



# NTNU

Kunnskap for en bedre verden

# Bacheloroppgave

**MB301612 Bacheloroppgave**

**$\alpha$ -Amylase og kortisol som biomarkører for stress**

Kandidatnummer: 10003, 10009 og 10012

Totalt antall sider inkludert forsiden: 62

Innlevert Ålesund, 06.06.2017

## Obligatorisk egenerklæring/gruppeerklæring

Den enkelte student er selv ansvarlig for å sette seg inn i hva som er lovlige hjelpemidler, retningslinjer for bruk av disse og regler om kildebruk. Erklæringen skal bevisstgjøre studentene på deres ansvar og hvilke konsekvenser fusk kan medføre. **Manglende erklæring fritar ikke studentene fra sitt ansvar.**

Du/dere fyller ut erklæringen ved å klikke i ruten til høyre for den enkelte del 1-6:		
1.	Jeg/vi erklærer herved at min/vår besvarelse er mitt/vårt eget arbeid, og at jeg/vi ikke har brukt andre kilder eller har mottatt annen hjelp enn det som er nevnt i besvarelsen.	<input type="checkbox"/>
2.	Jeg/vi erklærer videre at denne besvarelsen: <ul style="list-style-type: none"><li>• ikke har vært brukt til annen eksamen ved annen avdeling/universitet/høgskole innenlands eller utenlands.</li><li>• ikke refererer til andres arbeid uten at det er oppgitt.</li><li>• ikke refererer til eget tidligere arbeid uten at det er oppgitt.</li><li>• har alle referansene oppgitt i litteraturlisten.</li><li>• ikke er en kopi, duplikat eller avskrift av andres arbeid eller besvarelse.</li></ul>	<input type="checkbox"/>
3.	Jeg/vi er kjent med at brudd på ovennevnte er å <u>betrakte som fusk</u> og kan medføre annullering av eksamen og utestengelse fra universiteter og høgskoler i Norge, jf. <a href="#">Universitets- og høgskoleloven</a> §§4-7 og 4-8 og Forskrift om eksamen.	<input type="checkbox"/>
4.	Jeg/vi er kjent med at alle innleverte oppgaver kan bli plagiatkontrollert i Ephorus, se Retningslinjer for elektronisk innlevering og publisering av studiepoenggivende studentoppgaver	<input type="checkbox"/>
5.	Jeg/vi er kjent med at høgskolen vil behandle alle saker hvor det forligger mistanke om fusk etter NTNUs studieforskrift.	<input type="checkbox"/>
6.	Jeg/vi har satt oss inn i regler og retningslinjer i bruk av kilder og referanser på biblioteket sine nettsider	<input type="checkbox"/>

# Publiseringsavtale

Studiepoeng: 22,5

Veileder: Ann-Kristin Tveten og Kristine Kvangarsnes

## Fullmakt til elektronisk publisering av oppgaven

Forfatter(ne) har opphavsrett til oppgaven. Det betyr blant annet enerett til å gjøre verket tilgjengelig for allmennheten ([Åndsverkloven §2](#)).

Alle oppgaver som fyller kriteriene vil bli registrert og publisert i Brage med forfatter(ne)s godkjenning.

Oppgaver som er unntatt offentlighet eller båndlagt vil ikke bli publisert.

Jeg/vi gir herved NTNU i Ålesund en vederlagsfri rett til å gjøre oppgaven tilgjengelig for elektronisk publisering:

ja  nei

Er oppgaven båndlagt (konfidensiell)?

ja  nei

(Båndleggingsavtale må fylles ut)

- Hvis ja:

Kan oppgaven publiseres når båndleggingsperioden er over?

ja  nei

Er oppgaven unntatt offentlighet?

ja  nei

(inneholder taushetsbelagt informasjon. [Jfr. Offl. §13](#)/[Fvl. §13](#))

Dato: 06.06.2017

# Forord

Denne rapporten tar for seg stressmåling av aktiviteten/konsentrasjonen av  $\alpha$ -amylase og kortisol i spyttprøver fra ulike personer. Oppgaven er gitt i regi av universitetet NTNU, og er et utdrag av en doktorgradsavhandling som ikke har blitt publisert enda.

Rapporten inneholder grunnleggende informasjon, metoder for gjennomførelse og resultater fra forsøk utført på laboratoriet.

Vi vil gjerne takke våre veiledere Kristine Kvangarsnes og Ann-Kristin Tveten for all hjelpen de har gitt oss med bacheloren og for gode tilbakemeldinger og råd. Vi vil også takke NTNU Campus Ålesund for tilgang til laboratoriet og økonomisk støtte.

Til slutt vil vi takke Stephanie Balters, M.Eng. PhD candidate - Engineering Design and Innovation for tilgang til hennes prøver og resultater.

Sted: NTNU i Ålesund

Dato: 06.06.17

## Sammendrag

Hensikten med denne oppgaven er å finne ut om  $\alpha$ -amylase er en biomarkør som kan måle stress i spytt, og om hvordan den korrelerer med stresshormonet kortisol. Kortisol og  $\alpha$ -amylase er begge indikatorer på stress, og finnes blant annet i spyttet. Spyttprøver fra ulike deltakere testes for  $\alpha$ -amylaseaktivitet og kortisolkonsentrasjon. Resultatene sier noe om stressnivået til en person ved et gitt tidspunkt. De skal blant annet også kunne gi informasjon om hvilke biomarkør som foretrekkes å bruke, eller om det anbefales å bruke begge. Metoden EIA brukes for å finne kortisolkonsentrasjonen i spyttet, og enzymkinetikk for å finne  $\alpha$ -amylaseaktiviteten. Vi ser først på den teoretiske delen av faget, hvor vi deretter går inn på de ulike metodene som tas i bruk ved forsøkene. Videre tolkes resultatene, og utfallene diskuteres. På den gitte problemstillingen har vi kommet frem til en akseptabel løsning. Ut fra våre resultater kan vi si at  $\alpha$ -amylase kan brukes som en biomarkør for stress. Vi anbefaler derimot å bruke både kortisol og  $\alpha$ -amylase for måling av stress i spytt.

For å regne om absorbansen til kortisolresultatene bruker vi "Myassays". Vi benytter dataprogrammet Excel (Microsoft 2016) for å beregne  $\alpha$ -amylaseaktiviteten.

## Innholdsfortegnelse

<b>Forord</b> .....	<b>1</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>2</b>
<b>Terminologi</b> .....	<b>4</b>
Begreper .....	4
Symboler .....	4
Forkortelser .....	5
<b>1 Kapittel 1 - Innledning</b> .....	<b>6</b>
1.1 Bakgrunn .....	6
Problemstilling: .....	6
1.2 Spesifikasjon.....	6
1.3 Mål.....	6
<b>2 Kapittel 2 - Teori</b> .....	<b>8</b>
2.1 Stress.....	8
2.1.1 $\alpha$ -amylase .....	10
2.1.2 Kortisol.....	11
2.2 Metoder.....	13
<b>3 Kapittel 3 – Materialer og metoder</b> .....	<b>15</b>
3.1 Innsamling av prøver .....	15
3.2 Laboratorieforsøk .....	16
3.2.1 Prosedyre – $\alpha$ -amylase .....	16
3.2.2 Prosedyre – Kortisol.....	17
3.2.3 Statistikk og kalkulasjoner .....	19
<b>4 Kapittel 4 - Resultater</b> .....	<b>21</b>
4.1 Kortisolresultatene.....	21
4.2 $\alpha$ - amylaseresultater.....	29
<b>5 Kapittel 5 - Diskusjon</b> .....	<b>35</b>
5.1 Kortisolresultater .....	35
5.2 $\alpha$ -Amylaseresultatene .....	38
<b>6 Kapittel 6 - Konklusjon</b> .....	<b>45</b>
<b>Referanser</b> .....	<b>46</b>
<b>Vedlegg</b> .....	<b>50</b>

# Terminologi

## *Begreper*

<b>Salivette</b>	Beholder til spyttssamling
<b>DetectX cortisol</b>	Kit for kortisol aktivitet i spytt
<b>Stressorer</b>	Fysiske og/eller psykiske ytre faktorer som fører til stressreaksjoner
<b>Absorbans</b>	Kvalitativt uttrykk for lyssets absorpsjon i løsninger og faste stoffer
<b>Bølgelengde</b>	Lengden på en bølge målt i meter
<b>Kyvette</b>	Beholder av glass, plast eller porselen for oppbevaring av væsker.
<b>Globulin</b>	Grupper av proteiner
<b>Assay buffer</b>	Buffer brukt til fortynning av prøvene.
<b>Wash buffer</b>	Buffer brukt til vasking av brønnene som ikke påvirker resultatet.
<b>Konjugat</b>	Stoff som binder markør protein til antistoff for å oppdage antigen.
<b>Antibody</b>	Antistoff/immunglobuliner
<b>Stop solution</b>	Løsning lagd for å stoppe reaksjonen i løsningen.

## *Symboler*

<b>B<sub>0</sub></b>	Maksimale bindingsbrønner
<b><math>\alpha</math></b>	Alfa
<b><math>\beta</math></b>	Beta
<b>U</b>	Units, enheter
<b>ng</b>	Nanogram
<b>mL</b>	Milliliter
<b><math>\mu</math>l</b>	Mikroliter

## ***Forkortelser***

<b>EIA</b>	Enzyme immuno assay
<b>CV</b>	Variabilitetskoeffisienten
<b>TSST</b>	Trier sosial stress test
<b>sAA</b>	Salivary $\alpha$ -amylase
<b>HR</b>	Hjertefrekvens
<b>NSB</b>	NonSpecificBinding, består av assay buffer og kortisol konjugat.
<b>T</b>	Task/test, de ulike spyttprøvene.
<b>M</b>	Deltakernummer
<b>S</b>	Standard, består av assay buffer og cortisol stock
<b><math>\Delta</math>Abs./min</b>	Absorbans forskjell per minutt
<b>TV</b>	Total assay volume (0.328 mL)
<b>DF</b>	Fortynningsfaktor ("Dilution factor")
<b>MMA</b>	Millimolar absorptivitet av 2-kloro-p-nitrofenol (12.9)
<b>SV</b>	Prøvevolum (0.008 mL)
<b>LP</b>	Light path = 0.97
<b>GH</b>	Veksthormon ("Growth hormone")
<b>ACTH</b>	Adrenokortikotropt hormon
<b>TMB</b>	(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)
<b>CPS</b>	Cold pressor stress



# 1 Kapittel 1 - Innledning

## 1.1 Bakgrunn

I en tidsalder hvor det stadig er mer å gjøre, ser vi en stadig økning i stress og stressrelaterte sykdommer. Måling av kortisol og  $\alpha$ -amylase fra spytt kan si noe om stressnivået til en person. Dette kan være nyttig for å finne ut om stresset er negativt eller positivt.

Valg av oppgave baseres på en felles interesse for den medisinske delen av bioteknologi. Oppgaven virker til å gi oss mer innsikt i hvordan måling av stress foregår, samt skaffe erfaring på laboratoriet innen et felt som er lite utforsket gjennom studiet. Temaet i denne oppgaven er svært relevant for vår utdanning, da den handler om det biologiske samspillet i kroppen, og undersøkes ved ulike laboratorieforsøk. Til rådighet hadde vi perioden fra 03.01.2017 til 06.06.2017.

### **Problemstilling:**

Er  $\alpha$ -amylase en biomarkør som kan måle stress i spytt, og hvordan korrelerer denne med stresshormonet kortisol?

## 1.2 Spesifikasjon

Ved gjennomføring av forsøkene blir det brukt ferdig innsamlet materiale fra et tidligere forsøk, ved bruk av en metode som bygger på TSST-metoden. I stedet for den vanlige TSST prøven, brukes en simulatortest for å indusere stress. Det blir valgt 5 spyttprøver ut fra resultatene fra det tidligere forsøket.

Vi sammenligner egne resultater med tidligere forskning og ser på forskjeller mellom de to stressindikatorene. Deretter blir det testet hvilke av metodene som er mest effektiv ut fra reproduserbarheten til resultatene, og om de gjenspeiler stresset til personene.

## 1.3 Mål

Hensikten med bacheloroppgaven er å finne ut om  $\alpha$ -amylase kan brukes som en biomarkør for stress, og om hvordan den korrelerer med kortisol. Dette kan brukes til måling av personers stressnivå, som videre kan si oss noe om hvor stresset en person er. Et annet mål er

å skaffe informasjon om hvilke biomarkør som foretrekkes å bruke, eller om det er anbefalt å bruke begge.

## 2 Kapittel 2 - Teori

### 2.1 Stress

Begrepet stress har mange ulike betydninger og bruksområder, og er derfor vanskelig å definere (1). I dag brukes stress for å beskrive stresspåvirkninger og menneskets symptomer på disse. Ordet kan defineres som et individ som utsettes for påkjenninger som truer med å endre kroppens indre miljø. Stress defineres her som en tilstand av mental eller emosjonell belastning eller spenning som skyldes krevende eller ugunstige forhold (2).

Stress kan deles i tre ulike typer. Fysisk stress er påkjenninger som for eksempel kulde, sykdom, fysiske skader eller smerte. Dersom kroppen blir utsatt for langvarige negative påkjenninger eller traumatiske opplevelser, kan det oppstå psykologisk stress (3). Det kan også forekomme psykologisk stress dersom forventningene og kravene rundt en person overstiger personens egen kapasitet (4). Ved psykiske negative påkjenninger som depresjoner og angst kan emosjonelt stress oppstå.

Stress kan være både positivt og negativt for et menneske. Eksempel på positivt stress er blant annet at det kan hjelpe en til å møte utfordringer i hverdagen, og kan gjøre at en presterer bedre. Stress kan også være noe som fører til helseproblemer, dersom den er langvarig. For eksempel hjerteinfarkt og høyt blodtrykk regnes som negativt stress (5).

Mange av stressorene som påvirker kroppen skal forberede oss til kamp og flukt. (Fright, fight, flight). Frykt forbereder oss til kamp slik at vi kan kjempe mot trusselen, for deretter å flykte fra situasjonen. Når man blir utsatt for en stressende situasjon sender hypofysen ut signaler, slik at kortisol og adrenalin blir produsert i binyrene. Dette gjør at flere reaksjoner blir utløst. Musklene spennes, og leveren frigir mer glukose. Blodet transporterer raskere oksygen og glukose ut der det trengs i kroppen. Over lengre perioder kan dette føre til hjerteinfarkt, som følge av blodpropper. I stressende situasjoner puster man gjerne tyngre og raskere, for å kunne transportere mer oksygen ut i kroppen. Stress fører til dårligere søvnkvalitet grunnet påvirkning av søvnhormonet melatonin. Svekket immunforsvar er også en følge av stress, som kan oppstå dersom kroppen har et høyt kortisolnivå over lengre tidsperiode (4). Stress inneholder hovedsakelig tre komponenter:

- Stimulus (stressor): Forholdene som fører til stress.
- Respons: Personens stressreaksjoner.

- Prosessen mellom stimuli og respons: Hvordan personen opplever stress (6).

Reaksjoner på stressende hendelser er forskjellige fra person til person (2). Det finnes mange faktorer som kan påvirke dette, som fysisk helse, genetikk og personlighet. Dette kan føre til at resultater en får ved stresstester fra forskjellige personer i en tilsvarende situasjon, kan være svært ulike. Denne forskjellen mellom individer kan måles ved hjelp av to stoffer som utskilles i stressende situasjoner. Dette gjelder da enzymet  $\alpha$ -amylase og hormonet kortisol. Stresstester brukes i helsevesenet til å finne ut mer om (7):

- Irregulær hjerterytme
- Symptomer og relasjoner (Hjerte/lunger)
- Hvor hardt du kan trene ved oppstart av hjerte rehabilitering eller treningsprogram.
- Om behandlinger for hjertesykdommer har fungert.
- Om det trengs andre tester for å oppdage tette arterier. Dette kan for eksempel bli gjort ved en treningstest. Da kroppen trenger mer blod, vil en kunne måle om det er mangel på blod ut av en av arteriene.

