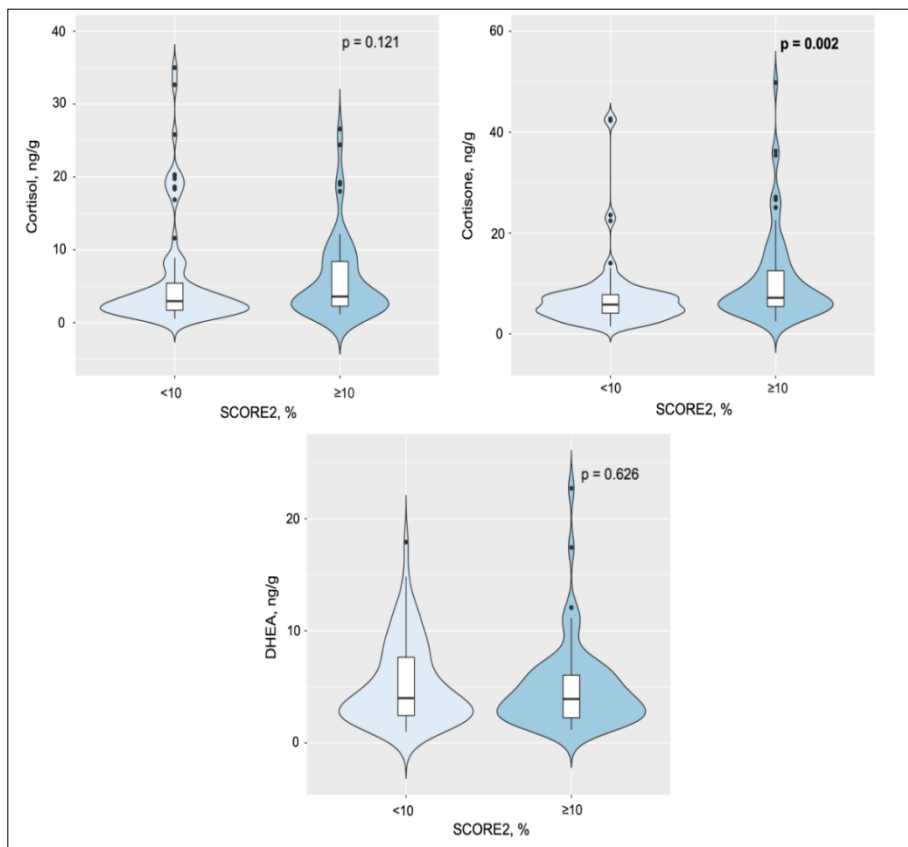


Figure 4. The comparison of hair steroid hormone levels between groups based on CVD risk evaluated by the SCORE2 risk prediction algorithm (DHEA – dehydroepiandrosterone).

Correlation analysis revealed a statistically significant relationship between hair cortisol, as well as hair cortisone levels, and the SCORE2 index values. No significant association between hair DHEA concentration and the SCORE2 index was observed (Figure 5).

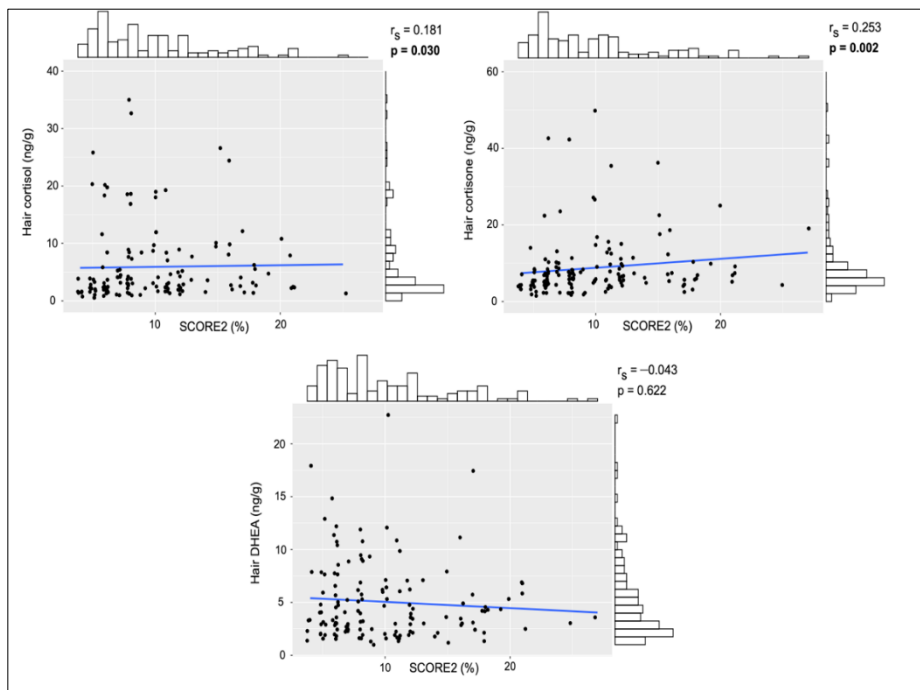


Figure 5. Correlations between hair steroid hormone levels and the SCORE2 index (r_s – Spearman’s correlation coefficient, DHEA – dehydroepiandrosterone).

4.2.3. Association between metabolic syndrome and hair steroid hormone levels

The Metabolic Syndrome (MetS) diagnosis was based on the criteria of the US National Cholesterol Education Program Expert Panel (NCEP) and Adult Treatment Panel III (ATP III) [29]. In NCEP-ATP III criteria, the presence of any three of five following factors is required for a diagnosis of MetS:

- 1) Abdominal obesity (waist circumference ≥ 102 cm for men and ≥ 88 cm for women);
- 2) Increased triacylglycerol concentration (≥ 1.7 mM) or specific treatment for these lipid abnormalities;
- 3) Reduced HDL-cholesterol concentration (< 1.0 mM for men and < 1.3 mM for women) or specific treatment for these lipid abnormalities;
- 4) Increased arterial blood pressure (systolic blood pressure ≥ 130 mmHg or diastolic blood pressure ≥ 85 mmHg) or previously diagnosed hypertension;

- 5) Increased fasting glucose concentration (≥ 5.6 mM) or previously diagnosed type 2 diabetes.

According to US NCEP-ATP III diagnostic criteria, 64 (44.14%) of women met the criteria of MetS. MetS patients were significantly older and had higher hair cortisol and cortisone level median values (Table 11).

Table 11. Comparison of sociodemographic, lifestyle indicators and hair steroid hormone levels between women with and without MetS.

Variable	Women without MetS (n=81)	MetS patients (n=64)	χ^2 (df=1)	p-value
Age (years), median (IQR)	54.0 (6.0)	57.5 (7.0)		0.003*
Menopause				
Yes (n (%))	63 (78.8)	55 (85.9)	1.242	0.265**
No (n (%))	17 (21.2)	9 (14.1)		
Marital status				
Married (n (%))	59 (72.8)	48 (75.0)	0.086	0.769**
Single/divorced/widowed (n (%))	22 (27.2)	16 (25.0)		
Night job				
Yes (n (%))	11 (13.6)	7 (10.9)	0.230	0.632**
No (n (%))	70 (86.4)	57 (89.1)		
Smoking status				
Smoker (n (%))	7 (8.6)	9 (14.1)	1.070	0.301**
Non-smoker (n (%))	74 (91.4)	55 (85.9)		
Physical activity level				
Low (n (%))	48 (55.2)	31 (55.4)	4.702	0.983**
High (n (%))	39 (44.8)	25 (44.6)		
Cortisol concentration (ng/g), median (IQR)	2.93 (4.82)	4.19 (8.56)		0.019*
Cortisone concentration (ng/g), median (IQR)	5.50 (3.58)	7.44 (7.20)		1.283$\times 10^{-4}$*
DHEA concentration (ng/g), median (IQR)	3.58 (4.25)	4.18 (3.45)		0.384*
PSS (average \pm SD)	15.22 \pm 5.51	16.06 \pm 6.30		0.394***
STAI-T (average \pm SD)	39.53 \pm 8.45	41.27 \pm 9.34		0.244***
PSQI (median (IQR))	5.0 (4.0)	6.0 (5.0)		0.118*

*Mann–Whitney U test, **Pearson’s χ^2 test, ***Student’s t-test

Abbreviations: IQR – interquartile range, SD – standard deviation, DHEA – dehydroepiandrosterone, MetS – metabolic syndrome, PSS – Perceived Stress Scale, STAI-T – State-Trait Anxiety Inventory, PSQI – Pittsburgh Sleep Quality Index.

In order to evaluate the predictors (age, hair cortisol and cortisone levels) of MetS, we performed a binary simple logistic regression analysis. The

results showed that older age and higher hair cortisone concentration were associated with a significantly increased odds ratio for MetS (Table 12).

Table 12. Simple logistic regression analysis (dependent variable – MetS diagnosis).

Variable	OR	95% CI	p-value
Age (years)	1.13	[1.04; 1.23]	0.003
Cortisol concentration (ng/g)	1.01	[0.99; 1.03]	0.218
Cortisone concentration (ng/g)	1.07	[1.02; 1.13]	0.008

Abbreviations: CI – confidence interval, OR – odds ratio

Further, we performed a multiple logistic regression analysis by including age and hair cortisone concentration variables in the model (Table 13).

Table 13. Multiple logistic regression analysis (dependent variable – MetS diagnosis).

Variable	OR	95% CI	p-value
Age (years)	1.11	[1.02; 1.22]	0.014
Cortisone concentration (ng/g)	1.06	[1.02; 1.13]	0.015

Abbreviations: CI – confidence interval, OR – odds ratio

The average correct classification rate of the multiple logistic regression model was 65.95%, sensitivity – 0.81 (95% CI [0.71; 0.89]), specificity – 0.46 (95% CI [0.33; 0.59]), positive predictive value – 0.66 (95% CI [0.56; 0.75]), negative predictive value – 0.66 (95% CI [0.50; 0.80]), positive likelihood ratio – 1.51 (95% CI [1.18; 1.94]), negative likelihood ratio – 0.40 (95% CI [0.24; 0.68]). The estimated pseudo-coefficients of determination were: McFadden – 0.134, Cox-Snell – 0.169, Nagelkerke – 0.226.

We divided the entire study sample into three groups according to hair cortisol concentration terciles (T1, T2, T3). The prevalence of MetS significantly increased with hair cortisol concentration, expanding from 31.2% to 57.1% from the first to the third terciles (Table 14).