TSST gjør at man kan undersøke den psykobiologiske stressresponsen. En Trier Sosial Stress Test består i hovedsak av en forventningsperiode (10 minutter) og en testperiode (10 minutter), hvor prøvetakeren holder en tale og løser mentale oppgaver foran et publikum. Flere studier viser til at denne protokollen fører til signifikante endringer i konsentrasjonen av adrenokortikotrop hormon (ACTH), kortisol (serum og spytt), veksthormon (GH), prolaktin (PRL), i tillegg til økt puls. Med tanke på kortisol i spytt, leder TSST til en økning på mellom to til fire ganger så høy økning sett mot lignende kortisoltopper (8). Denne malen for stresstester kan også brukes i andre settinger. Som at testperioden ikke innebærer en tale og mentale oppgaver, men for eksempel simulasjoner av arbeidsoppgaver som kan være både stressende og rolige. For innsamlingen av spyttprøvene blir det brukt en simulasjonsmetode, men med den vanlige tidsfordelingen.

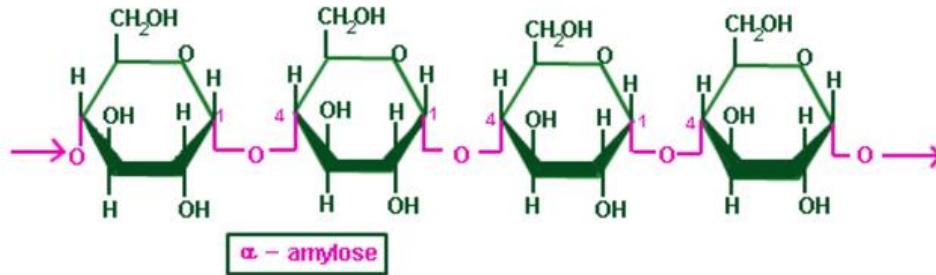
En artikkel fra tidligere forskning viser til en forekommende tilvenning til repeterende stress, men at det krever en mer langstrakt forskning (9). Undersøkelsen deres finner forskjell allerede etter én gjentakelse. Dette er noe som kan ha påvirket resultatene, siden testene er utført på dager rett etter hverandre, eller om det er flere tester på kort tid. Hvor stor effekten er og om den er stor nok til å påvirke resultatene, er noe som krever mer forskning.

### 2.1.1 $\alpha$ -amylase

Amylase er et enzym som spalter polysakkarider som glykogen og stivelse til disakkarider. Enzymet finnes både i magesekken og i spyttet. Det er amylase i spyttet som har betydning for stress. Spyttkjertelene i munnen produserer spyttamylase, som starter fordøyelsesprosessen ved å bryte ned stivelse til blant annet maltose. Når stivelsesholdige matvarer som poteter eller ris begynner å bryte ned i munnen, vil en oppdage en litt søt smak som maltose vil utløse.

Amylase kan deles inn i  $\alpha$ -amylase og  $\beta$ -amylase.

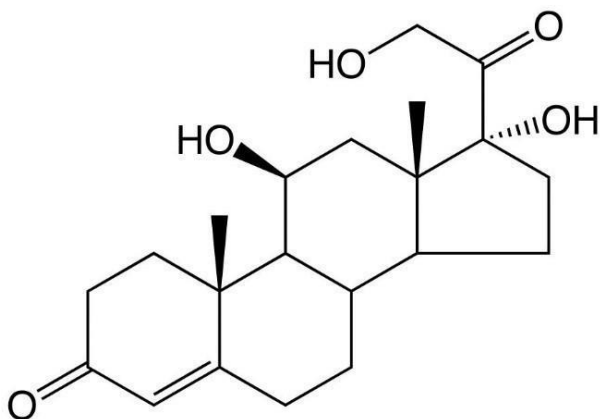
Det offisielle navnet til  $\alpha$ -Amylase er 1,4- $\alpha$ -D-Glucan glucanohydrolase.  $\alpha$ -amylase og  $\beta$ -amylase angriper stivelsen på ulike områder i molekylet.  $\alpha$ -amylase hydrolyserer  $\alpha$ -1,4-bindinger til store polysakkarider.  $\beta$ -amylase er en "exoamylase" som hydrolyserer  $\alpha$ -1,4-glykosidbindinger av polyglukosekjede ved den ikke-reducerende enden for å fremstille maltose (10). I tillegg til sin viktige fordøyelsesfunksjon, spiller  $\alpha$ -amylase en viktig antibakteriell rolle i munnhulen.  $\alpha$ -amylase i spytt viser til en døgnrytme hvor det er en nedgang mellom de 60 første minuttene etter man har våknet. Utover dagen blir det en jevn økning av aktivitet.  $\alpha$ -amylaseproduksjonen i spyttkjertelen viser til økning i respons til psykisk og fysisk stress gjennom det autonome nervesystemet, og det har blitt sett på som en nyttig markør av aktivitet i det autonome nervesystemet (11). Ut fra en artikkel fra tidligere forskning vises  $\alpha$ -amylase i spytt ved stressreaksjon over forskjellige aldersgrupper (12). Resultatene av de eldre voksne viser der nedsatt  $\alpha$ -amylase fra spytt. I en annen artikkel vises  $\alpha$ -amylase- og kortisolresponser i spytt til forskjellige stressoppgaver, påvirket av kjønn (13). Resultatene indikerer der at sAA er en sensitiv markør i både psykologiske og fysiske induerte arousalparadigmer, hvor en kortisolrespons bare er observert i CPS oppgaven. Menn har høyere sAA-nivå enn kvinner i løpet av dette studiet. Det blir ikke funnet noen sterke sammenhenger mellom sAA- og kortisolresponser.



Figur 1. Strukturen til  $\alpha$ -amylose (14).

### 2.1.2 Kortisol

Kortisol er et hormon bedre kjent som "stresshormonet" og har den kjemiske formelen  $C_{21}H_{30}O_5$  (15). Dette skyldes at det kan kobles direkte til stressresponsen. Nivået av kortisol er høyest om morgningen og lavest om kvelden. Kortisol dannes i binyrene av celler ved navnet *zona fasciculata* og er et steroidhormon (16). Pregnenolon dannes som første trinn i syntese av kortisol i cellenes mitokondrier hvor sidekjeden til kolesterolet kuttes av. I det endoplasmatiske retikulum blir det så dannet progesteron og metabolittene  $17\alpha$ -hydroksyprogesteron og 11-deoksykortisol ved hjelp av enzymene  $3\beta$ -hydroksysteroid dehydrogenase,  $17\alpha$ -hydroksylase og 21-hydroksylase. 11-deoksykortisol blir så transportert tilbake inn i mitokondriene og omdannes til kortisol av  $11\beta$ -hydroksylase.



Figur 2. Strukturen til kortisol (17).

Kortisolsekresjonen øker i alle stressende situasjoner. Gjennom hypotalamus stimuleres økningen fra sentralnervesystemet. Hypotalamus stimulerer hypofyseforlappens ACTH-sekresjon. Den sympatiske delen av det autonome nervesystemet aktiveres, og dermed økt

adrenalinsekresjon fra binyremargen (18). Kortisol er et fettløselig hormon. Det kan derfor diffundere fritt ut av mitokondriet, ut av cellen og over til blodbanen. For at kortisol skal overføres til spyttet, må det diffundere gjennom de acinære cellene i spyttkjertelene. Fra det skjer en økning av fritt kortisol i blodet, vil det ha oppstått likevekt i spyttet innen det har gått 5 minutter. Mengden vil tilsvare omtrent to tredeler av den frie konsentrasjonen i blodet (19). De aller fleste cellene i kroppen har reseptorer for kortisol og sekresjonen kontrolleres av hypothalamus, binyrene og hypofysen. Hypofysen stimulerer dette ved å slippe ut kortikotropin fra forlappen. Kortisol har en negativ tilbakekobling som hemmer frigjøringen av kortikotropin. Kortisol regnes som det viktigste glukokortikoidet hos mennesker.

I blodsirkulasjonen vil kortisol være bundet til kortikosteroidbindende globulin. En vil også kunne finne fritt kortisol i blodet. Dette kan passere cellemembraner, binde seg til og aktivere en glukokortikoid-reseptor i cellekjernen. Aktivering av disse reseptorene fører til en opp- og nedregulering i avlesningen av spesifikke gener. Dette leder da til en endring i proteinsyntesen i cellen. Det påvirker blant annet skjelettmuskulatur og lever, hvor kortisol og glukokortikoider bryter ned glykogen og øker dannelsen av glukose, for å påvirke blodsukkernivået. Kortisol vil i tillegg hemme opptaket og forbruket av glukose i perifere vev og gi en økt nedbrytning av fett i fettceller.

Det at mange celler i kroppen har reseptorer for kortisol vil også si at kortisol kan påvirke et stort utvalg av prosesser i kroppen. Kortisol kan blant annet påvirke blodsukkernivået, regulere metabolismen, redusere inflammasjon og hjelpe til på hukommelsesformulering. Det har også en kontrollerende effekt på salt- og vann-balansen i kroppen, og en påvirkning på utviklingen av foster i kvinner under graviditet. Alt i alt gjør dette kortisol til et hormon som er svært viktig for en god helse og velvære. I tillegg til dette har kortisol en hemmende effekt på immunforsvaret ved at det reduserer immunologiske responser. Dette utnyttes til behandling av en rekke sykdommer. Kortisol brukes blant annet til behandling av allergiske sykdommer, autoimmune sykdommer, inflammasjoner, enkelte kreftformer og ved transplantasjoner. Produksjon av benvev og bindevevsdannelse hemmes, utskillelsen av kalsium fra nyrene økes, og nedbrytning av skjelettmuskulatur skjer som følge av kortisol. Kortisol har også en mineralkortikoid effekt, med andre ord mineralkortikoid hypertensjon (20). Dette kan skyldes at kortisol binder seg til mineralkortikoide reseptorer. Dette vil vanligvis hindres av at kortisol omdannes til en metabolitt av enzymet  $11\beta$ -hydroksysteroid dehydrogenase.

En kan få problemer både ved høye samt lave mengder kortisol. Disse kan ofte være symptomer på sykdommer. En person med høyt kortisolnivå kan skyldes Cushing's syndrom. Denne sykdommen skyldes en tumor på hypofysen eller binyren. Symptomer kan ofte være en rask økning i vekt i ansiktsregionen, på magen og på brystet. Andre tegn som kan tyde på høyt kortisolnivå er et rødmalt ansikt, høyt blodtrykk og endringer i huden. Osteoporose og humørsvingninger kan også skyldes Cushing's syndrom.

På den andre enden har man Addison's sykdom. I stedet for at det er sykdommen som forårsaker nivået, er det i dette tilfellet det lavet nivået med kortisol som fører til sykdommen. Dette er en sjelden autoimmun sykdom som fører til skade på binyrene. Symptomene starter sakte men kan være svært seriøse. Eksempler på symptomer kan være at en føler seg sliten, tap av muskelmasse, vekttap, humørsvingninger og endringer i huden.

Ved at man måler aktiviteten av  $\alpha$ -amylase og kortisol i spytt samtidig, kan det bidra til en mer omfattende evaluering av stressresponser (21).

## 2.2 Metoder

EIA står for Enzyme Immuno assay og er en platebasert assayteknikk som er laget for påvisning og kvantifisering av substanser som peptider, antistoff, proteiner og hormoner (22). I EIA-metoden må et antigen bli immobilisert til en fast overflate og sammensatt med et antistoff eller et annet stoff som er bundet til et enzym (23). EIA blir som regel utført i en 96-brønn, hvor prøven blir inkubert, og hver av brønnene inneholder forskjellig prøve. Det er en positiv kontroll prøve og en negativ kontroll prøve som vil være inkludert blant de 96 prøvene som blir testet.

Når man kjører EIA for å finne kortisolaktiviteten pipetteres først standarder eller fortynnete prøver over i en mikrotiterplate, som er dekket med et antistoff for å fange antistoff fra mus. Kortisol-peroxidase konjugat tilsettes brønnene. Bindingsreaksjonen startes ved tilsettelsen av et monoklonalt antistoff til kortisol. Det oppstår en immunologisk reaksjon mellom den begrensende mengden av tilsatt anti-kortisol monoklonalt antistoff, kortisolantigenet i prøven, og den begrensende mengden av tilsatt kortisol-peroxidase konjugat. Økt konsentrasjonen av kortisol i prøven, fører til at mengden av kortisol-peroxidase konjugat bundet minker. Det forårsaker et redusert signal. Signalet blir generert fra kortisol-peroxidase bundet til anti-kortisol antistoff som bindes til geite anti-mus igG belagte plater. Overflødig kortisol-



peroxidase bindes ikke til platene og blir vasket ut av brønnen før man tilsetter substrat. Etter en time inkubasjon blir platen vasket og substratet tilsettes. Substratet reagerer med det bundete kortisol-peroxidase konjugatet. Etter en kort inkubasjon stopper reaksjonen og intensiteten av den genererte fargen blir detektert i en mikrotiter plateleser på 450 nm bølgelengde. Konsentrasjonen av kortisol i prøven kalkuleres, ved å bruke program som er tilgjengelig med de fleste platelesere. Viktig å huske på å korrigere for fortynningen av prøven.

Enzymkinetikk ble brukt for å teste  $\alpha$ -amylaseaktiviteten i prøvene. I kittet er 2-chloro-p-nitrophenol bundet til maltotriose.  $\alpha$ -Amylase vil i denne reaksjonen få substratet til å gi fra seg 2-chloro-p-nitrophenol. Dette kan så måles med et spektrofotometer innstilt til måling ved 405 nm. Det er en direkte proporsjonal økning i absorbansen ut i fra mengden med  $\alpha$ -amylase tilstede i prøven. Det blir brukt 96 brønns mikrotiterplater, samt høy og lav kontroll. Målingen er av enzymaktiviteten og reaksjonshastigheten mellom substratet og enzymet. Målingen skjer ved hjelp av en plateleser (11).

Inter Assay CV og Intra Assay CV er metoder for måling av variabilitetskoeffisienten. De brukes for å få god repeterbarhet eller for å uttrykke presisjon av immunoassay testresultater. Variabilitetskoeffisienten defineres som standardavviket av målinger dividert med gjennomsnittet av målingene. Dersom det er mange prøver som skal testes innenfor inter-assay CV, blir de kjørt på flere analyseplater. Hver av platene kjøres med egne kalibratorer for standardkurven. Spyttkontrollene med kjente konsentrasjoner av analytten (vanligvis en høy eller lav verdi) er også med i hver plate. Inter-analyse CV er et uttrykk for plate til plate reproduserbarhet, hvor middelverdien beregnes ut fra de høye og lave verdiene på hver plate. Graden av avvik i resultatene kan uttrykkes ved å beregne standardavviket for de to resultatene og omdanne det til CV-en. Ved å teste hver prøve med større antall replikater får man statistisk bedre resultater for standardavviket og kalkulering av CV-en (24).

## 3 Kapittel 3 – Materialer og metoder

### 3.1 Innsamling av prøver

Materialet var samlet inn på NTNU i Ålesund i sommeren 2016, for et tidligere forsøk. Alle deltakerne var menn med varierende arbeidserfaring, ettersom alderen på individene gikk fra 24 til 56 år. Innsamlingen var utført av Stephanie Balters og Ann-Kristin Tveten ved bruk av simulator. Prøvene var samlet inn ved bruk av salivette uten sitron, og deretter sendt til laboratoriet. Der ble den sentrifugert i 2 minutter ved 1000x g, for å gi en klar spyttprøve. Slimete materialer eller faste stoffer ble samlet i en spesialutformet tube. Prøvene ble så lagt i fryseren på -80 grader celsius og oppbevart der frem til forsøkene skal utføres.