Table 14. The prevalence of MetS according to the terciles of hair cortisol concentration.

Tercile	Cortisol concentration (ng/g)	MetS patients n (%)	Women without MetS n (%)	χ^2 (df=2)	p-value
T1	[0.53; 2.32]	15 (31.2)	33 (68.8)	6.59	0.037
T2	(2.32; 5.65]	21 (44.7)	26 (55.3)		
T3	(5.65; 117.55]	28 (57.1)	21 (42.9)		

Abbreviation: MetS – metabolic syndrome.

We analyzed two logistic regression models: unadjusted (Model 1) and age-adjusted (Model 2) models. The highest hair cortisol concentration tercile was associated with MetS in the unadjusted (Model 1) and age-adjusted (Model 2) models. However, after adjustment for age (Model 2), the primary odds ratio found in the unadjusted model (Model 1) fell to 2.66 (95% CI [1.14; 6.24]). The results of logistic regression analysis are shown in Table 15.

Table 15. Logistic regression analysis (dependent variable MetS diagnosis).

Cortisol concentration tercile	Model 1 OR [95% CI]	p-value	Model 2 OR [95% CI]	p-value
T1	1.00 (referent)		1.00 (referent)	
T2	1.78 [0.77; 4.11]	0.179	1.76 [0.74; 4.17]	0.198
T3	2.93 [1.28; 6.74]	0.011	2.66 [1.14; 6.24]	0.024

Abbreviations: CI – confidence interval, OR – odds ratio

A similar statistical analysis was performed by stratifying subjects into three groups according to hair cortisone concentration terciles (T1, T2, T3). The prevalence of MetS significantly increased with hair cortisone concentration, expanding from 25.0% to 63.3% from the first to the third terciles (Table 16).

Table 16. The prevalence of MetS according to the terciles of hair cortisone concentration.

Tercile	Cortisone concentration (ng/g)	MetS patients n (%)	Women without MetS n (%)	χ^2 (df=2)	p-value
T1	[1.49; 5.18]	12 (25.0)	36 (75.0)		
T2	(5.18; 7.80]	20 (42.6)	27 (57.4)	14.47	7.218×10⁻⁴
T3	(7.80; 73.33]	31 (63.3)	18 (36.7)		

Abbreviation: MetS – metabolic syndrome.

Logistic regression analysis showed that both in unadjusted and age-adjusted models, the highest hair cortisone concentration tercile was a significant predictor of MetS (Table 17).

Table 17. Logistic regression analysis (dependent variable – MetS diagnosis).

Cortisone concentration tercile	Model 1 OR [95% CI]	p-value	Model 2 OR [95% CI]	p-value
T1	1.00 (referent)		1.00 (referent)	
T2	2.22 [0.93; 5.32]	0.073	2.07 [0.85; 5.04]	0.111
T3	5.17 [2.16; 12.38]	2.31×10⁻⁴	4.74 [1.94; 11.58]	6.36×10⁻⁴

Abbreviations: CI – confidence interval, OR – odds ratio

4.2.4. The relationship between self-reported stress, anxiety, sleep quality and hair steroid hormone levels

The comparison of stress-related hair steroid hormone concentrations among groups based on different self-reported stress level and sleep quality showed statistically significant difference in hair cortisol concentration between good and poor sleepers (Table 18).

Table 18. The comparison of stress-related hair steroid hormone levels among groups based on self-reported stress level and sleep quality.

Variable	n	Cortisol concentration (ng/g), median (IQR)	p-value	Cortisone concentration (ng/g), median (IQR)	p-value	DHEA concentration (ng/g), median (IQR)	p-value
Perceived stress level							
Low	52	2.95 (6.64)	0.374	5.90 (3.41)	0.430	3.46 (3.83)	0.182
Moderate and high	93	3.89 (6.81)		6.90 (5.44)		4.20 (4.42)	
Sleep quality							
Good	83	3.04 (4.96)	0.039	5.90 (3.71)	0.230	3.75 (3.82)	0.890
Poor	60	4.32 (11.25)		6.88 (5.72)		4.04 (3.64)	

Abbreviations: DHEA – dehydroepiandrosterone, IQR – interquartile range.

The correlation analysis revealed weak but statistically significant associations between hair cortisol concentration and the Perceived stress scale or Pittsburgh sleep quality index scores (Table 19).

Table 19. Correlations between hair steroid hormone levels and stress, anxiety, sleep quality measures.

Variable	Cortisol concentration (ng/g)		Cortisone concentration (ng/g)		DHEA concentration (ng/g)	
	r_s	p-value	r_s	p-value	r_s	p-value
PSS	0.183	0.029	0.151	0.072	0.083	0.341
STAI-T	0.155	0.063	0.074	0.378	-0.045	0.604
PSQI	0.181	0.030	0.104	0.216	-0.018	0.835

Abbreviations: r_s – Spearman’s correlation coefficient, DHEA – dehydroepiandrosterone, PSS – Perceived Stress Scale, STAI-T – State-Trait Anxiety Inventory, PSQI – Pittsburgh Sleep Quality Index.

5. DISCUSSION

5.1. Stress-related hair steroid hormones and CVD risk factors

Investigation of the anthropometric data and their relationship with hair glucocorticoid levels showed that increased long-term secretion of hair cortisol and/or cortisone were positively associated with waist circumference and body mass index (BMI) values. Moreover, the strength of the correlation between hair cortisone concentration and waist circumference (WC) was higher compared with the correlation between hair cortisol level and waist circumference. This is in concordance with the results of a recently published meta-analysis [30], where 146 cohorts with 34,342 individuals (53.3 ± 18.4 y.o.) in total were analyzed, and significant correlations between hair cortisol or cortisone and BMI, as well as WC, were found. The results of the aforementioned study also indicated that the strongest correlation and the largest effect size were found between hair cortisone level and waist circumference [30]. A possible explanation of hair cortisone being a better predictor of adiposity is that the level of cortisone is assumed to be more stable in the hair shaft and is not affected by the presence of a local hypothalamic-pituitary-adrenal-like axis in the hair follicle [7, 30].

The results of the study showed significant associations between all measured steroid hormones and arterial blood pressure values. Conflicting results were found in previous studies investigating the relationship between hypertension and hair cortisol or cortisone levels. A recently published paper [31] reported that median hair cortisol concentration was significantly higher in hypertensive individuals compared with normotensive subjects. Similarly, Bautista et al. [32] showed that individuals with a higher hair cortisol concentration (above the median of the study sample) were twice as likely to be hypertensive than those with a lower hair cortisol level (below the median of the study sample). A meta-analysis based on findings from 124 (sub)samples [33] identified that only systolic blood pressure was positively associated with hair cortisol concentration, but the relationship between hair cortisol and diastolic blood pressure was overall non-significant. The results of the study conducted by Kuehl et al. [34] were in concordance with the aforementioned findings and, additionally, showed that hair cortisone concentration was not related to either systolic or diastolic blood pressure. In contrast, results of the bivariate Pearson's correlation analysis in a group of 1,258 employees of a large aerospace company showed that both hair cortisol and cortisone levels were significantly associated with mean arterial blood pressure, however, the adjustment for covariates resulted in a non-significant

relationship between hair cortisol and mean arterial blood pressure [35]. These findings are in line with the results of the present study as the Spearman's correlation coefficient was higher in the hair cortisone–systolic (diastolic) blood pressure association compared to the hair cortisol–systolic (diastolic) blood pressure relationship. To the best of our knowledge, this is the first study that examined the association between hair DHEA level and cardiovascular disease risk factors. The role of DHEA in hypertension is still not fully understood, but the suggested biological effect of DHEA is based on the stimulation of endothelial NO synthase phosphorylation and results in increased endothelial-derived NO production, which plays a key role as a vasodilator. Thus, DHEA treatment is supposed to be beneficial in reducing systolic and diastolic blood pressure [36]. However, the results of the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) showed that a higher DHEA concentration in blood serum was related to a higher incidence of hypertension and a greater increase in blood pressure during follow-up among postmenopausal women free of hypertension at baseline [37]. The results of the present study are in line with the aforementioned findings, as our data revealed a positive link between hair DHEA concentration and arterial blood pressure. In contrast, a more recently published meta-analysis of 18 randomized clinical trials reported that DHEA supplementation did not significantly change systolic and diastolic blood pressure, but increased lean body mass and decreased fat mass, when compared to control groups [38].

Analysis of the associations between lipid metabolism biomarkers and chronic stress indicators revealed a statistically significant positive relationship of hair cortisol concentration and total cholesterol, LDL-cholesterol and non HDL-cholesterol levels in the young and middle-aged male group. Also, a significant negative correlation between cortisone concentration and HDL-cholesterol level was found in the group of middle-aged and elderly females. Previous studies showed very weak but statistically significant negative associations between hair cortisol concentration and LDL-cholesterol, as well as hair cortisone level and HDL-cholesterol concentration in blood serum [35]. Also, hair cortisol and cortisone levels were found to be significantly related to triacylglycerol concentration in blood serum ($r_p = 0.342$ or $r_p = 0.458$, $p < 0.01$, respectively) [34]. To the best of our knowledge, the present study is the first work that showed a weak but statistically significant correlation between hair cortisol and serum Apo E concentration. Generally, Apo E is mainly identified in triacylglycerol-rich lipoproteins to mediate the clearance of their remnants, and it is suggested that an increased Apo E concentration is related to a higher prevalence of metabolic syndrome and premature coronary artery disease. However, the

clinical significance of Apo E is still under debate as three distinct isoforms, such as Apo E2, Apo E3, Apo E4, might affect cardiovascular health differently [39]. Thus, future research should be focused on the quantitative determination of Apo E isoforms and their relationship with chronic stress biomarkers.

Our findings suggest that there is a weak but statistically significant association between hair glucocorticoid concentrations and fasting serum glucose level. To date, most studies have focused on the relationship between hair cortisol concentration and glycated hemoglobin level or the prevalence of type 2 diabetes. The results suggested that long-term or repeated hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activation is related to the elevated glycated hemoglobin level [35, 40] and a higher prevalence of type 2 diabetes [41–43]. In contrast, the majority of previous studies [34, 35] found no significant association between hair cortisol level and fasting glucose concentration.