Ved oppstart gikk vi gjennom resultatene fra det tidligere forsøket som var gjort, og valgte prøvene ut fra dette. Det var utført en kortisolanalyse ved hjelp av EIA, som vi brukte som grunnlag for utvalget. Enkelte av resultatene viste et høyt forventningsstress den første dagen. Derfor valgte vi å se bort fra disse, da de ikke gjenspeilet testene på en god måte. Vi satt da igjen med 5 individer, med relativt normale prøver. Vi valgte derfor prøvene M113 (T1 og T3), M106 (T2 og T3), M107 (T1 og T3), M105 (T1 og T3) og M104 (T1 og T3). Ved M106 ble T2 valgt, da T1 hadde et unormalt høyt resultat mot slutten. Resultatene på kortisol var fra de samme testpersonene som vi brukte på  $\alpha$ -amylase.

Ved innsamlingen av materialet ble det utført tre tester på forskjellige dager, og rekkefølgen for hver av deltakerne var forskjellig. Den ene (T1) av testene var avslappende, hvor jobben går ut på å bare sitte og vente. Den andre testen (T2) var lagt opp som en vanlig arbeidsdag, relativt rolig men med noe å gjøre. Den tredje testen (T3) var lagt opp til å være svært stressende, med krevende oppgaver. Hver test ble delt opp i en 80 minutters periode, hvor det ble tatt prøver hvert 10 minutt. Det ble altså tatt ni prøver, hvor den første prøven var ved T=0. Det var så en 20 minutters periode som bygde opp til selve prøven. Deretter kom prøven med en varighet på 10 minutter. De resterende 50 minuttene skulle så brukes til å roe ned igjen. Vi brukte bare to av taskene for hver person.

### 3.2 Laboratorieforsøk

Platevaskeren som ble brukt var av typen Wellwash™ Microplate Washer fra selskapet Thermofisher (25). Denne platevaskeren var designet til bruk av plater med 96-brønn både i landskap og portrettorientering. Vaskingen skjedde i et 1x8 eller 1x12 format. I tillegg hadde instrumentet mulighet til å innstilles til risting under vaskingen.

Plateleseren som ble brukt var av typen Multiskan GO fra Thermo Scientific (26). Maskinen var en høykvalitets monokromatorbasert UV7VIS spektrofotometer. Den brukes til spektralskanning, end-point og kinetisk måling i absorbanse i 200-1000 nm bølglengdeområdet. Denne lesingen foregikk i passende 96- eller 384-brønn plater med eller uten lokk, i tillegg til varierende typer kyvetter. Maskinen kunne også inkubere opptil 45°C og kunne innstilles til risting.

#### 3.2.1 Prosedyre – $\alpha$ -amylase

Tabell 1 viser innstillingsprosedyren for plateleseren brukt ved kinetikk, for å utføre en kinetisk måling av en kyvette.

Tabell 1. Innstilling av Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer

<b>Bølgelengde</b>	405 nm
<b>Antall lesninger</b>	2
<b>Intervall</b>	01:00 – 03:00
<b>Temperatur</b>	37 °C
<b>Risting</b>	15 sekunder ved hvert minutt

Prøvene ble forberedt ved å tines, vorteksmikses og deretter sentrifugeres i 15 minutter.

Spyttprøvene ble satt på is i tineperioden for at enzymaktiviteten ikke skulle starte.

Reagensene sto i romtemperatur i minimum 1,5 timer og ble mikset før bruk.  $\alpha$ -

Amylasesubstratet ble oppvarmet til 37 grader. Det inneholder 2-kloro-p-nitrophenol, og en måtte derfor jobbe i et avtrekksskap.

Etter ferdig forberedelse av reagensene ble analysen igangsatt. Forslag til oppsett av plate

layout vises i tabell 2. Satt plateleseren til å inkubere ved 37 grader, og til å lese i

sentermålende kinetisk modus ved 1 minutt, og igjen 2 minutter senere. Valgte 405 nm filter

med ingen referansefilter. Varmet opp  $\alpha$ -amylasesubstratet til 37 grader celsius. Spyttprøvene ble fortynnet med  $\alpha$ -amylase fortynningsmiddel. Forberedte en 1:10 fortynning av saliva ved å pipettere 10  $\mu$ l spytt i 90  $\mu$ l  $\alpha$ -amylase fortynningsmiddel og blandet godt. Fortynnet videre ved å pipettere 10  $\mu$ l fortynning i 90  $\mu$ l  $\alpha$ -amylase fortynningsmiddel. (1:10). Endelig fortynning var 1:100. Lagde den ved å pipettere 10  $\mu$ l fra den første fortynningen i 90  $\mu$ l  $\alpha$ -amylase. Tilsatte 8  $\mu$ l av kontroller og utblandete spyttprøver til individuelle brønner. Brukte revers pipettering for å unngå bobler i brønnene. Tilsatte 320  $\mu$ l av det forvarmede 37 grader  $\alpha$ -amylasesubstratet til hver brønn samtidig, ved å bruke en multipipette.

Tabell 2. Viser oppsett av plate-layout brukt til  $\alpha$ -amylasekittet.

	<b><u>M113</u></b>	<b><u>M113</u></b>	<b><u>M106</u></b>	<b><u>M106</u></b>	<b><u>M107</u></b>	<b><u>M107</u></b>	<b><u>M105</u></b>	<b><u>M105</u></b>	<b><u>M104</u></b>	<b><u>M104</u></b>
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>
<b><u>A</u></b>	<u>T1</u>	<u>T3</u>	<u>T2</u>	<u>T3</u>	<u>T1</u>	<u>T3</u>	<u>T1</u>	<u>T3</u>	<u>T1</u>	<u>T3</u>
<b><u>B</u></b>	<u>T1</u>	<u>T3</u>	<u>T2</u>	<u>T3</u>	<u>T1</u>	<u>T3</u>	<u>T1</u>	<u>T3</u>	<u>T1</u>	<u>T3</u>
<b><u>C</u></b>	<u>T1</u>	<u>T3</u>	<u>T2</u>	<u>T3</u>	<u>T1</u>	<u>T3</u>	<u>T1</u>	<u>T3</u>	<u>T1</u>	<u>T3</u>
<b><u>D</u></b>	<u>T1</u>	<u>T3</u>	<u>T2</u>	<u>T3</u>	<u>T1</u>	<u>T3</u>	<u>T1</u>	<u>T3</u>	<u>T1</u>	<u>T3</u>
<b><u>E</u></b>	<u>T1</u>	<u>T3</u>	<u>T2</u>	<u>T3</u>	<u>T1</u>	<u>T3</u>	<u>T1</u>	<u>T3</u>	<u>T1</u>	<u>T3</u>
<b><u>F</u></b>	<u>T1</u>	<u>T3</u>	<u>T2</u>	<u>T3</u>	<u>T1</u>	<u>T3</u>	<u>T1</u>	<u>T3</u>	<u>T1</u>	<u>T3</u>
<b><u>G</u></b>	<u>T1</u>	<u>T3</u>	<u>T2</u>	<u>T3</u>	<u>T1</u>	<u>T3</u>	<u>T1</u>	<u>T3</u>	<u>T1</u>	<u>T3</u>
<b><u>H</u></b>	<u>T1</u>	<u>T3</u>	<u>T2</u>	<u>T3</u>	<u>T1</u>	<u>T3</u>	<u>T1</u>	<u>T3</u>	<u>T1</u>	<u>T3</u>

### 3.2.2 Prosedyre – Kortisol

Spyttprøvene ble forberedt ved å tines på is. Deretter ble de følgende spyttprøver fortynnet 1:2, ved å bruke en del prøve og en del deionisert vann:

M106 T3 - prøve 5 og 6.

M105 T3 - prøve 3, 4, 5 og 6.

M104 T3 - prøve 5 og 6.

Det ble pipettert 50  $\mu$ l deionisert vann i åtte eppendorfrør. 50 mikroliter fra hver av prøvene ble så pipettert over i eppendorfrørene og markert med hvilken prøve de inneholdt. Fra de er forberedt må de brukes innen 2 timer.

Reagensene ble forberedt ved å stå i romtemperatur i omtrent 30 minutter. Assay bufferen klargjordes ved å blande ut konsentratet i 1:5, hvor 1 del var Dilute Assay Buffer Concentrate i 4 deler deionisert vann. Det vil si 200 ml deionisert vann og 50 ml assay buffer. Denne var stabil ved 4 grader celsius i opptil 3 måneder. Wash bufferen ble klargjort ved at Dilute Wash Buffer Concentrate ble blandet ut til en 1:20 blanding hvor 1 del konsentrat og 19 deler deionisert vann. 1,9 l dobbeldeionisert vann og 0,1 l wash buffer. Denne blandingen var stabil ved romtemperatur i 3 måneder. Platevaskeren ble kjørt tre ganger med deionisert vann for å rense den. Deretter ble den kjørt en gang med wash buffer for å gjøre den klar. Det ble så utført en standard forberedelse ved å merke 6 rør #1 til #6. 450 µl av assay bufferen ble pipettert over i rør #1, deretter 250 µl i rør #2 til #6. Pipettespissen ble forhåndsrenset flere ganger i bufferen for å få en nøyaktig levering. 50 µl med kortisol stock solution ble tilsatt rør #1 og ble vortekset fullstendig. Deretter ble det tatt 250 µl fra rør #1 som ble tilsatt i rør #2 som igjen ble vortekset. Denne prosedyren ble repetert helt til rør #6. Konsentrasjonen skulle så være 3200, 1600, 800, 400, 200 og 100 ng/mL med kortisol fra #1-#6.

I tabell 3 vises plateoppsettet som ble brukt for standardisering. Her kan en se hvilke brønner som inneholder hva. NSB ble tilsatt i A1 og A2, standarder ble tilsatt i B1 og 2 til G1 og 2, og B0 ble tilsatt i H1 og 2. Resten av brønnene bestod av de ulike spyttprøvene. 50 µl av standardene og prøvene ble tilsatt i sine planlagte brønner i platen. Det ble så pipettert 75 µl Assay buffer til non-specific binding (NSB) brønnene. 50 µl med Assay buffer ble også tilsatt til maximum binding (B0) brønnene. Deretter ble 25 µl av Detect cortisol conjugat pipettert til hver brønn, etterfulgt av 25 µl Detex Cortisol antibody til hver brønn, utenom NSB brønnene. For å forsikre en tilstrekkelig blanding av reagensene, ble platen forsiktig dunket på siden. For å unngå at prøvene fordampet vekk under inkubering, ble de dekket med en plateforsegler. Platen ble så satt til å inkubere ved risting i romtemperatur i 1 time. Etter 1 time ble platen luftet, og deretter vasket 4 ganger med 300 µl wash buffer på platevaskeren. Platen ble så ristet ren ved å bruke absorberende håndklær, for å fjerne rester av wash buffer. 100 µl TMB substrat ble pipettert til hver brønn og platen ble inkubert ved romtemperatur i 30 minutter uten risting. Deretter ble 50 µl stop solution pipettert til hver av brønnene og absorbansen ble lest av i plateleseren på 430 nm.

Tabell 3. Viser plate-layouten som blir brukt til kortisolkittet.

	<b>M113</b>	<b>M113</b>	<b>M106</b>	<b>M106</b>	<b>M107</b>	<b>M107</b>	<b>M105</b>	<b>M105</b>	<b>M104</b>	<b>M104</b>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>A</b>	T1	T3	T2	T3	T1	T3	T1	T3	T1	T3
<b>B</b>	T1	T3	T2	T3	T1	T3	T1	T3	T1	T3
<b>C</b>	T1	T3	T2	T3	T1	T3	T1	T3	T1	T3
<b>D</b>	T1	T3	T2	T3	T1	T3	T1	T3	T1	T3
<b>E</b>	T1	T3	T2	T3	T1	T3	T1	T3	T1	T3
<b>F</b>	T1	T3	T2	T3	T1	T3	T1	T3	T1	T3
<b>G</b>	T1	T3	T2	T3	T1	T3	T1	T3	T1	T3
<b>H</b>	T1	T3	T2	T3	T1	T3	T1	T3	T1	T3

### 3.2.3 Statistikk og kalkulasjoner

Alle utregninger ble gjort i Excel (Microsoft 2016).

$$\frac{\Delta Abs. / \text{min} * TV * DF}{MMA * SV * LP} = U / \text{mL of } \alpha - \text{Amylase aktivitet i amylase}$$

Formel 1. Viser formel for  $\alpha$ -amylaseaktiviteten.

$$\frac{1.6663 - 0.7334}{2} * 0.328 * \frac{100}{12.9 * 0.008 * 0.97} = 152.8377$$

Formel 2. Viser et eksempel på utregning av  $\alpha$ -amylaseaktiviteten (M113 T1 første prøve).

Tabell 4 viser verdier for relativt avvik som er innenfor godkjent verdi, og er markert med grønn farge. Verdier utenfor godkjent verdi er markert rosa.

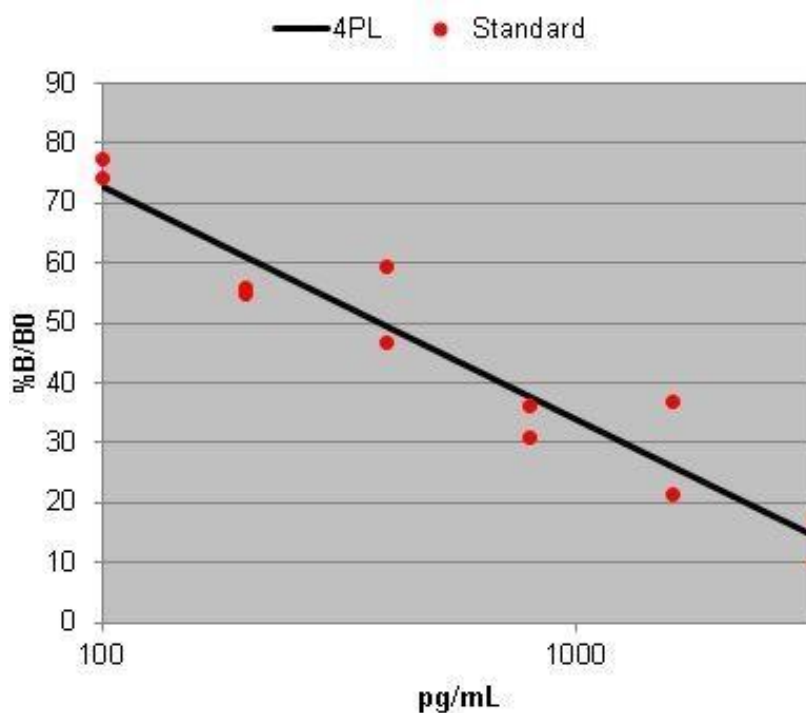
Tabell 4. Nøyaktigheten av reproduserbarheten til plateleseren. Viser utregnede % for relativt avvik.

	M113 T1	M113 T3	M106 T1	M106 T3	M107 T1	M107 T3	M105 T1	M105 T3	M104 T1	M104 T3	B0
0 Min	4300.688	5.761011	3.95242	15.36772	7.032566	10.74808	16.79527	102.1981	106.0367	99.41007	41.41417
10 Min	25.54155	19.69784	13.6654	7.219551	9.012086	8.598984	15.56625	101.2783	101.3942	101.9119	34.44275
20 Min	15.47393	15.75096	10.18414	17.89171	28.97712	4.796611	16.43772	99.4996	100.2537	100.5664	60.99916
30 Min	26.79044	27.01214	5.432591	10.21837	11.67741	8.057603	15.76613	97.71937	97.64836	100.2664	66.01896
40 Min	15.7821	27.85327	88.01368	13.98869	9.727219	6.333801	9.962642	97.9291	99.11764	102.4851	
50 Min	3.12173	65.73676	15.83529	14.30919	9.44428	7.23034	16.50797	97.90578	102.5885	102.3105	
60 Min	30.44038	33.87652	14.9951	10.44214	31.95311	7.216779	31.02989	101.3901	103.0086	102.7736	
70 Min	87.23329	21.39304	4.484714	6.891422	27.38476	11.24485	3.634268	99.299	100.9862	95.69289	

## 4 Kapittel 4 - Resultater

### 4.1 Kortisolresultatene

På figur 3 ser man standardkurven hvor konsentrasjonsverdiene av standardene er de ulike punktene i diagrammet. For å bestemme mengden av kortisol i de ulike spyttprøvene omgjør vi absorbansresultatene til konsentrasjonsverdier ved å bruke myAssays (27).



Figur 3. Standardkurve plottet ut ifra konsentrasjon og absorpsjon. Ng/mL: konsentrasjon. %B/B0: absorpsjon. R: 0,9194: Sier noe om hvor langt punktene er fra den rette linjen. X-aksen er logaritmisk.

Ut fra tabell 5 ser man absorpsjonen regnet om til konsentrasjon. Prøvene markert med F er fortynnet 1:2, da verdiene er høye. Fortynningen består av 1 del prøve og 1 del deionisert vann. Ut ifra disse konsentrasjonsverdiene blir det lagd grafer som viser kortisolaktiviteten i de forskjellige spyttprøvene. Verdiene markert med gult i tabellen er utenfor referanseområdet. Konsentrasjonene som er under referanseområdet blir satt til 100 ng/mL i grafene. Alle grafene fra kortisolresultatene blir satt til 7000 ng/mL på y-aksen fordi det er det høyeste punktet av grafene.

Tabell 5. Absorpsjonen av kortisolresultatene regnet om til konsentrasjon.

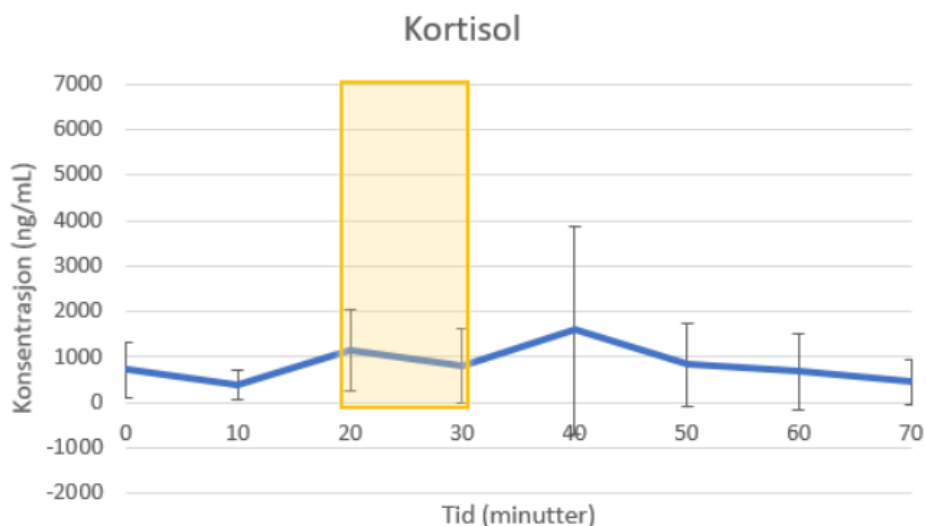
\* = T2, og ikke T1. Fordi T1 for denne deltakeren var unøyaktig, valgte vi derfor T2.



	Task 1		Task 3		
	Abs.	Kons.	Abs.	Kons.	
<b>Person 1 - M113</b>	Prøve 1:	99 %B/B0	29.84 ng/mL	Prøve 1: 35,4%B/B0	908,1 ng/mL
	Prøve 2:	111 %B/B0	10.14 ng/mL	Prøve 2: 74,8%B/B0	88,01 ng/mL
	Prøve 3:	44,9 %B/B0	515,8 ng/mL	Prøve 3: 47,2%B/B0	450,4 ng/mL
	Prøve 4:	113 %B/B0	9,193 ng/mL	Prøve 4: 106 %B/B0	13,85 ng/mL
	Prøve 5:	56,1 %B/B0	265,9 ng/mL	Prøve 5: 110 %B/B0	10,64 ng/mL
	Prøve 6:	143,8 %B/B0	66,5 ng/mL	Prøve 6: 86,2%B/B0	44,75 ng/mL
	Prøve 7:	115 %B/B0	8,143 ng/mL	Prøve 7: 79,1%B/B0	68,31 ng/mL
	Prøve 8:	94,2 %B/B0	27,81 ng/mL	Prøve 8: 75,6%B/B0	83,74 ng/mL
<b>Person 2 - M106</b>	Prøve 1*:	32 %B/B0	1108 ng/mL	Prøve 1: 21,7 %B/B0	2051 ng/mL
	Prøve 2*:	50 %B/B0	381,2 ng/mL	Prøve 2: 33 %B/B0	1047 ng/mL
	Prøve 3*:	25,6 %B/B0	1628 ng/mL	Prøve 3: 19,8 %B/B0	2297 ng/mL
	Prøve 4*:	30 %B/B0	1246 ng/mL	Prøve 4: 33,5%B/B0	1013 ng/mL
	Prøve 5*:	93,7 %B/B0	28,51 ng/mL	Prøve 5 (F): 22,1%B/B0	3987 ng/mL
	Prøve 6*:	54 %B/B0	302 ng/mL	Prøve 6 (F): 48,4%B/B0	837,6 ng/mL
	Prøve 7*:	57,4 %B/B0	246,9 ng/mL	Prøve 7: 35,5%B/B0	902,1 ng/mL
	Prøve 8*:	33,5 %B/B0	1013 ng/mL	Prøve 8: 28,5 %B/B0	1370 ng/mL
<b>Person 3 - M107</b>	Prøve 1:	63,7 %B/B0	169,4 ng/mL	Prøve 1: 39,6 %B/B0	708,5 ng/mL
	Prøve 2:	62,5 %B/B0	182,2 ng/mL	Prøve 2: 37,7 %B/B0	790,2 ng/mL
	Prøve 3:	77,6 %B/B0	74,58 ng/mL	Prøve 3: 31,3 %B/B0	2309 ng/mL
	Prøve 4:	37,4 %B/B0	803,4 ng/mL	Prøve 4: 33,9 %B/B0	1983 ng/mL
	Prøve 5:	39,8 %B/B0	699,2 ng/mL	Prøve 5: 31,5 %B/B0	2283 ng/mL
	Prøve 6:	61,3 %B/B0	195,3 ng/mL	Prøve 6: 32,2 %B/B0	2194 ng/mL
	Prøve 7:	77,5 %B/B0	74,95 ng/mL	Prøve 7: 38,1 %B/B0	774,7 ng/mL
	Prøve 8:	77,3 %B/B0	75,95 ng/mL	Prøve 8: 39,3 %B/B0	719,1 ng/mL

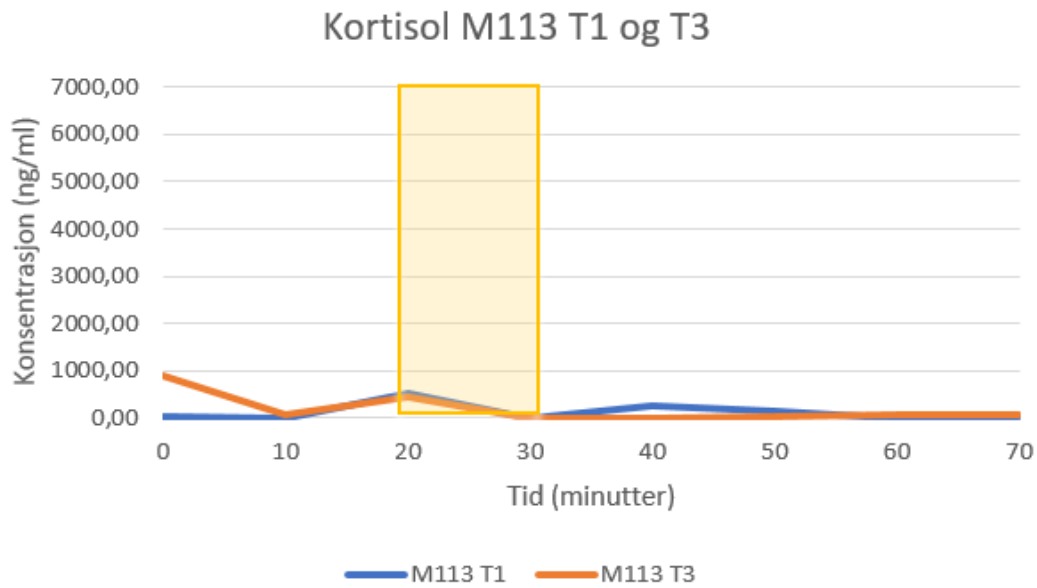
<b>Person 4 - M105</b>	Prøve 1: 57 %B/B0	252,2 ng/mL	Prøve 1:36 %B/B0	874,2 ng/mL
	Prøve 2: 52,2 %B/B0	336,2 ng/mL	Prøve 2: 49,2 %B/B0	401,2 ng/mL
	Prøve 3: 48,7 %B/B0	413,3 ng/mL	Prøve 3 (F): 19,6 %B/B0	2323 ng/mL
	Prøve 4: 44,2 %B/B0	538,4 ng/mL	Prøve 4 (F): 19,9 %B/B0	2274 ng/mL
	Prøve 5: 61,4 %B/B0	194,6 ng/mL	Prøve 5 (F): 33,5 %B/B0	1018 ng/mL
	Prøve 6: 51,8 %B/B0	342,4 ng/mL	Prøve 6 (F): 21,5 %B/B0	2075 ng/mL
	Prøve 7: 78,5 %B/B0	70,73 ng/mL	Prøve 7: 29,1 %B/B0	1316 ng/mL
	Prøve 8: 67,1 %B/B0	138,7 ng/mL	Prøve 8: 36,5 %B/B0	849,9 ng/mL
<b>Person 5 - M104</b>	Prøve 1: 60,6 %B/B0	203,5 ng/mL	Prøve 1: 34,3 %B/B0	967,1 ng/mL
	Prøve 2: 66,3 %B/B0	146 ng/mL	Prøve 2: 45,3 %B/B0	505,6 ng/mL
	Prøve 3: 43,2 %B/B0	571,4 ng/mL	Prøve 3: 34,5 %B/B0	955,9 ng/mL
	Prøve 4: 64,9 %B/B0	158,6 ng/mL	Prøve 4:71,1%B/B0	109,7 ng/mL
	Prøve 5: 48,5 %B/B0	416,7 ng/mL	Prøve 5:12,6 %B/B0	7050 ng/mL
	Prøve 6: 69,4 %B/B0	121,1 ng/mL	Prøve 6: 33 %B/B0	2094 ng/mL
	Prøve 7: 39 %B/B0	733,5 ng/mL	Prøve 7: 17,1 %B/B0	2699 ng/mL
	Prøve 8: 84,8 %B/B0	48,46 ng/mL	Prøve 8: 62,8%B/B0	178,9 ng/mL

Ut fra figur 4 vises de gjennomsnittlige kortisolresultatene. Gjennomsnittet starter rundt 726 ( $\pm 607$ ) ng/mL og beveger seg nedover mot 389 ( $\pm 324$ ) ng/mL. Standardavviket både ved start og 10 minutter er relativt lite. Herfra begynner den å stige mot en liten topp på rundt 1154 ( $\pm 896$ ) ng/mL ved 20 minutter før den synker ned mot 815 ( $\pm 817$ ) ng/mL ved 30 minutter. Standardavviket ved både 20 minutter og 30 minutter er relativt lite. Herfra stiger den opp mot toppunktet ved 40 minutter på omtrent 1595 ( $\pm 2289$ ) ng/mL. Fra 40 minutter og utover avtar verdien med 835 ( $\pm 914$ ) ng/mL ved 50 minutter, 689 ( $\pm 836$ ) ng/mL ved 60 minutter og 451 ( $\pm 492$ ) ng/mL ved 70 minutter.



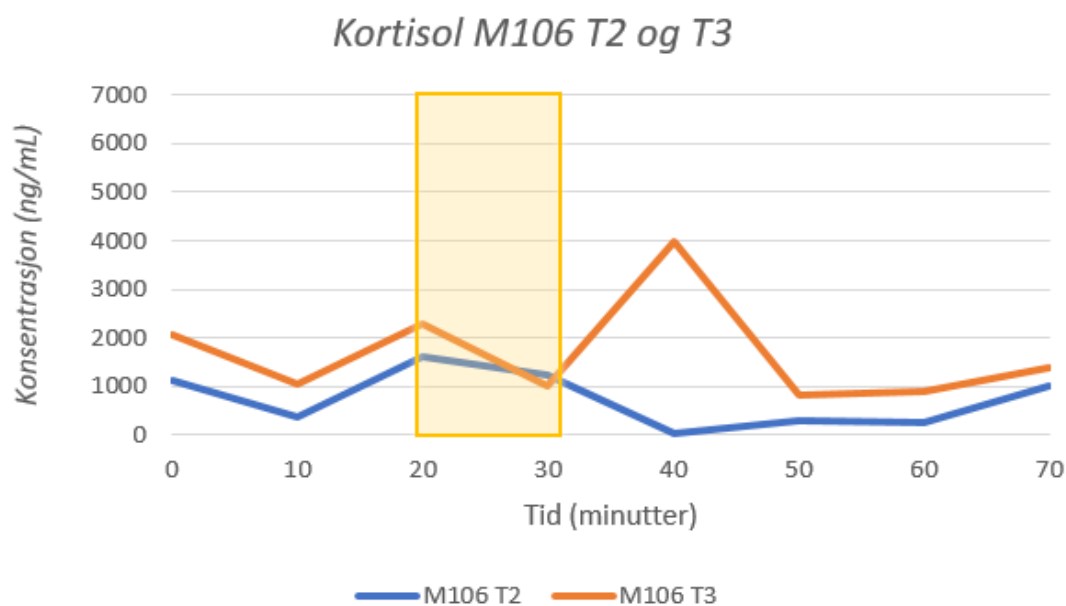
Figur 4. Viser gjennomsnittet av kortisolresultatene. ( $n=5$ ). Gjennomsnitt  $\pm$  Standardavvik. Tid (minutt).

I figur 5 T1 (blå) vises en økende stresskurve fra 10 minutter fram til aktivitetssonen på 20 minutter. Grafen har der en toppkonsentrasjon på cirka 500 ng/mL. Det vil si at personen har mye kortisol i spyttet, og er tydelig stresset. Grafen viser en synkende kurve i aktivitetssonen. Etter den avslappende aktiviteten øker kurven til en ny topp ved 40 minutter, hvor konsentrasjonen er på cirka 275 ng/mL. Fra start og fram til 10 minutter har T3 (rød) en synkende kurve. Toppkonsentrasjonen er på cirka 425 ng/mL ved 20 minutter. Deretter synker grafen mot 100 ng/mL ved 30 minutter, og holder seg der til 40 minutter. Den øker så jevnt mot slutten.