It is hypothesized that chronic stress-induced long-term cortisol exposure results in glucocorticoid receptor resistance that leads to diminished downregulation of inflammatory processes. The risk of chronic inflammatory diseases such as atherosclerosis is increased when inflammation duration is longer and intensity is elevated [44]. Our results indicate a weak but statistically significant correlation between hair cortisol concentration and the absolute neutrophil count, as well as the neutrophil percentage value. Similarly, Penz et al. [45] showed that the increase in hair cortisol concentration is associated with changes in distribution of leukocytes, resulting in expansion of neutrophils and a decrease in lymphocytes and monocytes. These findings might be important, as there is growing evidence that neutrophils take part in the progression of atherosclerosis by forming neutrophil extracellular traps that enhance cytokine production in macrophages and activate T helper 17 cells responsible for maintaining the inflammatory process [46, 47].

5.2. Stress-related hair steroid hormones and CVD risk

Currently, the SCORE2 (*Systemic Coronary Risk Estimation 2*) risk prediction algorithm [5] which indicates 10-year fatal and non-fatal CVD risk is used to evaluate CVD risk in apparently healthy individuals. The model is adapted for subjects 40–69 y.o. and calibrated for very high, high, moderate and low CVD risk regions. The SCORE2 index is calculated using the following indicators or risk factors: gender, age, smoking status, non HDL-cholesterol level in blood serum and systolic blood pressure values. The

possible values of the SCORE2 index in the low CVD risk region is 1–19%, moderate CVD risk region – 1–25%, high CVD risk region – 1–32%, very high CVD risk region – 2–46%. Since mortality from CVD in Lithuania is very high, Lithuania is assigned to the very high CVD risk region.

To the best of our knowledge, this is the first study that examined the association between stress-related hair steroid hormones and SCORE2 risk model values. We found a statistically significant relationship between SCORE2 and both hair cortisol and cortisone levels ($r_s = 0.181$, $p = 0.030$, $r_s = 0.253$, $p = 0.002$, respectively). Numerous previous studies reported an association between hair cortisol concentration and the incidence of acute coronary syndrome [48] or myocardial infarction [49]. Also, individuals with angiographically documented coronary atherosclerosis [31] had significantly higher hair cortisol levels compared with healthy controls. In contrast to the aforementioned studies, the results of the current study showed that chronic stress biomarkers are related to increased CVD in apparently healthy women without a diagnosis of acute or chronic diseases. Thus, it is possible that objective chronic stress biomarkers might be used for CVD risk assessment and prevention. Moreover, it should be noted that the Spearman's correlation coefficient between hair cortisone and SCORE2 was higher compared with the correlation measured between hair cortisol and SCORE2 risk model values. Comparison of hair glucocorticoid levels among women with $\geq 10\%$ and $< 10\%$ 10-year fatal and non-fatal CVD risk showed that only hair cortisone level differed significantly between groups. These results suggest that cortisone, the inactive form of cortisol, should be considered an additional biologically relevant chronic stress marker in cardiovascular health research.

5.3. Stress-related hair steroid hormones and metabolic syndrome

Metabolic syndrome (MetS) is associated with a 5-fold increased risk for type 2 diabetes and a 2-fold higher risk for the development of cardiovascular diseases [50,51]. It is estimated that about one quarter of the world's population is affected with MetS [52].

Since chronically elevated cortisol concentration promotes abdominal obesity, hypertension and hyperglycemia, it is believed that stress should be considered as an etiological factor of MetS [53–55]. Previous studies showed that prolonged stress or extremely stressful life events (e.g., nuclear power plant accidents, earthquakes) are associated with higher MetS and MetS diagnostic criteria prevalence [56–57].

The results of the current study showed that the prevalence of MetS significantly increased from the first to the third hair cortisol and cortisone

concentration tertiles. Also, the highest hair cortisol concentration tercile was associated with a 2.66 (95 % CI [1.14; 6.24]) increased odds ratio for MetS, while the highest hair cortisone concentration tercile was associated with a 4.74 (95 % CI [1.94; 11.58]) increased odds ratio for MetS in age-adjusted logistic regression models. These results are in line with the previous research showing a significant association between hair glucocorticoid level tertiles and the number of MetS criteria among healthy individuals and subjects suffering from depression [34]. In contrast, a case-control study in South African women showed no evidence of the relationship between hair cortisol concentration and MetS, as well as comorbidity of posttraumatic stress disorder and metabolic syndrome [58]. Presumably, these inconsistent findings might be caused by the presence of mediating factors. For instance, H. M. Lehrer et al. [59] demonstrated that the association between higher hair cortisol concentration and the MetS severity score is mediated by a lower psychological resilience.

5.4. Study limitations

The study utilized a cross-sectional design that allows to identify the prevalence of diseases or risk factors, as well as correlations between variables at a single time point and does not provide information about causality in the relationship between stress-related steroid hormone secretion and CVD risk. Thus, in order to determine whether there is a causal link between stress hormones and CVD risk, a longitudinal study should be performed.

Two distinct hair sample preparation techniques and steroid hormone analysis methods were used in the male and female study groups. Due to these reasons, we were unable to conduct a statistical analysis in the entire study population and compare hair steroid hormone levels between males and females.

CONCLUSIONS

1. A highly sensitive and selective HPLC-MS/MS method was developed for the quantitative determination of seven steroid hormones (cortisol, cortisone, dehydroepiandrosterone, testosterone, 17 α -hydroxyprogesterone, progesterone, estradiol) in human hair samples.
2. Examination of the relationship among stress-related hair steroid hormone levels and cardiovascular disease risk factors revealed statistically significant positive associations between:
 - a) hair cortisol concentration and waist circumference, arterial blood pressure values both in males and females;
 - b) hair cortisol concentration and body mass index values, glucose, total cholesterol, LDL-cholesterol, non-HDL cholesterol concentrations in the male group and apolipoprotein E level in the female group;
 - c) hair cortisone concentration and body mass index, waist circumference, arterial blood pressure values, glucose concentration in blood serum, as well as hair dehydroepiandrosterone concentration and arterial blood pressure values in the female group.
3. Significant positive associations between hair glucocorticoid levels and the SCORE2 risk prediction algorithm which estimates the 10-year fatal and non-fatal cardiovascular disease risk were found in the female group.
4. Higher hair cortisol and cortisone levels were found to be significantly related to the increased risk of metabolic syndrome.
5. A significant positive relationship between hair cortisol concentration and the allostatic load index was observed in the male group. In the female group, only weak positive associations were found between hair cortisol concentration, the perceived stress scale and the Pittsburgh sleep quality index scores.

REFERENCES

1. World Health Organisation. Cardiovascular diseases (CVDs). Available online: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (accessed on May 12, 2022).
2. *Lithuania: country health profile 2021*; OECD: Paris, **2021**; ISBN 9789264492981.
3. Jagannathan, R.; Patel, S.A.; Ali, M.K.; Narayan, K.M.V. Global updates on cardiovascular disease mortality trends and attribution of traditional risk factors. *Curr. Diab. Rep.* **2019**, *19*, 1–12, doi:10.1007/s11892-019-1161-2.
4. Steptoe, A.; Kivimaki, M. Stress and cardiovascular disease: an update on current knowledge. *Annu. Rev. Public Health* **2013**, *34*, 337–354, doi:10.1146/annurev-publhealth-031912-114452.
5. Visseren, F.L.J.; Mach, F.; Smulders, Y.M.; Carballo, D.; Koskinas, K.C.; Bäck, M.; Benetos, A.; Biffi, A.; Boavida, J.-M.; Capodanno, D.; et al. 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur. J. Prev. Cardiol.* **2021**, 1–111, doi:10.1093/eurjpc/zwab154.
6. Nicolaidis, N.C.; Kyratzi, E.; Lamprokostopoulou, A.; Chrousos, G.P.; Charmandari, E. Stress, the stress system and the role of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation* **2014**, *22*, 6–19, doi:10.1159/000362736.
7. Iob, E.; Steptoe, A. Cardiovascular disease and hair cortisol: a novel biomarker of chronic stress. *Curr. Cardiol. Rep.* **2019**, *21*, doi:10.1007/s11886-019-1208-7.
8. Dar, T.; Radfar, A.; Abohashem, S.; Pitman, R.K.; Tawakol, A.; Osborne, M.T. Psychosocial stress and cardiovascular disease. *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.* **2019**, *21*, 1–17, doi:10.1007/s11936-019-0724-5.
9. Gray, M.J.; Litz, B.T.; Hsu, J.L.; Lombardo, T.W. Psychometric properties of the life events checklist. *Assessment* **2004**, *11*, 330–341, doi:10.1177/1073191104269954.
10. Cohen, S.; Kamarck, T.; Mermelstein, R. A global measure of perceived stress. *J. Health Soc. Behav.* **1983**, *24*, 385–396.
11. Ostiguy, C.S.; Ellenbogen, M.A.; Linnen, A.M.; Walker, E.F.; Hammen, C.; Hodgins, S. Chronic stress and stressful life events in the offspring of parents with bipolar disorder. *J. Affect. Disord.* **2009**, *114*, 74–84, doi:10.1016/j.jad.2008.08.006.
12. Mauss, D.; Jarczok, M.N. The streamlined allostatic load index is associated with perceived stress in life—findings from the MIDUS study. *Stress* **2021**, *24*, 404–412, doi:10.1080/10253890.2020.1869935.
13. Phillips, R.; Kraeuter, A.K.; McDermott, B.; Lupien, S.; Sarnyai, Z.