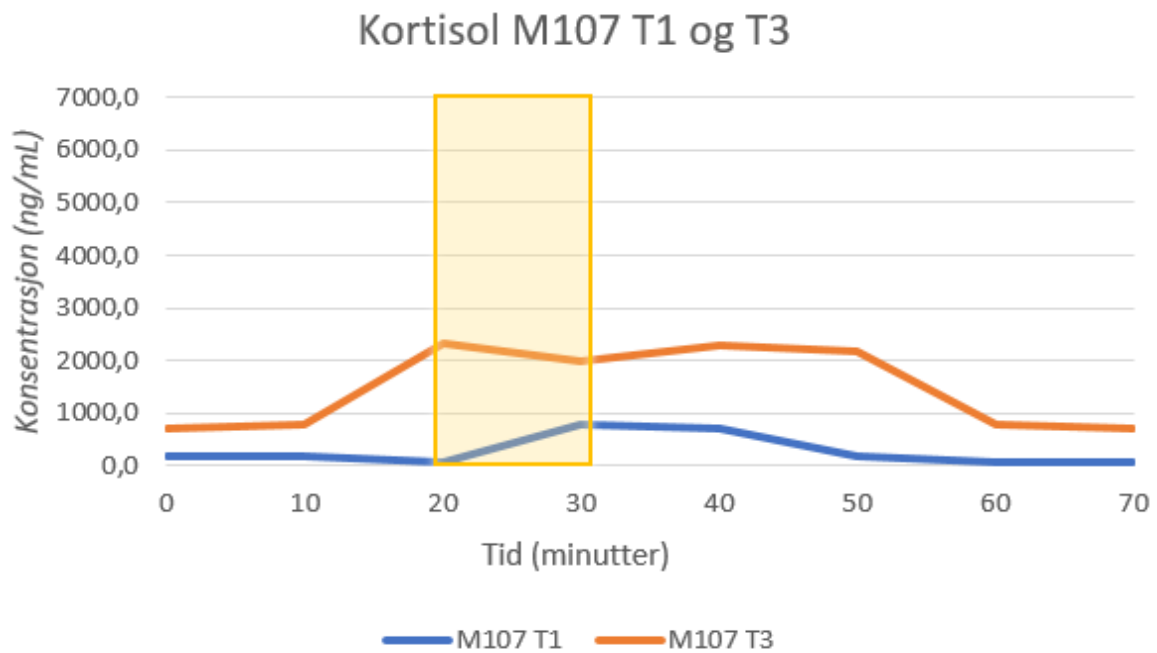
*Figur 5. Viser kortisolresultatene for M113 T1 og T3. Aktivitetssonen er fra 20-30 minutter. T1 viser dag 2 for utførelse av stresstesten og aktiviteten er avslappende. T3 viser dag 1 for utførelse av stresstesten og aktiviteten er stressende. Tid (minutt).*

Ut i fra figur 6 viser T2 (blå) en toppkonsentrasjon ved 20 minutter på cirka 1750 ng/mL, som avtar i aktivitetssonen. T2 blir valgt i stedet for T1 da testpersonen sovner under oppgaven, noe som gir en høy konsentrasjon som følge av oppvåkningen. T3 (rød) viser en konsentrasjonstopp ved 20 minutter og 40 minutter. Deretter synker den raskt og holder seg lavt. Toppen rundt 40 minutter stemmer bra ut i fra stress fra oppgaven.



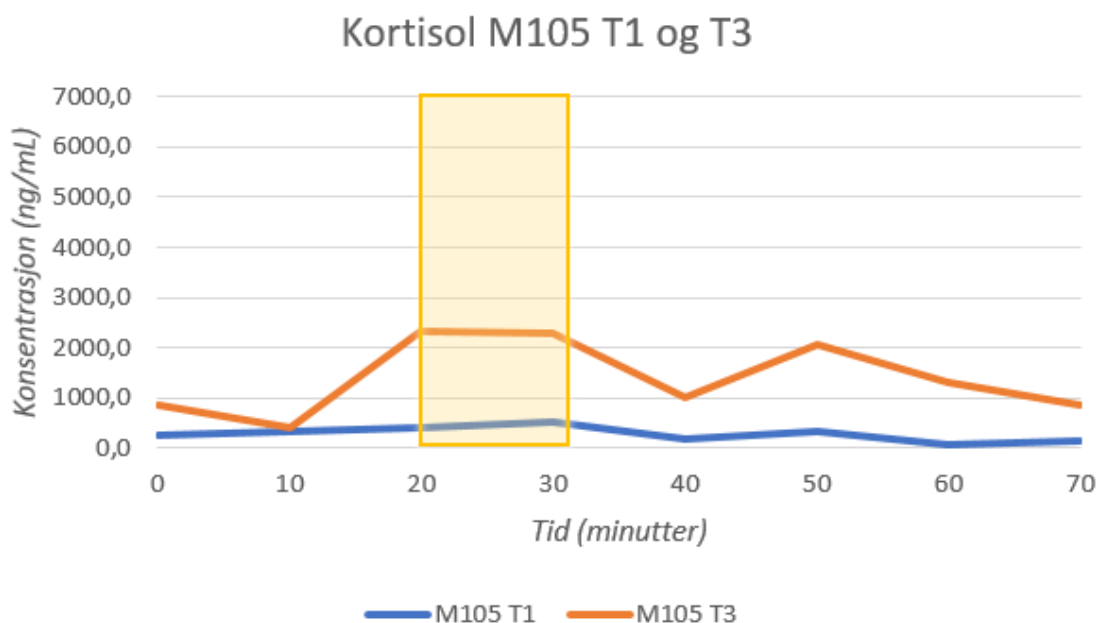
*Figur 6. Viser kortisolresultatene for M106 T2 og T3. T2 viser dag 1 for utførelsen av stresstesten, og aktiviteten er som en normal arbeidsdag. T3 viser dag 2, og aktiviteten er stressende. Tid (minutt).*

Figur 7 viser at T3 (rød) har en toppkonsentrasjon på 2300 ng/ml etter 20 minutter. Det vil si at personen er svært stresset og har en del kortisol i spyttet. Individet er noe stresset da han ankommer lokalet. Grafen holder seg rundt denne konsentrasjonen frem mot 50 minutter, før den avtar. T1 (blå) viser at individet er lite stresset da han ankommer lokalet, men blir noe stresset etter at oppgaven blir utdelt. T1 har en toppkonsentrasjon på 700 ng/ml ved 30 minutter, noe som er mye mindre enn T3. Etter at oppgaven er utført ved 30 minutter, synker konsentrasjon ned mot 100 ng/mL.



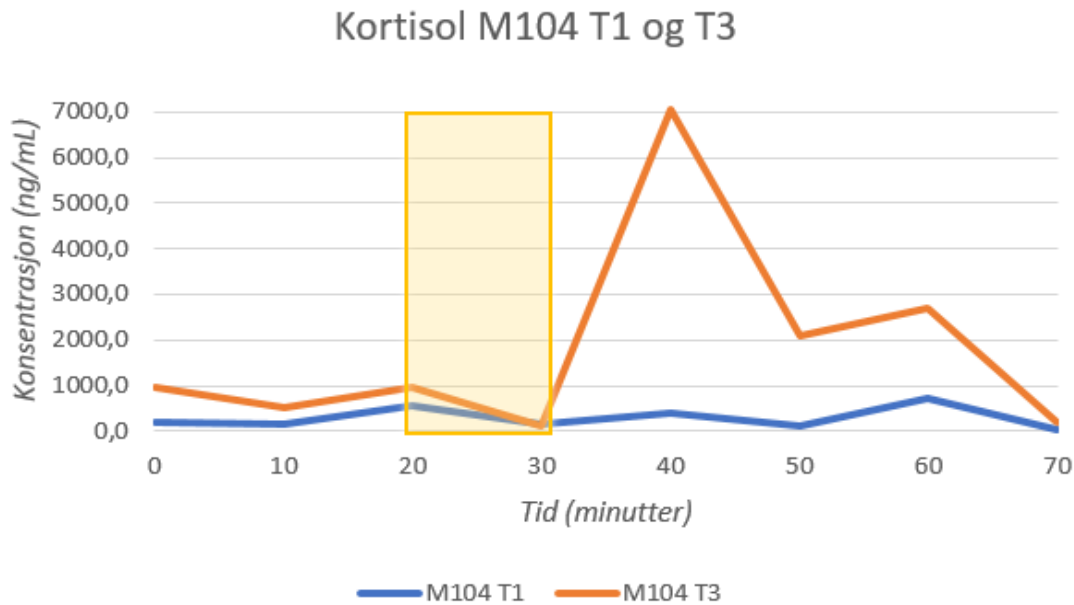
*Figur 7. Viser kortisolresultatene for M107 T1 og T3. T1 viser dag 2 for utførelsen av stresstesten, og aktiviteten er avslappende. T3 viser dag 3, og aktiviteten er stressende. Tid (minutt).*

Mot 30 minutter viser T1 (blå) i figur 8 en jevnt økende graf. Toppkonsentrasjonen er på 500 ng/ml ved 30 minutter, og avtar deretter mot 70 minutter. T3 (rød) har to merkbare topper. Den første ved 20 minutter til 30 minutter og den andre ved 50 minutter. Det er en bratt økning fra 10 minutter til 20 minutter. Grafen holder seg ganske stabil på samme konsentrasjon i aktivitetssonen. Deretter avtar den til cirka 1000 ng/mL ved 40 minutter. Herfra øker den til cirka 2000 ng/mL ved 50 minutter. Den synker så igjen mot 70 ng/mL.



*Figur 8. Viser kortisolresultatene for M105 T1 og T3. T1 viser dag 2 for utførelsen av stresstesten, og aktiviteten er avslappende. T3 viser dag 3, og aktiviteten er stressende. Tid (minutt).*

Ut fra figur 9 kan en se at T3 (rød) holder seg rolig fram til en liten topp ved 20 minutter. Det er først ved 40 minutter individet har en merkbar topp, hvor konsentrasjonen er på 7000 ng/mL. Fra 40 minutter synker den relativt raskt ned mot 50 minutter, før den stiger svakt igjen mot 60 minutter og avtar raskt ned mot 70 minutter. Task 1 (blå) holder seg rolig og har ingen spesielt merkbare topper. Det er en liten topp ved 20 minutter, ellers små endringer før 60 minutter hvor det igjen er en liten topp som avtar mot 70 minutter.

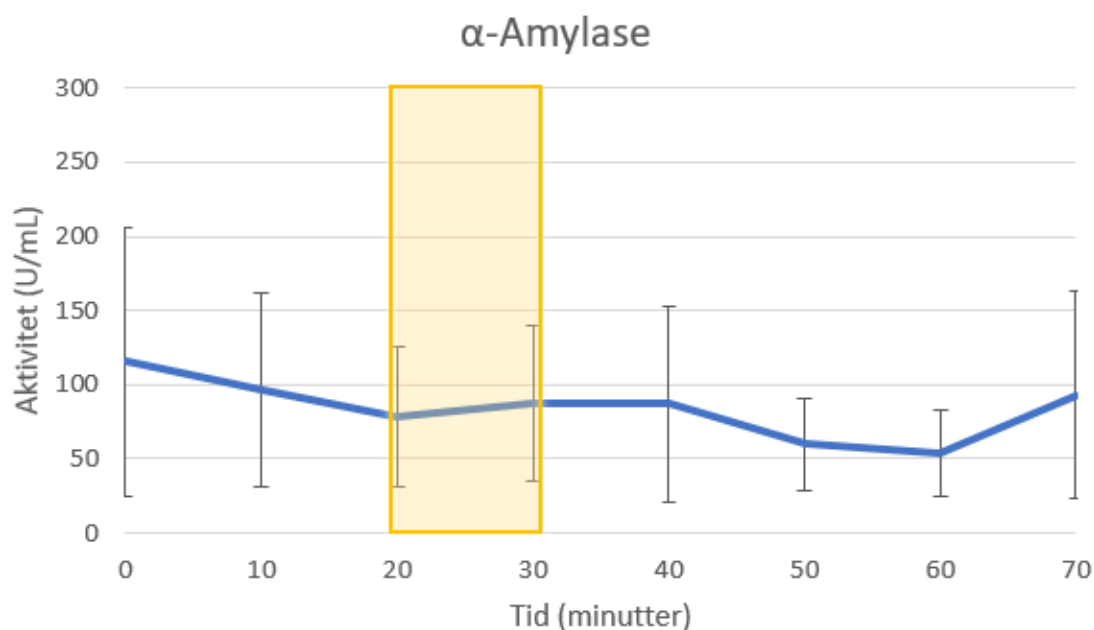


Figur 9. Viser kortisolresultatene for M104 T1 og T3. T1 viser dag 1 for utførelsen av stresstesten, og aktiviteten er avslappende. T3 viser dag 3, og aktiviteten er stressende. Tid (minutt).

#### 4.2 $\alpha$ -amylaseresultater

Figur 10 viser gjennomsnittet av  $\alpha$ -amylaseresultatene. Gjennomsnittet starter rundt 115 ( $\pm 91$ ) U/mL (Units/mL) som er det høyeste punktet i grafen og synker gradvis nedover mot 97 ( $\pm 65$ ) U/mL. Standardavviket til  $\alpha$ -amylase ved både start og 10 minutter er relativt store, men starten har størst standardavvik. Den fortsetter å synke ned mot 78 ( $\pm 47$ ) U/mL ved 20 minutter, før den begynner å stige mot en liten topp på 88 ( $\pm 53$ ) U/mL ved 30 minutter. Den holder seg så stabil mot 40 minutter, med verdi på 87 ( $\pm 66$ ) U/mL. Fra 40 minutter og utover avtar verdien med 60 ( $\pm 31$ ) U/mL ved 50 minutter, 54 ( $\pm 29$ ) U/mL ved 60 minutter og øker på slutten hvor verdien er 93 ( $\pm 70$ ) U/mL ved 70 minutter.





Figur 10. Viser gjennomsnittet av  $\alpha$ -amylaseresultatene. ( $n=5$ ). Gjennomsnitt  $\pm$  Standardavvik. Tid (minutt). U = Units.

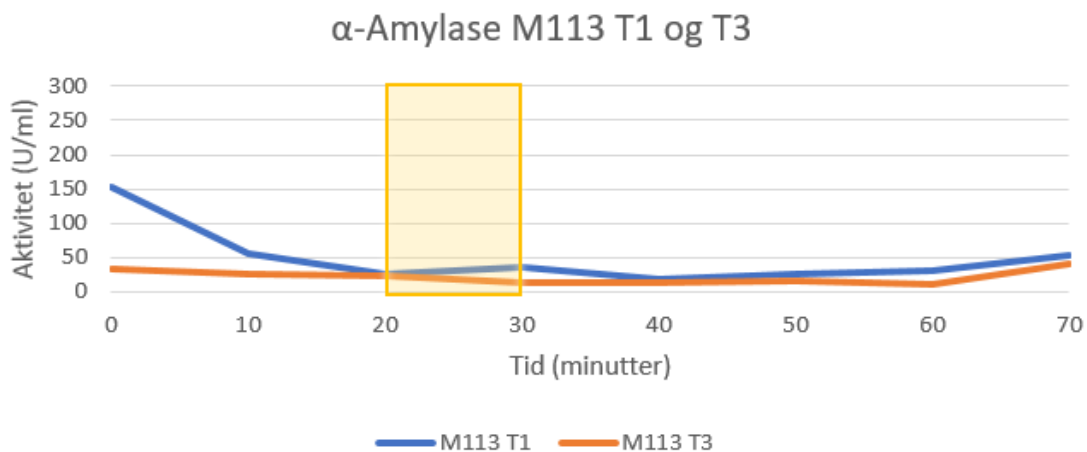
På tabell 6 ser man resultater kontrollert med høye og lave kontroller. Ruter markert med rosa er verdier som er utenfor referanseområdet satt av gjennomsnittet til de høye og de lave kontrollene (se figur 29, vedlegg). Det er ingen verdier som er under de lave kontrollene.

Tabell 6. Viser resultater kontrollert med høye og lave kontroller.

Prøve	M113 T1	M113 T3	M107 T1	M107 T3	M106 T2	M106 T3	M105 T1	M105 T3	M104 T1	M104 T3
0 Min	152.83	32.68	211.42	292.19	19.39	69.13	189.94	69.29	50.06	66.71
10 Min	56.12	25.11	246.23	116.43	39.71	30.91	101.77	121.9	110.14	117.92
20 Min	24.82	22.78	119.59	117.36	27.67	64.56	49.41	104.57	158.48	93.28
30 Min	35.33	12.95	63.17	131.36	38.22	96.31	135.29	104.8	77.26	181.96
40 Min	18.26	13.23	90.94	61.92	26.34	68.87	124.8	154.78	86.64	223.18
50 Min	24.85	17.03	75.09	82.11	38.82	28.94	77.01	98.31	51.39	102.74
60 Min	30.21	11.18	100.11	46.66	27.21	40.18	60.55	83.15	47.9	90.74
70 Min	52.16	41.39	271.72	96.13	44.16	92.36	43.43	110.43	52.08	126.78

Figur 11 viser  $\alpha$ -amylase aktiviteten i M113 T1 og T3. T1 (Blå) starter relativt høyt rundt 150 U/mL og avtar ned mot 20 minutter. Deretter øker den litt i aktivitetssonen, for så å avta mot 40 minutter. Den øker så jevnt mot 60 minutter, og har en liten økning mot slutten. T3 (Rød) starter relativt lavt i forhold til T1 og holder seg på dette nivået ut hele, med unntak av en liten

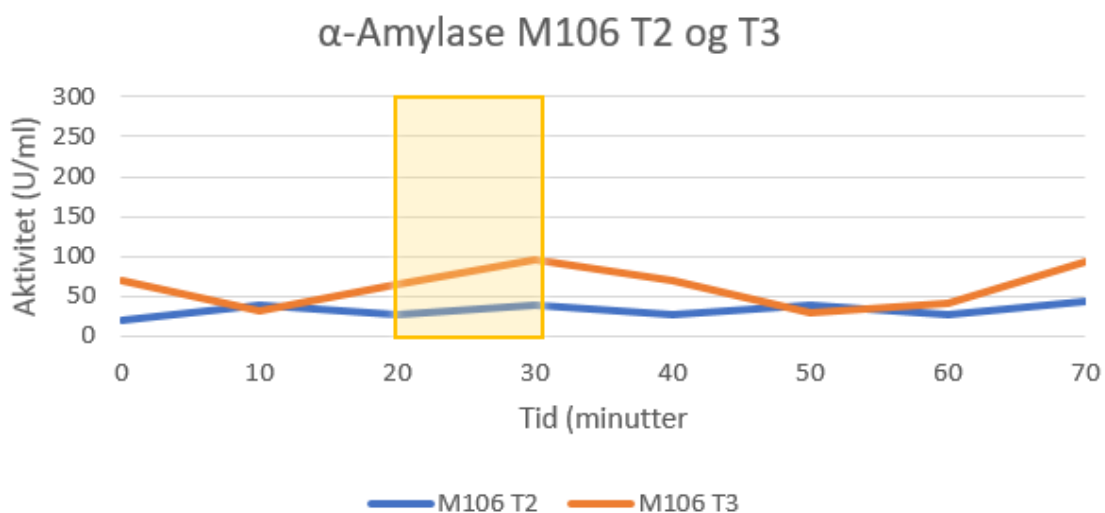
økning ved 70 minutter.



Figur 11. α-amylase aktivitet. Tid (minutt). Aktivitet (U/mL). U = Units.

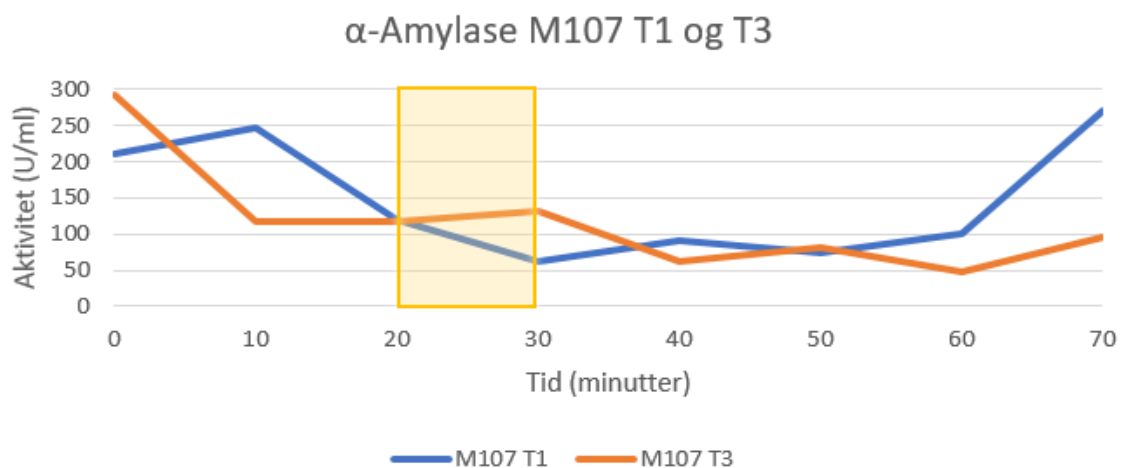
Aktivitetssonen er fra 20-30 minutter. T1 viser dag 2 for utførelse av stresstesten og aktiviteten er avslappende. T3 viser dag 1 for utførelse av stresstesten og aktiviteten er stressende.

Fra starten av T3 (rød) i figur 12 kan en se en synkende α-amylasekonsentrasjon. Deretter øker den jevnt fra 10 minutter mot 30 minutter, hvor det er en konsentrasjonstopp på cirka 98 U/mL. Videre synker konsentrasjonen ned mot 50 minutter, hvor konsentrasjonen ligger på cirka 30 U/mL. Grafen øker så mot slutten. T2 (blå) viser tre konsentrasjonstopper på 10, 30 og 50 minutter, men holder seg relativt lavt igjennom hele tidsperioden. Konsentrasjonen øker svakt i aktivitetssonen.



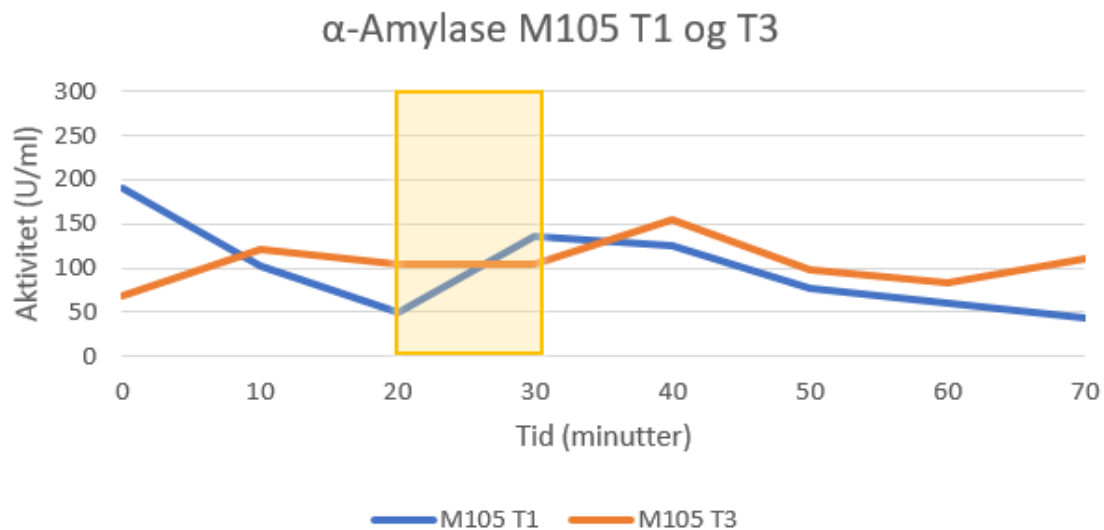
Figur 12. α-amylase aktivitet. Tid (minutt). Aktivitet (U/mL). U = Units. Aktivitetssonen er fra 20-30 minutter. T2 viser dag 1 for utførelsen av stresstesten, og aktiviteten er som en normal arbeidsdag. T3 viser dag 2, og aktiviteten er stressende.

I figur 13 viser T1 (blå) en høy konsentrasjon i starten på cirka 210 U/mL. Deretter øker den videre til en toppkonsentrasjon på 250 U/mL ved 10 minutter. Videre synker grafen mot 30 minutter. Den holder seg relativt lavt fra rundt 30 minutter til 60 minutter, før den så øker kraftig. T3 (rød) starter med en høy konsentrasjon på cirka 290 U/mL, som synker ned mot 10 minutter. Deretter holder den seg ganske jevnt bortover med en svak økning fra 20 til 30 minutter. Herfra synker den ned mot 40 minutter, før den stiger svakt mot 50 minutter og ned mot 60 minutter. Det er så en svak økning igjen fra 60 til 70 minutter.



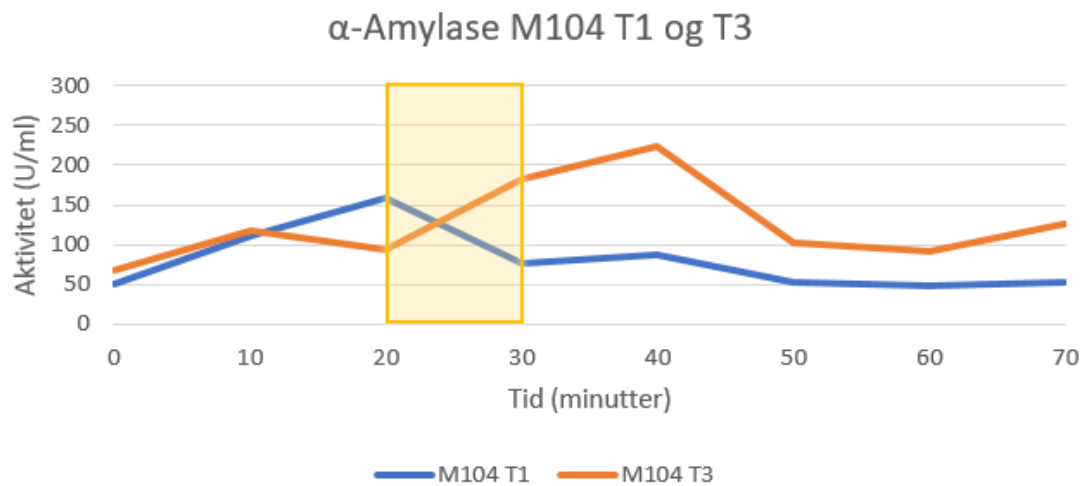
Figur 13.  $\alpha$ -Amylase aktivitet. Tid (minutt). Aktivitet (U/mL). U = Units. Aktivitetssonen er fra 20-30 minutter. T1 viser dag 2 for utførelsen av stresstesten, og aktiviteten er avslappende. T3 viser dag 3, og aktiviteten er stressende.

Fra starten av T1 (blå) i figur 14 er det en høy konsentrasjon rundt 190 U/mL, men synker gradvis ned til lav konsentrasjon innen 20 minutter. Deretter starter konsentrasjonen å øke gjennom aktivitetssonen, og holder seg der stabilt til 40 minutter før den avtar sakte. T3 (rød) starter med en lav konsentrasjon, men øker gradvis opp til cirka 130 U/mL ved 10 minutter, og deretter synker den svakt fra 10 minutter til 30 minutter. Mellom 30 og 40 minutter øker grafen til cirka 150 U/mL, men synker gradvis nedover igjen til U/mL ved 60 minutter, før den stiger litt opp igjen på mot 70 minutter.



Figur 14. α-Amylase aktivitet. Tid (minutt). Aktivitet (U/mL). U = Units. Aktivitetssonen er fra 20-30 minutter. T1 viser dag 2 for utførelsen av stresstesten, og aktiviteten er avslappende. T3 viser dag 3, og aktiviteten er stressende.

Ut fra T1 (blå) i figur 15 kan en se en økning fra start frem til en merkbar topp ved 20 minutter, hvor α-amylaseaktiviteten er på cirka 160 U/mL. Deretter synker den ned mot 30 minutter i aktivitetssonen til en verdi rundt 80 U/mL, og igjen svakt opp mot minutt 40. Fra her går den slakt ut til 70 minutt. T3 (rød) viser en topp ved 10 minutter på cirka 125 U/mL, før den synker svakt ned mot 20 minutter. Fra 20 minutter stiger den så opp til 30 minutter og videre mot 40 minutter, og når en topp på cirka 220 U/mL. Deretter synker grafen brått til omtrent 100 U/mL ved 50 minutter og øker litt mot slutten.



*Figur 15. α-Amylase aktivitet. Tid (minutt). Aktivitet (U/mL). U = Units. Aktivitetssonen er fra 20-30 minutter. T1 viser dag 1 for utførelsen av stresstesten, og aktiviteten er avslappende. T3 viser dag 3, og aktiviteten er stressende.*

## 5 Kapittel 5 - Diskusjon

De ulike testene blir som sagt tatt på forskjellige dager med ulike aktivitetsnivå. T1 er avslappende aktivitet, T2 er vanlig arbeidsdag og T3 er stressende aktivitet. Dagene er tilfeldig oppsatt. Aktivitetssonen er i perioden mellom 20 –30 minutter. Vi lager en standardkurve,  $r^2 = 0,9194$  og anser den som god nok.

### 5.1 Kortisolresultater

Ut fra figur 4 vises gjennomsnittlig resultat av kortisol. Kortisol har en forsinket virkning i spyttet, som kan være et opptil 5 minutter i forskjell fra  $\alpha$ -amylase. Utskillelsen av kortisol tar lenger tid, da den styres av hypotalamus som sender beskjed til hypofyseforlappen om å danne ACTH. Deretter slippes kortisol ut i blodet. Fra det har skjedd en økning i blodet vil det ta opptil fem minutter før det er en omtrent likevekt i spyttet (19). Derimot produseres  $\alpha$ -amylase i spyttkjertelene og kan oppdages relativt raskt i spyttet.

Med dette tatt i betraktning vil resultatene i figur 5 være forskjøvet litt mot høyre. Resultatet vil da vise en svakt økende kurve ved ankomst frem til 10 minutter, som kan skyldes stress i forbindelse med forventningene. I de 10 neste minuttene uttrykkes mindre stress hos deltakerne. I aktivitetssonen vises en økende- og ikke en synkende kurve, som det derimot vil være dersom forskyvningene ikke regnes med. Dette betyr at deltakerne i gjennomsnitt har økt stress i denne perioden, muligens grunnet store utfordringer i forhold til aktivitetene. Det reduserte stresset etter aktivitetssonen kan skyldes at deltakerne slapper av etter den stressende aktiviteten.

Dersom forskyvningene i kortisolresultatene ikke blir tatt i betraktning vil tolkningen av resultatene i figur 4 endres.

Den synkende grafen fra start frem til 10 minutter kan ha noe å gjøre med stress i forhold til å komme seg til lokalet. Etter ankomst slapper deltakerne mer av, derav den synkende kurven. Konsentrasjonen øker fra 10 til 20 minutter, som kan være på grunn av spente forventninger til de stressende aktivitetene. Den synkende grafen i aktivitetssonen kan skyldes liten stresspåvirkning på deltakerne fra de ulike aktivitetene. Tyder på at deltakerne takler de stressende aktivitetene bra, og ikke lar seg stresse lett. Økningen mellom 30 – 40 minutter kan

bety at deltakerne bygget opp forventninger til hva mer som skulle skje. Mest sannsynlig skyldes det den forsinkede virkningen av stress fra aktivitetssonen. Kortisolkonsentrasjonen synker jevnt fra 40 minutter og utover, som muligens er fordi aktiviteten er over, og dermed slapper deltakerne mer av. En tolkning av grafene til hver enkelt deltaker vil gi en mer detaljert forståelse av deltakernes stressnivå.