- Human nail cortisol as a retrospective biomarker of chronic stress: a systematic review. *Psychoneuroendocrinology* **2021**, *123*, doi:10.1016/j.psyneuen.2020.104903.
14. Russell, G.; Lightman, S. The human stress response. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2019**, *15*, 525–534, doi:10.1038/s41574-019-0228-0.
 15. Hellhammer, D.H.; Wüst, S.; Kudielka, B.M. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology* **2009**, *34*, 163–171, doi:10.1016/j.psyneuen.2008.10.026.
 16. Van Uum, S.H.M.; Sauvé, B.; Fraser, L.A.; Morley-Forster, P.; Paul, T.L.; Koren, G. Elevated content of cortisol in hair of patients with severe chronic pain: A novel biomarker for stress. *Stress* **2008**, *11*, 483–488, doi:10.1080/10253890801887388.
 17. El Mili, N.; Ahabrach, H.; Cauli, O. Hair cortisol concentration as a biomarker of sleep quality and related disorders. *Life* **2021**, *11*, 1–19, doi:10.3390/life11020081.
 18. Steudte-Schmiedgen, S.; Wichmann, S.; Stalder, T.; Hilbert, K.; Muehlhan, M.; Lueken, U.; Beesdo-Baum, K. Hair cortisol concentrations and cortisol stress reactivity in generalized anxiety disorder, major depression and their comorbidity. *J. Psychiatr. Res.* **2017**, *84*, 184–190, doi:10.1016/j.jpsychires.2016.09.024.
 19. Coello, K.; Munkholm, K.; Nielsen, F.; Vinberg, M.; Kessing, L.V. Hair cortisol in newly diagnosed bipolar disorder and unaffected first-degree relatives. *Psychoneuroendocrinology* **2019**, *99*, 183–190, doi:10.1016/j.psyneuen.2018.09.020.
 20. Kristenson, M.; Orth-Gomér, K.; Kucinskiene, Z.; Bergdahl, B.; Calkauskas, H.; Balinkyniene, I.; Olsson, A.G. Attenuated cortisol response to a standardized stress test in Lithuanian versus Swedish men: The LiVicordia study. *Int. J. Behav. Med.* **1998**, *5*, 17–30, doi:10.1207/s15327558ijbm0501_2.
 21. Townsend, N.; Kazakiewicz, D.; Lucy Wright, F.; Timmis, A.; Huculeci, R.; Torbica, A.; Gale, C.P.; Achenbach, S.; Weidinger, F.; Vardas, P. Epidemiology of cardiovascular disease in Europe. *Nat. Rev. Cardiol.* **2022**, *19*, 133–143, doi:10.1038/s41569-021-00607-3.
 22. Julian, L.J. Measures of anxiety. *Arthritis Care Res* **2011**, *63*, 1–11, doi:10.1002/acr.20561.
 23. Buysse, D.J.; Reynolds, C.F.; Monk, T.H.; Berman, S.R.; Kupfer, D.J. The Pittsburgh sleep quality index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res.* **1989**, *28*, 193–213, doi:10.1016/0165-1781(89)90047-4.
 24. Raul, J.-S.; Cirimele, V.; Ludes, B.; Kintz, P. Detection of physiological concentrations of cortisol and cortisone in human hair. *Clin. Biochem.* **2004**, *37*, 1105–1111, doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.02.010.
 25. de Palo, E.F.; 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*, 60–65, doi:10.1016/j.cca.2009.04.006.
26. 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, doi:10.1016/j.jchromb.2013.03.008.
 27. Khoschsorur, G.A.; Winklhofer-Roob, B.M.; Rabl, H.; Auer, T.; Peng, Z.; Schaur, R.J. Evaluation of a sensitive HPLC method for the determination of malondialdehyde, and application of the method to different biological materials. *Chromatographia* **2000**, *52*, 181–184, doi:10.1007/BF02490453.
 28. Benzie, I.F.; Strain, J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76, doi:10.1006/abio.1996.0292.
 29. Alberti, G.; Zimmet, P.; Shaw, J.; Grundy, S.M. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. *IDF Commun.* **2006**, 1–24.
 30. van der Valk, E.; Abawi, O.; Mohseni, M.; Abdelmoumen, A.; Wester, V.; van der Voorn, B.; Iyer, A.; van den Akker, E.; Hoeks, S.; van den Berg, S.; et al. Cross-sectional relation of long-term glucocorticoids in hair with anthropometric measurements and their possible determinants: a systematic review and meta-analysis. *Obes. Rev.* **2022**, *23*, 1–21, doi:10.1111/obr.13376.
 31. Nafisa, A.; Wattoo, F.H.; Qayyum, M.; Gulfraz, M. The association between chronic stress, hair cortisol, and angiographically documented coronary atherosclerosis, a case-control study. *Stress* **2021**, *24*, 1008–1015, doi:10.1080/10253890.2021.1985994.
 32. Bautista, L.E.; Bajwa, P.K.; Shafer, M.M.; Malecki, K.M.C.; McWilliams, C.A.; Palloni, A. The relationship between chronic stress, hair cortisol and hypertension. *Int. J. Cardiol. Hypertens.* **2019**, *2*, 1–6, doi:10.1016/j.ijchy.2019.100012.
 33. Stalder, T.; Steudte-Schmiedgen, S.; Alexander, N.; Klucken, T.; Vater, A.; Wichmann, S.; Kirschbaum, C.; Miller, R. Stress-related and basic determinants of hair cortisol in humans: A meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* **2017**, *77*, 261–274, doi:10.1016/j.psyneuen.2016.12.017.
 34. Kuehl, L.K.; Hinkelmann, K.; Muhtz, C.; Dettenborn, L.; Wingenfeld, K.; Spitzer, C.; Kirschbaum, C.; Wiedemann, K.; Otte, C. Hair cortisol and cortisol awakening response are associated with criteria of the metabolic syndrome in opposite directions. *Psychoneuroendocrinology* **2015**, *51*, 365–370, doi:10.1016/j.psyneuen.2014.09.012.
 35. Stalder, T.; Kirschbaum, C.; Alexander, N.; Bornstein, S.R.; Gao, W.; Miller, R.; Stark, S.; Bosch, J.A.; Fischer, J.E. Cortisol in hair and the metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, 2573–

- 2580, doi:10.1210/jc.2013-1056.
36. Savineau, J.-P.; Marthan, R.; Dumas De La Roque, E. Role of DHEA in cardiovascular diseases. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85*, 718–726, doi:10.1016/j.bcp.2012.12.004.
 37. Wang, L.; Szklo, M.; Folsom, A.R.; Cook, N.R.; Gapstur, S.M.; Ouyang, P. Endogenous sex hormones, blood pressure change, and risk of hypertension in postmenopausal women: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Atherosclerosis* **2012**, *224*, 228–234, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.005.
 38. Wang, F.; He, Y.; O. Santos, H.; Sathian, B.; C. Price, J.; Diao, J. The effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation on body composition and blood pressure: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Steroids* **2020**, *163*, 1–9, doi:10.1016/j.steroids.2020.108710.
 39. Marais, A.D. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. *Pathology* **2019**, *51*, 165–176, doi:10.1016/j.pathol.2018.11.002.
 40. Lehrer, H.M.; Dubois, S.K.; Maslowsky, J.; Laudenslager, M.L.; Steinhardt, M.A. Hair cortisol concentration and glycated hemoglobin in African American adults. *Psychoneuroendocrinology* **2016**, *72*, 212–218, doi:10.1016/j.psyneuen.2016.06.018.
 41. Staufienbiel, S.M.; Penninx, B.W.J.H.; de Rijke, Y.B.; van den Akker, E.L.T.; van Rossum, E.F.C. Determinants of hair cortisol and hair cortisone concentrations in adults. *Psychoneuroendocrinology* **2015**, *60*, 182–194, doi:10.1016/j.psyneuen.2015.06.011.
 42. Manenschijn, L.; Schaap, L.; Van Schoor, N.M.; Van Der Pas, S.; Peeters, G.M.E.E.; Lips, P.; Koper, J.W.; Van Rossum, E.F.C. High long-term cortisol levels, measured in scalp hair, are associated with a history of cardiovascular disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, 2078–2083, doi:10.1210/jc.2012-3663.
 43. Abell, J.G.; Stalder, T.; Ferrie, J.E.; Shipley, M.J.; Kirschbaum, C.; Kivimäki, M.; Kumari, M. Assessing cortisol from hair samples in a large observational cohort: The Whitehall II study. *Psychoneuroendocrinology* **2016**, *73*, 148–156, doi:10.1016/j.psyneuen.2016.07.214.
 44. Tian, R.; Hou, G.; Li, D.; Yuan, T. A possible change process of inflammatory cytokines in the prolonged chronic stress and its ultimate implications for health. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 1–8, doi:10.1155/2014/780616.
 45. Penz, M.; Kirschbaum, C.; Buske-Kirschbaum, A.; Wekenborg, M.K.; Miller, R. Stressful life events predict one-year change of leukocyte composition in peripheral blood. *Psychoneuroendocrinology* **2018**, *94*, 17–24, doi:10.1016/j.psyneuen.2018.05.006.
 46. Warnatsch, A.; Ioannou, M.; Wang, Q.; Papayannopoulos, V. Neutrophil extracellular traps license macrophages and Th17 cells for

- cytokine production in atherosclerosis. *Science* **2016**, *349*, 316–320, doi:10.1126/science.aaa8064.
47. Döring, Y.; Soehnlein, O.; Weber, C. Neutrophil extracellular traps in atherosclerosis and atherothrombosis. *Circ. Res.* **2017**, *120*, 736–744, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309692.
 48. Izawa, S.; Miki, K.; Tsuchiya, M.; Yamada, H.; Nagayama, M. Hair and fingernail cortisol and the onset of acute coronary syndrome in the middle-aged and elderly men. *Psychoneuroendocrinology* **2019**, *101*, 240–245, doi:10.1016/j.psyneuen.2018.11.021.
 49. Faresjö, T.; Strömberg, S.; Jones, M.; Stomby, A.; Karlsson, J.E.; Östgren, C.J.; Faresjö, Å.; Theodorsson, E. Elevated levels of cortisol in hair precede acute myocardial infarction. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–8, doi:10.1038/s41598-020-80559-9.
 50. Wang, H.H.; Lee, D.K.; Liu, M.; Portincasa, P.; Wang, D.Q.H. Novel insights into the pathogenesis and management of the metabolic syndrome. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* **2020**, *23*, 189–230, doi:10.5223/pghn.2020.23.3.189.
 51. Han, T.S.; Lean, M.E. A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *J. R. Soc. Med. Cardiovasc. Dis.* **2016**, *5*, 1–13, doi:10.1177/2048004016633371.
 52. Saklayen, M.G. The global epidemic of the metabolic syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.* **2018**, *20*, 1–8, doi:10.1007/s11906-018-0812-z.
 53. Jeong, I.-K. The role of cortisol in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Diabetes Metab J* **2012**, *36*, 207–210, doi:http://dx.doi.org/10.4093/dmj.2012.36.3.207.
 54. Constantinopoulos, P.; Michalaki, M.; Kottorou, A.; Habeos, I.; Psyrogiannis, A.; Kalfarentzos, F.; Kyriazopoulou, V. Cortisol in tissue and systemic level as a contributing factor to the development of metabolic syndrome in severely obese patients. *Eur. J. Endocrinol.* **2015**, *172*, 69–78, doi:10.1530/EJE-14-0626.
 55. Wester, V.L.; van Rossum, E.F.C. Obesity and metabolic syndrome: a phenotype of mild long-term hypercortisolism? *The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Health and Disease: Cushing's Syndrome and Beyond* 2017, 303–313, doi:10.1007/978-3-319-45950-9_15.
 56. Branth, S.; Ronquist, G.; Stridsberg, M.; Hambraeus, L.; Kindgren, E.; Olsson, R.; Carlander, D.; Arnetz, B. Development of abdominal fat and incipient metabolic syndrome in young healthy men exposed to long-term stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2007**, *17*, 427–435, doi:10.1016/j.numecd.2006.03.001.
 57. Takahashi, A.; Ohira, T.; Okazaki, K.; Yasumura, S.; Sakai, A.; Maeda, M.; Yabe, H.; Hosoya, M.; Ohtsuru, A.; Kawasaki, Y.; et al. Effects of psychological and lifestyle factors on metabolic syndrome following the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident: the Fukushima health management survey. *J. Atheroscler. Thromb.* **2020**, *27*, 1010–1018, doi:10.5551/jat.52225.