M113 T1 (blå) i figur 5 er dag to for spyttinnsamlingen og aktiviteten er avslappende. Den økende kortisolkonsentrasjonen fra 10 - 20 minutter skyldes muligens en nervøsitet forbundet til forventninger for hva som skal skje i aktivitetssonen. En kan se at konsentrasjonen faller til 100 ng/mL i aktivitetssonen, som kan ha noe å gjøre med at det var en avslappende aktivitet. Personen slapper dermed mer av, og stressnivået avtar.

M113 T3 (rød) er dag 1 for spyttinnsamlingen og aktiviteten er stressende. Figuren viser ved start et raskt fall i kortisolkonsentrasjon. Den høye startkonsentrasjonen kan være i forbindelse med at det var den første dagen i forsøket. Etter 10 minutter øker konsentrasjonen igjen, som viser at forventningene for aktivitetssonen bygger seg opp. Deltakeren ser ut til å takle den stressende aktiviteten bra, i og med at det er et fall i konsentrasjonen.

M106 T2 (blå) i figur 6 viser at deltakeren er litt stresset ved den første prøven. Dette er mest sannsynlig i forbindelse med at det er den første dagen for prøveinnsamling, og deltakeren er spent på hva som skal skje. Etter 10 minutter øker kortisolkonsentrasjonen som igjen skyldes forventninger til aktivitetssonen. Under aktiviteten som er en normal arbeidsdag, er det et lite fall i konsentrasjonen. Dette skyldes mest sannsynlig en relativt rolig test og at personen taklet arbeidsoppgaven godt. Etter aktivitetssonen synker konsentrasjonen videre, som kan skyldes at personen føler seg avslappet grunnet ferdig utførelse av testen.

M106 T3 (rød) i figur 6 viser at deltakeren er stresset i starten og 10 minutter før aktivitetssonen. Aktiviteten er stressende, men ser ut til at deltakeren takler utfordringen ganske bra. Etter aktiviteten er det en raskt økende konsentrasjon til 4000 ng/mL. Dette kan være en kombinasjon av en stressøkning, og at substratet fikk virke lenger enn det skulle, som gir en unormalt stor topp.

M107 T1 (blå) i figur 7 har en økende kurve under den avslappende aktiviteten. Deltakeren er mer stresset enn forventet, da det er en rolig test. Den forsinkede virkningen av kortisol kan ha en viss grad av påvirkning på dette. Denne grafen viser hvordan et ønsket resultat for en

ideell stressmåling ville sett ut. Dette skyldes at det er en klar økning i den stressende aktiviteten.

M107 T3 (rød) i figur 7 har en raskt økende konsentrasjon 10 minutter før aktivitetssonen begynner. Deltakeren har muligens en anelse for at denne dagen skal være den stressende aktiviteten, siden det er dag 3. Som mange av de andre deltakerne bygger han seg opp forventninger for hva som skal skje, og dermed øker kortisolkonsentrasjonen.

Konsentrasjonen faller litt under den stressende aktiviteten, men konsentrasjonen er fortsatt høy. Dette kan skyldes at aktiviteten ikke er så stressende som deltakeren skulle tro, og viser at han taklet utfordringen ganske bra.

M105 T1 (blå) i figur 8 har en jevnt svak økende konsentrasjon under den avslappende aktiviteten. Ved denne testen holder kortisolkonsentrasjonen seg relativt lavt gjennom hele perioden, men kun med noen små økninger og reduseringer. Dette skyldes mest sannsynlig at deltakeren følte seg avslappet grunnet den rolige aktiviteten.

M105 T3 (rød) i figur 8 viser en kraftig konsentrasjonsøkning 10 minutter før den stressende aktiviteten. Dette kan muligens skyldes at deltakeren har en anelse om den stressende aktiviteten, siden det er dag 3 og personen allerede har hatt de to første aktivitetene (avslappende og normal). Under aktiviteten faller kurven litt, som kan skyldes at deltakeren takler utfordringen bra. Etter aktiviteten slapper deltakeren betydelig mer av, og kurven synker.

M104 T1 (blå) i figur 9 viser lite tegn til stress. Det er en svak økning rett før aktiviteten starter, i perioden 10-20 minutter. Dette kan skyldes stress i forhold til forventninger til aktiviteten. Grafen synker så ned mot 30 minutter. Dette kan være fordi deltakeren slappet av, grunnet at aktiviteten var avslappende. Det kommer derimot en økning fra 50-60 minutter. Dette kan skyldes stress som følge av venting.

M104 T3 (rød) i figur 9 viser en kraftig økning i kortisolkonsentrasjonen rett etter den stressende aktiviteten er ferdig. Dette kan skyldes en forsinket reaksjon. Altså at personen blir tydelig stresset under aktiviteten, og slapper av når den er ferdig. Den kraftige reaksjonen kan skyldes en kombinasjon av stress hos personen, eller at platevaskeren ikke fungerte som den skulle, som resulterer i en forstørring av den realistiske verdien.



Kortisolresultatene ble ikke helt som forventet, noe som skyldes ulike årsaker.

Kortisolforsøket ble utført to ganger. Det er derfor mulig at prøvene ble tint for lenge (under pipetteringen) før de ble fryst ned igjen. Da vi enda en gang tinte prøvene for neste forsøk, var det mulig at enzymaktiviteten i spyttet startet, noe som kan ha påvirket resultatene.

Mulige pipetteringsfeil kan også ha påvirket resultatene.

Under det første forsøket ble det brukt en platevasker, som ikke fungerte slik den skulle, og førte til unøyaktige resultater. Forsøket måtte dermed gjøres på nytt. Resultater viste store variasjoner og standardkurvene ble ikke som forventet. Dette var på grunn av store variasjoner i absorbanseverdiene og at standardkurven ikke ble som forventet. Resultatet var en standardkurve som var kraftig buet og grafer med tall langt utenfor referanse området.

Rådata 2 i tabell 8 viser absorbanse av kortisol målt ved 450 nm ved den andre utførelse av forsøket. Under dette forsøket ble det brukt en ny platevasker "Wellwash™ Microplate Washer" fra selskapet "ThermoFisher", som fungerte slik den skulle.

Den andre gangen vi gjorde forsøket var det lite konjugat igjen, så det var ikke nok til de tre siste radene. Rad 10, 11 og 12. Derfor brukte vi de tre siste radene fra det gamle resultatet.

Disse resultatene ble ikke vasket skikkelig i platevaskeren, så resultatene ble unøyaktig. De regnes dermed som mer nøyaktig enn resultatene fra det siste forsøket av kortisolaktiviteten, da de tre siste radene ikke ble tilført konjugat. Konjugatet reagerte dermed ikke med prøvene, og resultatene ble unøyaktig.

## 5.2 $\alpha$ -Amylaseresultatene

Det gjennomsnittlige resultatet for  $\alpha$ -amylase i figur 10 viser en høy aktivitet ved start. Dette kan skyldes økt stress i forhold til transport til innsamlingslokalet. Etter ankomst slapper deltakerne mer av, muligens grunnet roligere omgivelser. En svak økning i  $\alpha$ -amylaseaktiviteten i aktivitetssonen, viser til at deltakerne blir stresset av aktivitetene som blir utført. Etter aktivitetssonen holder grafen seg stabil mot 40 minutter, som kan skyldes ettervirkninger fra aktivitetssonen. Kurven faller fra 40 minutter frem til 60 minutter, som muligens har noe å gjøre med at aktiviteten er over, og deltakerne slapper mer av. Den bratte økningen i de ti siste minuttene kan være grunnet stress i forhold til det å forlate lokalet. For å få en mer detaljert forståelse på deltakernes stressnivå, går vi inn på hvert enkelt resultat.

M113 T1 (blå) i figur 11 viser at deltakeren er stresset ved første spyttprøven. Fram mot den avslappende aktiviteten slapper deltakeren mer og mer av. Da aktiviteten starter øker  $\alpha$ -amylasekonsentrasjonen svakt, og avtar etter aktiviteten er ferdig. Dette kan tyde på at personen hadde litt forventning til oppgaven etter å ha gjort T3 den første dagen. Denne grafen hadde veldig lite utslag, som kan tyde på at personen ikke lar seg stresse lett.

M113 T3 (rød) viser at deltakeren er ganske avslappet gjennom alle målingene. Bli ikke spesielt påvirket av den stressende aktiviteten. Dette er litt overraskende da det var den første testen personen var i gjennom og at det heller ikke er noen tegn til forventningsstress.

M106 T2 (blå) i figur 12 viser en stressøkning i aktivitetssonen, som denne dagen er som en helt normal arbeidsdag. Viser at deltakeren blir stresset av aktiviteten.

M106 T3 (rød) har en synkende stresskurve fra starten av mot 10 minutter. Det viser at deltakeren er stresset før den første prøven blir tatt. I aktivitetssonen er det en økende konsentrasjon, som passer med at det er en stressende aktivitet. Deltakeren blir tydelig stresset av denne aktiviteten. Ut fra grafen kan en se at deltakeren blir raskt avslappet etter aktiviteten er ferdig.

M107 T1 (blå) i figur 13 starter med en ganske høy konsentrasjon som viser at deltakeren er stresset ved oppmøte. Konsentrasjonen er synkende i aktivitetssonen, og deltakeren slapper av, som mest sannsynlig skyldes at det er en avslappende aktivitet. Mot slutten stiger grafen mye muligens grunnet stress i forhold til det å forlate lokalet.

M107 T3 (rød) starter også med en ganske høy konsentrasjon på cirka 300 U/mL. I aktivitetssonen øker konsentrasjonen svakt, som mest sannsynlig skyldes den stressende aktiviteten.

M105 T1 (blå) i figur 14 starter med en høy konsentrasjon. Det kan skyldes at personen er generelt stresset før testen, men blir roligere utover testen. Rundt aktivitetssonen kan en se at konsentrasjonen øker, noe som kan skyldes at personen blir stresset av å ikke gjøre så mye arbeid i aktivitetssonen. Utover resten av testen synker konsentrasjonsnivået gradvis nedover til et vanlig nivå. Dette kan være i forbindelse med at aktiviteten er over.

T3 (rød) starter med lav konsentrasjon som kan skyldes lite forhåndsstress. Konsentrasjonen øker gradvis fra starten, muligens grunnet forventningsstress. Deretter avtar grafen svakt fra 10 minutter fram til 30 minutter, hvor konsentrasjonen starter å gå opp igjen. Dette stemmer overens med at T3 var den stressende oppgaven.

M104 T1 (blå) i figur 15 viser en økning opp til aktivitetssonen og at dette faller av direkte etter. Fallet i aktivitet her skyldes mest sannsynlig at T1 er en rolig test. Dette kan være på grunn av et forventningsstress, da T1 ble utført på dag 1.

M104 T3 (rød) viser derimot en liten økning fra starten opp til 10 minutter før den synker litt igjen. Dette kan skyldes stress som følge av transport til lokalet. Når aktiviteten starter får man en rask økning som gir en topp ved 40 minutter. Dette kan stemme godt overens med at T3 er den stressende oppgaven.

For å få bedre innsikt i reproduserbarheten til resultatene, sammenlignes oppnådde resultater med resultatene fra doktorgradsavhandlingen av Stephanie Balters.

M113 T1 i figur 30 er på våre resultater noe annerledes enn Stephanies graf på kortisol M113 T1 og T3. Dag 2 T1 hos Stephanies graf starter rundt 380 ng/ml, mens vår starter relativt lavt, rundt 100 ng/ml. Sett bort ifra verdiforskjellen er grafene for T1 relativt like, med tanke på at begge har topp ved 20 minutter og synker etter det. Utover det holder begge seg relativt stabile, med unntak ved 40 minutter, hvor det oppstår en liten topp igjen på våre resultater. Grafene for T3 er mer motsatt, hvor vår starter høyt og avtar mot 100 ng/ml ved 10 minutter. Hennes graf stiger derimot fra start mot 10 minutter. Det blir igjen forskjell ved 20 minutter, da Stephanies graf holder seg lav og vårt resultat får en ny topp. Fra 30 minutter og utover ser derimot grafene like ut.

M106 T2 i figur 31 ligger verdiene i et ganske likt område, til tross for at våre verdier er noe mer ustabile. Ulikheten er størst ved 10 minutter, da vår synker en del der Stephanies graf stiger svakt. Fra 20 minutter synker begge grafene ned mot et bunnpunkt ved 40 minutter. Begge viser en svak økning igjen etter dette, og siste forskjell blir vår økning mot 70 minutter. Grafene for M106 T3 har noen likheter, spesielt ved en markant topp ved 40 minutter. Verdiene for 10 og 30 minutter er også relativt like unntak av noen forhøyede verdier ved start og ved 20 minutter. Toppene våre har en del høyere verdi, men den viktigste toppen ved 40 minutter viser at resultatet er ganske like.

M107 T1 i figur 7 viser likheter til tross for at verdiene er noe ustabil. Fra 20 minutter stiger grafen våre mot en topp på 30 minutter og holder seg stabilt mot 40 minutter. Her synker den gradvis ned til 100 ng/ml mot 70 minutter. Ved Stephanies graf i figur 32 holder den seg stabil fra 10 minutter fram til 40 minutter, hvor den får en topp på 50 minutter. Der synker den noe fram til 60 minutter, hvor den deretter holder seg stabil fram til 80 minutter. Grafene

for T3 viser store likheter fra start og frem mot 20 minutter, hvor våre verdier avtar og hennes fortsetter og øker fram mot 30 minutter. Den synker da gradvis nedover og holder seg stabil helt til 80 minutter. Vår graf får toppunkt på 30 minutter og holder seg relativt stabil fram mot 50 minutter, hvor den gradvis synker ned til 60 minutter og holder seg stabilt mot 70 minutter.

Resultatene for M105 i figur 33 T1 er ganske like, ved at de holder seg svært lave gjennom hele grafen. Det er enkelte forskjeller med tanke på små topper og bunnpunkt, men disse er såpass små i forhold til resten. Der det er en svak stigning mot 30 minutter fra start i vår, går det jevnt nedover fra start med Stephanies resultat. I tillegg viser Stephanies graf en liten økning ved 60 og 70 minutter som mangler i våre resultater. Resultatene fra T3 har noen likheter. Forskjellen ligger i at verdiene for 10, 30 og 40 minutter er mye lavere i vår graf. Resultatene fra M105 T3 er feilaktige grunnet feil i platevaskeren, noe som mest sannsynlig er grunnen til disse verdiene. Det vises derimot tegn til at utseende hadde vært mye mer likt, om de nevnte verdiene var høyere.

Grafene for M104 i figur 34 er veldig like hvis en ser bort i fra verdiforskjellen dem imellom. Opp mot punktet på 30 minutter er både våre og Stephanies resultater relativt rolige, uten noen store forskjeller fra punkt til punkt. Det viktigste punktet er ved 40 minutter, hvor begge viser en tydelig topp som skiller seg fra resten. Stephanies graf synker deretter jevnt nedover mot 70 og 80 minutter, og vi får en ny stigning fra 50 minutter opp mot 60. Resultatene er tatt med fra det første forsøket med kortisol, hvor platevasker ikke fungerte som den skulle.

Ved å sammenligne resultatene fra biomarkørenes konsentrasjon/aktivitet kan en finne ut hvilke biomarkør som foretrekkes å bruke. En kan i tillegg finne ut om det anbefales å bruke begge, eller om det er helt opp til den enkelte hva en vil bruke.

Gjennomsnittet av grafene til  $\alpha$ -Amylase og kortisol er ganske forskjellige. Gjennomsnittet i  $\alpha$ -Amylaseresultatene i figur 10 starter som det høyeste punktet og synker derfra mot aktivitetsnivået. Det gjennomsnittlige kortisolresultatet i figur 5 starter relativt lavt, og synker litt mot 10 minutter i forhold. Det er også en stigning mot 20 minutter, før den synker litt igjen mot 30 minutter.  $\alpha$ -amylase stiger derimot mot 30 minutter og stabiliserer seg mot 40 minutter. Mot 40 minutter stiger kortisolen opp til sitt høyeste punkt før den synker mot 50 minutter og ut mot 70 minutter.  $\alpha$ -amylase synker også utover mot 60 minutter, men stiger brått mot 70 minutter i motsetning til kortisolen. Disse grafene viser lite til ingen sammenheng imellom de 2 parameterne.