58. van den Heuvel, L.L.; Acker, D.; du Plessis, S.; Stalder, T.; Suliman, S.; Thorne, M.Y.; Kirschbaum, C.; Seedat, S. Hair cortisol as a biomarker of stress and resilience in South African mixed ancestry females. *Psychoneuroendocrinology* **2020**, *113*, 1–11, doi:10.1016/j.psyneuen.2019.104543.
59. Lehrer, H.M.; Steinhardt, M.A.; Dubois, S.K.; Laudenslager, M.L. Perceived stress, psychological resilience, hair cortisol concentration, and metabolic syndrome severity: a moderated mediation model. *Psychoneuroendocrinology* **2020**, *113*, 1–8, doi:10.1016/j.psyneuen.2019.104510.

PUBLICATIONS AND PRESENTATIONS

Publications related to the topic of the thesis:

1. **Mazgelytė E**, Burokienė N, Vysocka A, Narkevičius M, Petrėnas T, Kaminskas A, Songailienė J, Utkus A, Karčiauskaitė D. Higher levels of stress-related hair steroid hormones are associated with the increased SCORE2 risk prediction algorithm in apparently healthy women. *Journal of cardiovascular development and disease*. Basel: MDPI. eISSN 2308-3425. 2022, vol. 9, No. 3, art. no. 70, p. [1-17]. DOI: 10.3390/jcdd9030070. Impact factor – 3.948.
2. **Mazgelytė E**, Mažeikienė A, Burokienė N, Matuzevičienė R, Linkevičiūtė A, Kučinskienė ZA, Karčiauskaitė D. Association between hair cortisol concentration and metabolic syndrome. *Open medicine*. Warszawa: Walter de Gruyter Poland. eISSN 2391-5463. 2021, vol. 16, p. 873-881. DOI: 10.1515/med-2021-0298. Impact factor – 2.199.
3. **Mazgelytė E**, Karčiauskaitė D, Linkevičiūtė A, Mažeikienė A, Burokienė N, Matuzevičienė R, Radzevičius M, Janulionienė A, Jakaitienė A, Dindienė L, Kučinskienė ZA. Association of hair cortisol concentration with prevalence of major cardiovascular risk factors and allostatic load. *Medical Science monitor*. Melville, NY: International scientific information. ISSN 1234-1010. eISSN 1643-3750. 2019, vol. 25, p. 3573-3582. DOI: 10.12659/MSM.913532. Impact factor – 1.918.
4. Aleknavičiūtė G, **Mazgelytė E**, Mažeikienė A, Karčiauskaitė D, Kučinskienė ZA. Investigation of steroid hormones in human hair and saliva samples: a review of research methodologies. *Laboratorinė medicina*. Vilnius: Lithuanian Society of Laboratory Medicine. ISSN 1392-6470. 2019, t. 21, Nr. 3(83), p. 138-145.
5. **Mazgelytė E**, Karčiauskaitė D, Linkevičiūtė A, Kučinskienė ZA. The significance of hair cortisol analysis in clinical practise and research. *Laboratorinė medicina*. Vilnius: Lithuanian Society of Laboratory Medicine. ISSN 1392-6470. 2018, t. 20, nr. 2, p. 160-167.

Publications partially related to the topic of the thesis:

1. Bekešienė S, Smaliukienė R, Vaičaitienė R, Mažeikienė A, Larsson UG, Karčiauskaitė D, **Mazgelytė E**. Three-faceted approach to perceived stress: a longitudinal study of stress hormones, personality, and group cohesion in the real-life setting of compulsory basic military training. *Sustainability: Security Challenges in the Context of Sustainability*. Basel: MDPI. ISSN 2071-1050. 2022, vol. 14, iss. 3, art. no. 1046, p. 1-13. DOI: 10.3390/su14031046. Impact factor – 3.251.
2. Larsson UG, Smaliukienė R, Mažeikienė A, Vaičaitienė R, Bekešienė S, **Mazgelytė E**, Karčiauskaitė D. Perceived stress and hair cortisol levels amongst conscripts during basic military training: a repeated measures study. *Military psychology*. Abingdon: Routledge Journals. ISSN 0899-5605. eISSN 1532-7876. 2022, first online, p. [1-10]. DOI: 10.1080/08995605.2021.2018902. Impact factor – 1.298.
3. Smaliukienė R, Bekešienė S, Mažeikienė A, Larsson UG, Karčiauskaitė D, **Mazgelytė E**, Vaičaitienė R. Hair cortisol, perceived stress, and the effect of group dynamics: a longitudinal study of young men during compulsory military training in Lithuania. *International Journal of Environmental Research and Public Health: Emergent Topics in Young Adult Health Disparities*. Basel: MDPI. ISSN 1661-7827. eISSN 1660-4601. 2022, vol. 19, iss. 3, art. no. 1663, p. 1-15. DOI: 10.3390/ijerph19031663. Impact factor – 3.390.
4. Mažeikienė A, Bekešienė S, Karčiauskaitė D, **Mazgelytė E**, Larsson UG, Petrėnas T, Kaminskas A, Songailienė J, Utkus A, Vaičaitienė R, Smaliukienė R. The association between endogenous hair steroid hormones and social environmental factors in a group of conscripts during basic military training. *International journal of environmental research and public health*. Basel: MDPI. eISSN 1660-4601. 2021, vol. 18, no. 22, art. no.12239, p. [1-18]. DOI: 10.3390/ijerph182212239. Impact factor – 3.390.

5. **Mazgelytė E**, Chomentauskas G, Dereškevičiūtė E, Rekiėnė V, Jakaitienė A, Petrėnas T, Songailienė J, Utkus A, Kučinskienė ZA, Karčiauskaitė D. Association of salivary steroid hormones and their ratios with time-domain heart rate variability indices in healthy individuals. *Journal of medical biochemistry*. Belgrade: Society of Medical Biochemists of Serbia. ISSN 1452-8258. eISSN 1452-8266. 2021, vol. 40, no. 2, p. 173-180. DOI: 10.5937/jomb0-26045. Impact factor – 3.402.
6. **Mazgelytė E**, Rekiėnė V, Dereškevičiūtė E, Petrėnas T, Songailienė J, Utkus A, Chomentauskas G, Karčiauskaitė D. Effects of virtual reality-based relaxation techniques on psychological, physiological, and biochemical stress indicators. *Healthcare*. Basel: MDPI. eISSN 2227-9032. 2021, vol. 9, art. no. 1729, p. [1-14]. DOI: 10.3390/healthcare9121729. Impact factor – 2.645.
7. Mažeikienė A, **Mazgelytė E**, Karčiauskaitė D, Burokienė N, Jablonskienė V, Linkevičiūtė A, Kučinskienė ZA. Association of oxidative and antioxidant system parameters with psychosocial stress level and blood serum, salivary and hair cortisol concentration. *Laboratorinė medicina*. Vilnius: Lithuanian Society of Laboratory Medicine. ISSN 1392-6470. 2019, t. 21, Nr. 4, p. 163-171.
8. Strauzaitė I, **Mazgelytė E**, Karčiauskaitė D, Chomentauskas G. Application of biochemical, physiological and psychological stress assessment methods in examining the effectiveness of stress management algorithm in a group of healthy individuals. *Laboratorinė medicina*. Vilnius: Lithuanian Society of Laboratory Medicine. ISSN 1392-6470. 2021, t. 23, Nr. 1, p. 26-32.

Oral presentations:

1. **Mazgelytė E** (speaker), Burokienė N, Kučinskienė ZA, Karčiauskaitė D. Association between metabolic syndrome and hair steroid hormone levels in women participating in the national cardiovascular disease prevention program. 5th International Conference of Evolutionary Medicine, Vilnius, Lithuania, 24-27th of August 2022. The presentation was awarded as the best PhD student oral presentation.

2. **Mazgelytė E.** MODY diabetes – challenges of genetic testing. A virtual scientific-practical conference “Genetics in multidisciplinary care for patients with rare diseases“, Vilnius university, Faculty of Medicine, Lithuanian Society of Human Genetics, 25th of March 2022.
3. **Mazgelytė E.** Genetics of diabetes mellitus. A virtual scientific-practical conference “Congenital and/or inherited genetic diseases: challenges of genetic testing“, Vilnius university, Faculty of Medicine, 30th of September 2021.
4. **Mazgelytė E** (speaker), Burokienė N, Karčiauskaitė D, Kučinskienė ZA. Steroid hormones in hair samples: analysis methods, association with the chronic stress and cardiovascular disease risk. 14th LSA conference of young scientists Bioateitis, Kaunas, Lithuania, 25th of October 2021. The presentation was awarded 2nd place.
5. **Mazgelytė E.** Analysis of steroid hormones in human hair samples. 15th Baltic Congress in laboratory medicine, Riga, Latvia, 6-7th of October 2020.
6. **Mazgelytė E** (speaker), Kučinskienė ZA. The comparison of objective and subjective chronic stress assessment techniques. International doctoral and resident students conference: Science for health, Kaunas, Lithuania, 9th of April 2019. The presentation was awarded 1st place.
7. **Mazgelytė E** (speaker), Karčiauskaitė D, Linkevičiūtė A, Kučinskienė ZA. Methodological considerations for measuring hair cortisol level as a biological marker of chronic stress. International conference on Evolutionary Medicine, Vilnius, Lithuania, 5-10th of June 2018.

Poster presentations:

1. Černiauskas L, **Mazgelytė E**, Burokienė N, Karčiauskaitė D. Discordance between low-density lipoprotein cholesterol or non-high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B based classification of atherosclerosis risk in female patients. 5th International Conference of Evolutionary Medicine, Vilnius, Lithuania, 24-27th of August 2022.
2. **Mazgelytė E**, Vysocka A, Narkevičius M, Burokienė N, Petrėnas T, Kaminskas A, Songailienė J, Utkus A, Karčiauskaitė D. Association between hair steroid hormone levels and cardiometabolic risk factors in a group of women participating in the national CVD prevention program: a cross-sectional study. 90th European Atherosclerosis Society congress, Milan, Italy, 22-25th of May 2022.
3. Černiauskas L, Radzevičius M, Matuzevičienė R, Mažeikienė A, Burokienė N, **Mazgelytė E**, Kučinskienė ZA, Karčiauskaitė D. Cholesterol efflux capacity is associated with inflammation level and monocyte-platelet aggregates in healthy men. 89th European Atherosclerosis Society virtual congress, 30th of May-2nd of June 2021. *Atherosclerosis*. Park Shannon: Elsevier. ISSN 0021-9150. eISSN 1879-1484. 2021, vol. 331, p. e129. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2021.06.384.
4. **Mazgelytė E**, Vysocka A, Narkevičius M, Burokienė N, Petrėnas T, Kaminskas A, Songailienė J, Utkus A, Karčiauskaitė D. Association of hair steroid hormone levels with habitual sleep quality in middle-aged and older women. 51st Virtual Annual Meeting of the International Society of Psychoneuroendocrinology, 7-9th of September 2021. *Psychoneuroendocrinology*: vol. 131, suppl.: ISPNE 2021 Annual Meeting Abstracts. Oxford: Pergamon-Elsevier science. ISSN 0306-4530. eISSN 1873-3360. 2021, vol. 131, suppl. p. s12. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2021.105495.

5. **Mazgelytė E**, Karčiauskaitė D, Mažeikienė A, Matuzevičienė R, Burokienė N, Linkevičiūtė A, Kučinskienė ZA. Association of hair cortisol concentration with systematic coronary risk evaluation (SCORE) index. 88th European Atherosclerosis Society virtual congress, 4-7th of October 2020. *Atherosclerosis*. East Park Shannon: Elsevier Ireland. ISSN 0021-9150. eISSN 1879-1484. 2020, vol. 315, abstract no. 381, p. e130. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.10.400.
6. Gao W, **Mazgelytė E**, Leutner L, Kirschbaum C. Differential washout effect of five steroid hormones incorporated into hair: Can we compute a retrospective stress hormone calendar? 49th Annual Meeting of the International Society of Psychoneuroendocrinology, Milan, Italy, 29-31st of August 2019. *Psychoneuroendocrinology*. Oxford: Pergamon-Elsevier science. ISSN 0306-4530. 2019, vol. 107, suppl. S, p. 42. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2019.07.121.
7. Gao W, **Mazgelytė E**, Leutner L, Kirschbaum C. Differential washout effect of five steroid hormones incorporated into hair: Can we compute a retrospective stress hormone calendar? 45th Annual Meeting “Psychologie und Gehirn“, Dresden, Germany, 20-22nd of June 2019, Abstract book, p. 136-137.
8. **Mazgelytė E**, Karčiauskaitė D, Matuzevičienė R, Burokienė N, Mažeikienė A, Linkevičiūtė A, Kučinskienė ZA. Association of hair cortisol concentration with the prevalence of traditional cardiovascular risk factors. 87th European Atherosclerosis Society Congress, Maastricht, Netherlands, 25-29th of May 2019. *Atherosclerosis*. East Park Shannon: Elsevier Ireland Ltd. ISSN 0021-9150. eISSN 1879-1484. 2019, vol. 287, p. e255-e256. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.06.787.
9. **Mazgelytė E**, Karčiauskaitė D, Matuzevičienė R, Burokienė N, Mažeikienė A, Linkevičiūtė A, Kučinskienė ZA. Objectively, but not subjectively, measured stress is associated with the prevalence of metabolic syndrome. 23rd IFCC-EFLM European congress of clinical chemistry and laboratory medicine, Barcelona, Spain, 19-23rd of May 2019. *Clinica chimica acta*: Amsterdam: Elsevier Science BV. ISSN 0009-8981. eISSN 1873-3492. 2019, vol. 493, suppl. 1, p. S281. DOI: 10.1016/j.cca.2019.03.580.

10. Karčiauskaitė D, **Mazgelytė E**, Matuzevičienė R, Burokienė N, Mažeikienė A, Linkevičiūtė A, Kučinskienė ZA. Association between hair cortisol concentration and atherosclerosis risk factors in healthy Lithuanian men. 14th Baltic Congress in laboratory medicine, Vilnius, Lithuania, 10-12nd of May 2018. Abstract book T.20 special. suppl.

Traineeships:

1. Dresden University of Technology, Dresden, Germany (head: prof. C. Kirschbaum), 18th of February-2nd of March 2019.
2. International Atherosclerosis Research School, Prague, Czech Republic, 17-23rd of August 2019.

PADĖKA

Dėkoju mokslinei vadovei doc. dr. Dovilei Karčiauskaitei bei mokslinei konsultantei akad. prof. habil. dr. Zitai Aušrelei Kučinskienei už galimybę atlikti šį disertacinį darbą, pasitikėjimą, vertingą pagalbą ir patarimus bei skatinimą tobulėti.

Už suteiktą galimybę išmokti, naudingus praktinius patarimus ir draugišką atmosferą dėkoju Drezdeno technikos universiteto profesoriui Clemens Kirschbaum ir visam jo vadovaujamos laboratorijos mokslininkų kolektyvui.

Esu dėkinga doc. dr. Neringai Burokienei už nuoširdų bendradarbiavimą, palaikymą ir pagalbą sudarant tiriamųjų imtį.

Dėkoju prof. dr. (HP) Algirdui Utkui ir dr. Jurgitai Songailienei už galimybę pasinaudoti VU MF BMI ŽMGK laboratorijos įranga. Taip pat dėkoju dr. Tomui Petrėnui ir dr. Andriui Kaminskui už pagalbą įdiegiant ESCh-MS/MS metodą.

Taip pat už vertingas pastabas ir pagalbą redaguojant mokslinį darbą dėkoju šio disertacinio darbo recenzentams – doc. dr. Valerijai Jablonskienei, doc. dr. Daliui Vitkui ir prof. dr. Daivai Urbonienei.

Pačius šilčiausius padėkos žodžius skiriu savo šeimai už besąlygišką palaikymą, kantrybę ir supratimą.

CURRICULUM VITAE

Asmeniniai duomenys:	
Vardas	Eglė
Pavardė	Mazgelytė
Gimimo data	1993-12-23
Adresas	Nugalėtojų g. 8-1, Vilnius
Telefono nr.	+370 6 100 3427
El. paštas	egle.mazgelyte@mf.vu.lt
Išsilavinimas:	
2018–2022	Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas, Doktorantūros studijos
2016–2018	Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas, Medicinos biologijos magistrantūra (<i>Cum Laude</i> diplomas, Nr. MA1643525)
2012–2016	Vilniaus universiteto Chemijos fakultetas, Biochemijos bakalauro (<i>Cum Laude</i> diplomas, Nr. BA1319610)
2008–2012	Vilniaus Žirmūnų gimnazija
Profesinė patirtis:	
2020–dabar	Medicinos biologė; VšĮ Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos, Medicininės genetikos centras, Santariškių g. 2, Vilnius 08661, Lietuva
2019–dabar	Jaunesnioji mokslo darbuotoja; Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas, M. K. Čiurlionio g. 21, Vilnius 03101, Lietuva
2018–dabar	Jaunesnioji asistentė; Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas, M. K. Čiurlionio g. 21, Vilnius 03101, Lietuva
Dėstomi dalykai:	
Biochemija (lietuvių kalba), Molekulinė diagnostika (lietuvių kalba), Laboratorinė medicina (lietuvių ir anglų kalba), Pagrindinės biologijos sąvokos (anglų kalba)	
Kvalifikacijos kėlimas:	
2022 05 22–25	90-asis Europos aterosklerozės draugijos kongresas, Milanai, Italija
2022 04 10–14	IFCC-EFLM Europos šalių klinikinės chemijos ir laboratorinės medicinos kongresas, Miunchenas, Vokietija

2021 12 09	Virtuali mokslinė-praktinė konferencija „Įgimtos ir/ar paveldimos genetinės ligos: nuo ligos iki genų ir atgal“
2021 12 03–04	Virtuali Baltijos šalių aterosklerozės draugijos konferencija
2021 11 25	14-oji Lietuvos jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioaitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“, Kaunas, Lietuva
2021 09 30	Virtuali mokslinė-praktinė konferencija „Įgimtos ir/ar paveldimos genetinės ligos: nuo ligos iki genų ir atgal“
2021 05 28	Virtuali Baltijos šalių metabolinių ligų draugijos konferencija „Inborn errors of metabolism presenting with psychiatric symptoms“
2021 04 22	Virtuali mokslinė-praktinė konferencija „Įgimtos ir/ar paveldimos genetinės ligos: nuo ligos iki genų ir atgal“
2021 04 20	Virtuali mokslinė-praktinė konferencija „Retos paveldimos ligos kardiologijoje“
2021 03 26	Mokslinė-praktinė konferencija „Medicinos technologijos ir klinikinė praktika: nuo infekcijų kontrolės valdymo iki profesinės etikos iššūkių“
2021 01 14	Virtuali konferencija „Druskos ir jodo suvartojimas populiacijoje: nacionalinės rekomendacijos“
2020 12 02	Virtuali konferencija „Laboratorinės diagnostikos apžvalga 2020 metais“
2020 11 06–07	15-asis virtualus Baltijos šalių laboratorinės medicinos kongresas
2020 11 04–07	88-asis virtualus Europos aterosklerozės draugijos kongresas
2020 10 29	Kasmetinė Pasaulinei trombozės dienai skirta virtuali mokslinė-praktinė konferencija „Ką klinicistai turėtų žinoti, o laboratorija atlikti“
2019 08 29–31	49-asis tarptautinis psichoneuroendokrinologijos draugijos kongresas, Milanai, Italija
2019 05 25–29	87-asis Europos aterosklerozės draugijos kongresas, Maastrichtas, Nyderlandai

2019 05 02–03	Tarptautinė mokslinė-praktinė konferencija „Genes: from past to the future“
2019 04 09	Tarptautinė doktorantų ir rezidentų konferencija „Health for all“, Kaunas, Lietuva
2019 02 07–08	Tyrimų etikos seminarų ciklas „Research Ethics & Research Integrity: Basics and recent developments“, Vilnius, Lietuva
2019 01 11	Medicinos edukologijos mokymai „Klinikiniai mokymo metodai – kompetencijomis grįstas medicinos mokymas“, Vilnius, Lietuva
2018 11 22	Kursai „Informacijos tvarkymas programa Mendeley: praktinis užsiėmimas“, Vilnius, Lietuva
2018 11 15	Kursai „Mokslinė informacija: paieška, mokslometrija, duomenų talpyklos“, Vilnius, Lietuva
2018 09 24–25	Kursai „Patikimos medicinos informacijos paieška“, Vilnius Lietuva
2018 06 05–08	Evoliucinė medicina: sveikata ir ligos besikeičiančioje aplinkoje, Vilnius, Lietuva
2018 05 10–12	14-asis Baltijos šalių laboratorinės medicinos kongresas, Vilnius, Lietuva

Moksliniai tyrimai:

2022–dabar	Biomedicininis tyrimas „Pavienujų ląstelių transkriptomikos tyrimai vaisiaus vandens ėminiuose“. VRBTEK leidimo, išduoto 2022 m. balandžio 12 d., Nr. 2022/4-1429-900, tyrėja.
2020–2022	Biomedicininis tyrimas „Steroidinių hormonų koncentracijos plaukuose sąsąja su moterų patiriamu lėtinio streso lygiu ir rizika sirgti širdies ir kraujagyslių ligomis“. VRBTEK leidimo, išduoto 2020 m. rugpjūčio 25 d., Nr. 2020/8-1254-735, tyrėja.
2021	Biomedicininis tyrimas „Inovatyvių neintervencinių biomedicininų tyrimų pritaikymas valdant stresą grupės dinamikoje: šauktinių atvejis Lietuvoje“. Projektas vykdomas ir finansuojamas pagal Lietuvos mokslo tarybos remiamą veiklos kryptį „Mokslininkų grupių projektai“,

	<p>sutarties Nr. S-MIP-20-59, registracijos Nr. P-MIP-20-204, asociacijos sutarties Nr. (1.79 E) SU-11272020, jaunesnioji mokslo darbuotoja.</p> <p>Biomedicininis tyrimas „Streso valdymo virtualios realybės terpėje ir streso monitoringo algoritmo sukūrimas“. Projektas vykdomas ir finansuojamas Europos Sąjungos struktūrinių fondų lėšomis (sutarties Nr. S-J05-LVPA-K-03-0059/73-18-Bvk), jaunesnioji mokslo darbuotoja.</p>
2019–2020	<p>Biomedicininis tyrimas „Depresijos simptomų ir patiriamo streso lygio sąsajos su vitamino D koncentracijos kraujo serume pokyčiais“. VRBTEK leidimo, išduoto 2019 m. gegužės 27 d., Nr. 2019/5-1136-627, tyrėja.</p>
2019	

Apdovanojimai:

1. Apdovanojimas už geriausią žodinių pranešimą „Association between metabolic syndrome and hair steroid hormone levels in women participating in the national cardiovascular disease prevention program“, 5-oji tarptautinė Evoliucinės medicinos konferencija, Vilnius, Lietuva, 2022 m. rugpjūčio 24-27 d.
2. Antrosios vietos apdovanojimas už pranešimą „Steroidiniai hormonai plaukuose: tyrimo metodai, sąsaja su patiriamu lėtinio streso lygiu bei rizika sirgti širdies ir kraujagyslių ligomis“, 14-oji Lietuvos jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“, Kaunas, Lietuva, 2021 m. lapkričio 25 d.
3. Pirmosios vietos apdovanojimas už pranešimą „The comparison of objective and subjective chronic stress assessment techniques“. Tarptautinė doktorantų ir rezidentų konferencija, Kaunas, Lietuva, 2019 m. balandžio 9 d.

Stipendijos:

2022	Lietuvos mokslo tarybos stipendija už studijų rezultatus (Nr. P-DAP-22-211)
2020	Lietuvos mokslo tarybos stipendija už studijų rezultatus (Nr. P-DAP-20-317)
2017–2018	Skatinamoji stipendija (magistrantūros studijos)
2013–2016	Skatinamoji stipendija (bakaluro studijos)

Narystės:

2021–dabar	Lietuvos žmogaus ir medicininės genetikos draugijos narė
2019–dabar	Tarptautinės psichoneuroendokrinologijos draugijos narė

2018–dabar

Europos aterosklerozės draugijos narė

2016–dabar

Lietuvos laboratorinės medicinos draugijos
narė

Domėjimosi sritys:

Širdies ir kraujagyslių ligos, jų etiopatogenezė, rizikos veiksniai, diagnostiniai
žymenys ir prevencija, retų genetinių ligų molekulinė diagnostika

PRIEDAI

1 PRIEDAS. Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas atlikti ATEROSTRES biomedicininį tyrimą



VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETAS

Viešoji įstaiga, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, tel. (8 5) 268 7001, faks. (8 5) 272 8646, el. p. infor@cr.vu.lt.

Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 211950810.

Fakulteto duomenys: M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 239 8701, (8 5) 239 7800, faks. (8 5) 239 8705, el. p. mf@mf.vu.lt

VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 268 6998, el. p. rbtek@mf.vu.lt

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2015-10-06 Nr.158200-15-807-319

Tyrimo pavadinimas:

Letinio streso nulemti aterosklerozės proceso ypatumai: naujų biožymenų paieška ir tyrimas

Protokolo Nr.: 1
Versija: 2
Data: 2015-10-05
Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma:
Versija: 2
Data: 2015-10-05
Priedas Nr. 1: Streso vertinimo klausimynas
Versija: 2
Data: 2015-10-05
Priedas Nr. 2: Ūminio streso mėginio protokolas
Versija: 2
Data: 2015-10-05

Pagrindiniai tyrėjai:

Zita Aušrelė Kučinskienė

Ištaigos pavadinimas:

Vilniaus universitetas Medicinos fakultetas

Padalinio pavadinimas:

Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedra

Adresas:

Santariškių g. 2, LT-08661 Vilnius

Leidimas galioja iki:

2018-03-31

Leidimas išduotas Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto posėdžio (protokolas Nr. 158200-2015/10, vykusio 2015 m. spalio mėn. 06 d., sprendimu.

Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto ekspertų grupės nariai			
Nr.	Vardas, pavardė	veiklos sritis	dalyvavo posėdyje
1	doc. dr. Laimutė Jakavonytė	filosofija	ne
2	prof.dr. Jolanta Dadonienė	epidemiologija, medicina	taip
3	doc.dr. Jaunius Gumbis	teisė	ne
4	Genovaitė Bulzgytė	slauga	taip
5	prof.dr. Augustina Jankauskienė	medicina	ne
6	dr. Laura Malinauskienė	medicina	taip
7	Eglė Zubienė	psichologija	taip
8	Ugnė Sakūnienė	pacientų teisės	taip

Pirmininkė



Laura Malinauskienė

2 PRIEDAS. Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas atlikti biomedicininį tyrimą „Steroidinių hormonų koncentracijos plaukuose sąsaja su moterų patiriamu lėtinio streso lygiu ir rizika sirgti širdies ir kraujagyslių ligomis“



VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS
sui generis darinys prie VILNIAUS UNIVERSITETO

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2020 08 25 Nr.2020/8-1254-735

Tyrimo pavadinimas:

Steroidinių hormonų koncentracijos plaukuose sąsaja su moterų patiriamu lėtinio streso lygiu ir rizika sirgti širdies ir kraujagyslių ligomis

Protokolo Nr.: 1
Versija: 2
Data: 2020 07 30

Informuoto asmens sutikimo forma: 2
2020 07 30

Pagrindinis tyrėjas: **Dovilė Karčiauskaitė**

Įstaigos pavadinimas: VšĮ Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos

Adresas: Santariškių g. 2, Vilnius

Leidimas galioja iki: **2022 08**

Leidimas išduotas Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto posėdžio (protokolas Nr. 2020/8), vykusio 2020 m. rugpjūčio 25 d. sprendimu.

Pirmininkas

prof. dr. (HP) Saulius Vosylius

Viešoji įstaiga
Universiteto g. 3
01513 Vilnius

Duomenys kaupiami ir saugomi
Juridinių asmenų registre
Kodas 211950810

Komiteto duomenys:
M. K. Čurlionio g. 21, LT-03101 Vilnius
Tel. (8 5) 268 6998, el. p. rbtek@mf.vu.lt

3 PRIEDAS. Subjektyviai suvokto streso skalė

Šioje skalėje pateikti klausimai apie Jūsų jausmus ir mintis per PASTARĄJĮ MĖNESĮ. Ties kiekvienu klausimu pažymėkite savo atsakymą apveddami rutuliuku ant skaičiaus, kuris nurodo KAIP DAŽNAI Jus vienaip ar kitaip jautėtės ar galvojote:

	Niekada	Beveik niekada	Kartais	Dažnai	Labai dažnai
1. Kaip dažnai per pastarąjį mėnesį buvot nusiminęs dėl kažko, kas nutiko netikėtai?	0	1	2	3	4
2. Kaip dažnai per pastarąjį mėnesį jautėte, kad negalėjote kontroliuoti svarbių dalykų savo gyvenime?	0	1	2	3	4
3. Kaip dažnai per pastarąjį mėnesį jautėtės nervingas ir įsitemęs?	0	1	2	3	4
4. Kaip dažnai per pastarąjį mėnesį jautėte, jog sugebėjote susitvarkyti su asmeninėmis problemomis?	0	1	2	3	4
5. Kaip dažnai per pastarąjį mėnesį jautėte, kad viskas vyko Jums palankia kryptimi?	0	1	2	3	4
6. Kaip dažnai per pastarąjį mėnesį pastebėdavote, kad negalėjote susitvarkyti su visais dalykais, kuriuos turėjote padaryti?	0	1	2	3	4
7. Kaip dažnai per pastarąjį mėnesį sugebėjote suvaldyti susierzinimą savo gyvenime?	0	1	2	3	4
8. Kaip dažnai per pastarąjį mėnesį jautėte, kad viską kontroliuojate?	0	1	2	3	4
9. Kaip dažnai per pastarąjį mėnesį jautėte pyktį, dėl dalykų, kurių negalėjote kontroliuoti?	0	1	2	3	4
10. Kaip dažnai per pastarąjį mėnesį jautėte, kad sunkumų susikauptė tiek daug, kad negalėjote jų įveikti?	0	1	2	3	4

4 PRIEDAS. STAI (angl. *State-Trait Anxiety Inventory*) klausimyno skalė

Žemiau pateikta keletas teiginių, skirtų žmonių nuotaikai ir savijautai apibūdinti. Perskaitykite kiekvieną teiginį ir pažymėkite labiausiai Jūsų *pastovią (įprastą)* nuotaiką ir savijautą, t.y. tai, *kaip Jūs dažniausiai jaučiatės*, atitinkantį atsakymą.

	Beveik niekada	kartais	dažnai	beveik visada
1. Aš jaučiuosi maloniai.	1	2	3	4
2. Aš jaučiuosi nervingas (-a) ir nenustygsiu vietoje.	1	2	3	4
3. Aš jaučiuosi savimi patenkintas (-a).	1	2	3	4
4. Aš norėčiau būti toks (-ia) pat laimingas (-a) kaip ir kiti.	1	2	3	4
5. Aš jaučiuosi kaip nevykėlis (-ė).	1	2	3	4
6. Aš jaučiuosi pailsėjęs (-usi).	1	2	3	4
7. Aš esu ramus (-i), šaltakraujiškas (-a) ir susikaupęs (-usi).	1	2	3	4
8. Aš jaučiu kaip kaupiasi sunkumai ir negaliu jų įveikti.	1	2	3	4
9. Aš per daug pergyvenu dėl smulkmenų.	1	2	3	4
10. Aš esu laimingas (-a).	1	2	3	4
11. Mano mintys man kelia nerimą.	1	2	3	4
12. Man stinga pasitikėjimo savimi.	1	2	3	4
13. Aš jaučiuosi saugiai.	1	2	3	4
14. Aš lengvai priimu sprendimus.	1	2	3	4
15. Aš jaučiuosi nepilnavertis (-ė).	1	2	3	4
16. Aš esu patenkintas (-a).	1	2	3	4
17. Kiekviena smulkmena mane blaško ir neduoda ramybės.	1	2	3	4
18. Aš sunkiai priimu nusivylimus ir ilgai negaliu jų pamiršti.	1	2	3	4
19. Aš esu stabilus žmogus.	1	2	3	4
20. Kai galvoju apie dabartinius savo rūpesčius ir reikalus, aš patiriu įtampą ir sąmyšį.	1	2	3	4

5 PRIEDAS. Pitsburgo miego kokybės indeksas

NURODYMAI

Sekantys klausimai siejasi tik su praėjusio mėnesio miegu. Jūsų atsakymai turėtų atspindėti daugumą praėjusio mėnesio dienų ir naktų. Prašome atsakyti į visus klausimus.

1. Kelintą valandą vakare Jūs paprastai atsigulate?

GULIMOSI LAIKAS _____

2. Per kiek minučių Jūs paprastai užmiegate kiekvieną vakarą?

MINUTĖS _____

3. Kelintą valandą Jūs paprastai pats pabundate ryte?

PRABUDIMOLAIKAS _____

4. Kiek valandų per naktį Jūs miegate? (Atsakymas nebūtinai turi sutapti su buvimo lovoje trukme)

MIEGO VALANDOS PER NAKTĮ _____

Kiekvienam sekančiam klausimui pažymėkite vieną atsakymą. Prašome atsakyti visus klausimus.

5. Kaip dažnai, per praėjusį mėnesį, Jūs blogai miegojote dėl to, kad...

a) negalėdavote užmigti per 30 min.

nė karto per mėnesį__	mažiau nei 1 kartą per savaitę__	1 ar 2 kartus per savaitę__	3 ar daugiau kartų per savaitę__
--------------------------	-------------------------------------	--------------------------------	-------------------------------------

b) atsibudavote vidurį nakties ar anksti ryte

nė karto per mėnesį__	mažiau nei 1 kartą per savaitę__	1 ar 2 kartus per savaitę__	3 ar daugiau kartų per savaitę__
--------------------------	-------------------------------------	--------------------------------	-------------------------------------

c) turėdavote pasinaudoti tualetu

nė karto per mėnesį__	mažiau nei 1 kartą per savaitę__	1 ar 2 kartus per savaitę__	3 ar daugiau kartų per savaitę__
--------------------------	-------------------------------------	--------------------------------	-------------------------------------

d) negalėdavote laisvai kvėpuoti

nė karto per mėnesį__	mažiau nei 1 kartą per savaitę__	1 ar 2 kartus per savaitę__	3 ar daugiau kartų per savaitę__
--------------------------	-------------------------------------	--------------------------------	-------------------------------------

5 PRIEDAS (tęsinys). Pitsburgo miego kokybės indeksas

e) kosėdavote ar garsiai knarkdavote

nė karto per mėnesį__	mažiau nei 1 kartą per savaitę__	1 ar 2 kartus per savaitę__	3 ar daugiau kartų per savaitę__
--------------------------	-------------------------------------	--------------------------------	-------------------------------------

f) būdavo per šalta

nė karto per mėnesį__	mažiau nei 1 kartą per savaitę__	1 ar 2 kartus per savaitę__	3 ar daugiau kartų per savaitę__
--------------------------	-------------------------------------	--------------------------------	-------------------------------------

g) būdavo per karšta

nė karto per mėnesį__	mažiau nei 1 kartą per savaitę__	1 ar 2 kartus per savaitę__	3 ar daugiau kartų per savaitę__
--------------------------	-------------------------------------	--------------------------------	-------------------------------------

h) kankindavo blogi sapnai

nė karto per mėnesį__	mažiau nei 1 kartą per savaitę__	1 ar 2 kartus per savaitę__	3 ar daugiau kartų per savaitę__
--------------------------	-------------------------------------	--------------------------------	-------------------------------------

i) jausdavote skausmą

nė karto per mėnesį__	mažiau nei 1 kartą per savaitę__	1 ar 2 kartus per savaitę__	3 ar daugiau kartų per savaitę__
--------------------------	-------------------------------------	--------------------------------	-------------------------------------

j) būdavo kitų priežasčių _____

nė karto per mėnesį__	mažiau nei 1 kartą per savaitę__	1 ar 2 kartus per savaitę__	3 ar daugiau kartų per savaitę__
--------------------------	-------------------------------------	--------------------------------	-------------------------------------

6. Kaip Jūs bendrai įvertintumėte savo praėjusio mėnesio miego kokybę?

Labai gerai _____
Gerai _____
Blogai _____
Labai blogai _____

7. Kaip dažnai per praėjusį mėnesį Jūs vartojote vaistus dėl blogo miego (išrašytus gydytojo ar nusipirktus be recepto)?

nė karto per mėnesį__	mažiau nei 1 kartą per savaitę__	1 ar 2 kartus per savaitę__	3 ar daugiau kartų per savaitę__
--------------------------	-------------------------------------	--------------------------------	-------------------------------------

8. Kaip dažnai per praėjusį mėnesį Jums būdavo sunku išlikti žvaliam vairuojant automobilį, valgant, vystant socialinę veiklą?

nė karto per mėnesį__	mažiau nei 1 kartą per savaitę__	1 ar 2 kartus per savaitę__	3 ar daugiau kartų per savaitę__
--------------------------	-------------------------------------	--------------------------------	-------------------------------------

5 PRIEDAS (tęsinys). Pitsburgo miego kokybės indeksas

9. Ar praėjusį mėnesį nekilo problemų Jūsų įprastinėje veikloje (dingo susidomėjimas darbu, sumažėjo entuziazmas asmeniniame gyvenime, atsirado abejingumas, apatija)?

Nebuvo problemos _____

Nežymi problema _____

Ženkli problema _____

Labai didelė problema _____

10. Ar miegate su kuo nors vienoje lovoje ar kambaryje?

Nėra partnerio _____

Partneris kitame kambaryje _____

Partneris tame pačiame kambaryje, bet kitoje lovoje _____

Partneris toje pačioje lovoje _____

Jei turite partnerį, paklauskite kaip dažnai Jūs:

a) garsiai knarkėte

nė karto per mėnesį__	mažiau nei 1 kartą per savaitę__	1 ar 2 kartus per savaitę__	3 ar daugiau kartų per savaitę__
--------------------------	-------------------------------------	--------------------------------	-------------------------------------

b) kvėpuojate nelygiai, su ilgomis pauzėmis tarp įkvėpimų

ne karto per mėnesį__	mažiau nei 1 kartą per savaitę__	1 ar 2 kartus per savaitę__	3 ar daugiau kartų per savaitę__
--------------------------	-------------------------------------	--------------------------------	-------------------------------------

c) neramiai judindavote kojas

nė karto per mėnesį__	mažiau nei 1 kartą per savaitę__	1 ar 2 kartus per savaitę__	3 ar daugiau kartų per savaitę__
--------------------------	-------------------------------------	--------------------------------	-------------------------------------

d) blaškydavotės lovoje, būdavote dezorientuotas, sutrikęs

nė karto per mėnesį__	mažiau nei 1 kartą per savaitę__	1 ar 2 kartus per savaitę__	3 ar daugiau kartų per savaitę__
--------------------------	-------------------------------------	--------------------------------	-------------------------------------

e) kiti pastebėjimai, prašome aprašyti _____

nė karto per mėnesį__	mažiau nei 1 kartą per savaitę__	1 ar 2 kartus per savaitę__	3 ar daugiau kartų per savaitę__
--------------------------	-------------------------------------	--------------------------------	-------------------------------------

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
Tiražas 20 egz.