Metoden EIA ble brukt til kortisolforsøket og metoden enzymkinetikk ble brukt til  $\alpha$ -amylaseforsøket. "Salimetrics" ble brukt ved målingen av  $\alpha$ -amylaseaktiviteten i spytt. Ved målingen av kortisolaktiviteten i spytt ble det brukt "arbor assays". Det var raskere å utføre øvelsen av  $\alpha$ -amylase enn kortisoløvelsen. En av grunnene til dette kan være at kortisol hadde flere trinn, og dermed større sannsynlighet for at noe ble feil. Det var mange trinn å utføre og følgefeil kunne oppstå. Det var i tillegg flere pipetteringstrinn i kortisoløvelsen enn i  $\alpha$ -amylaseøvelsen. Det var da større sannsynlighet for pipetteringsfeil, som kunne ha noe å si for resultatenes nøyaktighet.

Fordeler med metodene er at de kan brukes til stressmåling av kortisol og  $\alpha$ -amylase i spytt. Spyttprøven kan bli gjort hjemme, istedenfor å dra på sykehuset for å få tatt prøven. Kortisolnivået i kroppen endrer seg ikke med en gang, men omtrent etter en time. Det vil medføre at resultatet av spyttprøven ikke vil gi feil utslag på prøven om man venter noen minutter etter man har våknet opp (28).

Ulemper ved metodene er at de bygger på enzymatiske reaksjoner, som konkurrerer med andre stoffer i løsningen. I de fleste tilfeller vil dette si at en ikke vil få et fullt utbytte av reaksjonene. Ulempe ved bruk av EIA og enzym kinetikk ovenfor for eksempel HPLC er at det er flere muligheter for menneskelige feil. Når et instrument gjør mesteparten av oppgaven ser en oftere systematiske feil der en ser tilfeldige feil oftere hos mennesker. Det kan derfor være mer ønskelig med systematisk feil enn tilfeldig da det er lettere å rette systematiske feil.

Alt i alt anbefales det å bruke både  $\alpha$ -amylase og kortisol som biomarkører om en har tid og ressurser til begge. Om en har dårlig tid kan det være lettere å bruke  $\alpha$ -amylase da prosedyren er relativt kort. Hvis tid ikke er et problem kan kortisol være å foretrekke da det virker som en lettere og mer stabil prosedyre. Dette skyldes at  $\alpha$ -amylase prosedyren kan være litt hektisk og stressende hvor kortisol prosedyren går over noe lengre tid. Kortisolen er heller ikke like hektisk med tanke på substratets virkningstid, da en tilfører stop substrat. Dette skyldes at substratet skal virke i kun et minutt før første måling av  $\alpha$ -amylase, mens den skal virke i 30 minutter ved kortisolen. Dette vil si at tiden fra tilføring til måling har større utslag på  $\alpha$ -amylase enn ved kortisolen.

Dersom vi sammenlikner egne resultater med resultater fra tidligere forskning, kan det bygges en større forståelse for resultatene. Resultatene fra en tidligere artikkel viser til at eldre mennesker har nedsatt  $\alpha$ -amylase fra spytt (sAA- salivary  $\alpha$ -amylase) (12).

Deltakerne i dette forsøket er i aldersgruppen mellom 24 til 56 år. Enkelte av våre prøver viser lavere sAA enn andre. Dette kan skyldes at alderen har noe å si for  $\alpha$ -amylaseaktiviteten i spyttet, og at de eldre voksne har lavere konsentrasjon av  $\alpha$ -amylase enn de yngre. En annen artikkel viser til at sAA kan være god som en ekstra parameter for stressundersøkelser da den ikke er nært relatert til katekolaminer og kortisol (29).

Kortisol er en indikator på stress. En indikator vil si noe som kan måles og gir tydelig signal for en tilstand eller en endring i tilstand.  $\alpha$ -Amylase kan derimot brukes som en indikator på både stress og avslapning ut fra resultater fra studiet til Takai N, Yamaguchi M, Aragaki T, Eto K, Uchihashi K, Nishikawa Y, et al (12). Dette vil si at en ofte vil se at toppene sammenfaller dem imellom, men at  $\alpha$ -amylase mye raskere vil synke ned igjen hvor kortisolen bruker lang tid på å avta.

I vår studie fant vi ingen direkte sammenheng mellom cortisol og sAA, i likhet med studiet av Nater UM, Rohleder N, Gaab J, Berger S, Jud A, Kirschbaum C, et al (30). Studiet viste også til forskjeller i intensiteten av kortisol og  $\alpha$ -amylase ut i fra alder. En så i studiet Strahler J, Mueller A, Rosenloecher F, Kirschbaum C, Rohleder N (31) at hos barn var nivåene på begge lavere. Hos de eldre var det tegn til lavere sAA tall mens kortisol tallet hadde steget hos de eldre mennene.

Det er viktig å passe på at verdiene til resultatene en får, er så nære den sanne verdien som mulig. Dette kan gjøres ved å se på reproduserbarheten til prøvene. Tabell 4 viser utregningen av det relative standardavviket for kortisol. Dette ble utført ved at en plate ble lest av tre ganger. Da maskinen ikke hadde program for å gjøre tre avlesninger, måtte dette gjøres manuelt, noe som førte til at det gikk litt tid mellom hver avlesning. I tillegg ble denne testen gjort helt på slutten av dagen, prøvene kan dermed ha blitt påvirket av å ha stått litt ute. Prøvene markert med grønn farge var de som kunne regnes som greie verdier sett med 15% som grense, mens alle de røde var prøver som gikk utenfor. Det er brukt verdien for inter CV da vi sammenlignet samme plate, men ved forskjellige avlesningstidspunkt. Av disse var det enkelt verdier som gikk så langt utenfor standarden, at de ikke kunne måles. Det førte til at enkelte av de utregnede prosentene bare ble gjort med to verdier, i stedet for tre. De aller fleste av disse verdiene hadde altfor store forskjeller. En ting som kan ha påvirket, er at substratet virket for lenge, men forskjellene var varierende hvor de kunne både være mye høyere og lavere ved den siste målingen. Disse forskjellene kunne også ha skyldtes ustabilitet i prøvene eller ved kittet som ble brukt. En annen mulighet er problemer ved maskinen. Prøve M105 T3, M104 T1 og T3 ble brukt fra tidligere test, siden vi ikke hadde nok konjugat igjen

for de siste prøvene. Det er høy sannsynlighet for at det var feil på disse prøvene, da platevaskeren ikke fungerte slik som den skulle, da første testen ble utført. Derfor tok vi kortisoltesten på nytt, men hadde ikke nok utstyr til å fullføre de tre siste prøvene.

Fra salimetrics regner en med at intra- og interassay kan ha en så stor forskjell som 5% uten at det skal gjøre verdiene for dårlige. For intra assay regner en med at gode verdier kan ha et standardavvik opp mot 10% og 15% for inter assay (24). Når standardavvik er så store, er det også mer naturlig at en får større variasjon i resultat enn ved lavere standardavvik. Mange av verdiene våre har standardavvik som er alt for høye, og kan ikke regnes som gode verdier. Grunnen for disse verdiene er ikke lett å bestemme, da verdiene både økte og minsket ved blant annet testing av reproduserbarheten. Dette gjør at det er vanskelig å bestemme hvorfor det har skjedd.

For å kunne få et klarere resultat kunne det vært nødvendig å ha et større antall deltagere, samt flere forskjellige tester over en lengre tidsperiode. Dette vil kunne utelukke både tilvenning til stress og ville i større grad kunne lage en sikker baseline til de enkelte deltakerne for både kortisol og  $\alpha$ -amylase. Det ville også ha hjulpet å kunne bruke flere paralleller for å kunne verifisere resultatene samt å bruke HPLC for å sammenligne med flere resultater og metoder.

## 6 Kapittel 6 - Konklusjon

$\alpha$ -Amylase er en biomarkør som kan måle stress i spytt, da vi ut i fra våre resultater så tydelige reaksjoner ved simulatorrestene. Resultatene viser ikke til korrelasjon mellom  $\alpha$ -amylase og kortisol, bortsett fra at begge er biomarkører på stress. Ut fra våre resultater anbefaler vi å bruke både kortisol og  $\alpha$ -amylase til måling av stress i spytt.



## Referanser

1. University O. Stress [Dictionary ]. Current year [updated 03.05.2017; cited 2017 03.05]. Available from: <https://en.oxforddictionaries.com/definition/stress>
2. Ingibjörg H Jonsdottir d, Institutet för stressmedicin, Göteborg, Holger Ursin pe, Unifob helse, Universitetet i Bergen. Stress: Helsedirektoratet 1. Juni 2009 [cited 2017 15.02]. Available from: <https://helsedirektoratet.no/Documents/Publikasjonsvedlegg/IS-1592-aktivitetshandboken-kapittel-46-stress.pdf>
3. Lande TA. Stress; menneskets verste fiende? 09.07.2014 [cited 2017 03.05]. Available from: <http://prehabtrening.no/artikler/stress-menneskets-verste-fiende/>.
4. Helseinformatikk N. Psykologisk stress og sykdom 2016 [cited 2017 03.05]. Available from: <https://nhi.no/psykisk-helse/psykiske-lidelser/stress-og-sykdom/>.
5. Nibe PKS. Symptomer på stress [cited 2017 15.02]. Available from: <http://oslo-psykologene.no/stress/symptomer-pa-stress>.
6. Ingvild Berg Saksvik Pi, UiO, Per Øystein Saksvik Pi, NTNU, Hilmar Nordvik Pi, NTNU. Personlighetens rolle for hvordan stress oppleves i arbeidslivet [cited 2017 27.01]. Available from: [http://www.psykologtidsskriftet.no/index.php?seks\\_id=403118&a=3](http://www.psykologtidsskriftet.no/index.php?seks_id=403118&a=3).
7. Association AH. What Is a Stress Test? [cited 2017 03.05]. Available from: [https://www.heart.org/idc/groups/heart-public/@wcm/@hcm/documents/downloadable/ucm\\_300453.pdf](https://www.heart.org/idc/groups/heart-public/@wcm/@hcm/documents/downloadable/ucm_300453.pdf).
8. Kirschbaum C, Pirke KM, Hellhammer DH. The 'Trier Social Stress Test'--a tool for investigating psychobiological stress responses in a laboratory setting. *Neuropsychobiology*. 1993;28(1-2):76-81.

9. Petrowski K, Wintermann G-B, Kirschbaum C, Strahler J. Salivary alpha-amylase response following repeated psychosocial stress in patients with panic disorder. *Journal of Anxiety Disorders*. 2016;37:54-63.
10. Kaplan F, Guy CL.  $\beta$ -Amylase Induction and the Protective Role of Maltose during Temperature Shock. *Plant Physiology*. 2004;135(3):1674-84.
11. Salimetrics. Salivary a-Amylase Kinetic Enzym Assay Kit [cited 2017 15.02]. Available from: <https://www.salimetrics.com/assets/documents/1-1902.pdf>.
12. Takai N, Yamaguchi M, Aragaki T, Eto K, Uchihashi K, Nishikawa Y. Effect of psychological stress on the salivary cortisol and amylase levels in healthy young adults. *Archives of Oral Biology*. 2004;49(12):963-8.
13. van Stegeren AH, Wolf OT, Kindt M. Salivary alpha amylase and cortisol responses to different stress tasks: Impact of sex. *International Journal of Psychophysiology*. 2008;69(1):33-40.
14. Vista T. a-Amylase [cited 2017 20.04]. Available from: <http://www.tutorvista.com/chemistry/amylose-molecular-weight>
15. Health H. What Does Cortisol Do? [cited 2017 15.02]. Available from: <http://www.hormone.org/hormones-and-health/what-do-hormones-do/cortisol>.
16. Jens Petter Berg UiO. Kortisol [cited 2017 15.02]. Available from: <https://sml.snl.no/kortisol>.
17. Assays A. Cortisol Structure [cited 2017 20.04]. Available from: [http://www.arborassays.com/cortisol\\_2016/](http://www.arborassays.com/cortisol_2016/).
18. Olav Sand ØVS, Egil Haug og Jan G. Bjålie. *Menneskekroppen - Fysiologi og Anatomi*2014.

19. Egil Haug siioe, dr.med. og professor i endokrinologisk biokjemi ved Universitetet i Oslo. Spytprøver til kortisolmåling [cited 2017 18.05]. Available from: <http://tidsskriftet.no/2007/03/leder/spyttprover-til-kortisolmaling>.
20. Gupta V. Mineralocorticoid hypertension. Indian Journal of Endocrinology and Metabolism. 2011;15(Suppl4):S298-S312.
21. Tecan HifcdarEw. alpha Amylase Saliva Enzymatic Assay [cited 2017 15.02]. Available from: <http://www.ibl-international.com/en/alpha-amylase-ea>.
22. Biotechacademy. ELISA [cited 2017 17.02]. Available from: <http://www.biotechacademy.dk/Undervisningsprojekter/Gymnasialeprojekter/genteknologi/teori/4genteknologisketools/elisa>
23. Pokhrel P. ELISA- Principle, Types and Applications [cited 2017 17.02]. Available from: <http://www.microbiologynotes.com/elisa-principle-types-and-applications/>.
24. Points I. Coefficient of variation: Use and misuse [cited 2017 10.05]. Available from: [http://influentialpoints.com/Training/Coefficient\\_of\\_variation\\_Use\\_and\\_misuse.htm](http://influentialpoints.com/Training/Coefficient_of_variation_Use_and_misuse.htm)
25. Scientific TF. Wellwash™ Microplate Washer [cited 2017 03.05]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/5165000>
26. Scientific TF. Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer [cited 2017 03.05]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/51119200>
27. Myassays Analysis Software Solution [cited 2017 20.04]. Available from: <https://www.myassays.com/>
28. P. Restituto a JCGb, M.J. Gil a, C. Mugueta a, S. Santos b, J.I. Monreal a, N. Varo c,\*.  
Advantage of salivary cortisol measurements in the diagnosis

of glucocorticoid related disorders [cited 2017 18.05]. Available from:

[https://www.researchgate.net/publication/5571007\\_Advantage\\_of\\_salivary\\_cortisol\\_measurements\\_in\\_the\\_diagnosis\\_of\\_Glucocorticoid\\_Related\\_Disorders](https://www.researchgate.net/publication/5571007_Advantage_of_salivary_cortisol_measurements_in_the_diagnosis_of_Glucocorticoid_Related_Disorders).

29. Nater UM, La Marca R, Florin L, Moses A, Langhans W, Koller MM, et al. Stress-induced changes in human salivary alpha-amylase activity—associations with adrenergic activity. *Psychoneuroendocrinology*. 2006;31(1):49-58.

30. Nater UM, Rohleder N, Gaab J, Berger S, Jud A, Kirschbaum C, et al. Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm. *International Journal of Psychophysiology*. 2005;55(3):333-42.

31. Strahler J, Mueller A, Rosenloecher F, Kirschbaum C, Rohleder N. Salivary  $\alpha$ -amylase stress reactivity across different age groups. *Psychophysiology*. 2010;47(3):587-95.

## Vedlegg

Tabell 7. Viser rådata fra det første kortisolforsøket, hvor kortisolabsorpsjonen er målt ved 450 nm.

Data: 450 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.1179	0.1345	0.3228	0.3291	0.3038	0.2594	0.1614	0.1872	0.2978	0.2251	0.3133	0.2190
B	0.1506	0.1564	0.3875	0.3590	0.2800	0.2348	0.3348	0.2801	0.3642	0.2722	0.3334	0.2582
C	0.1488	0.1625	0.3308	0.3304	0.2272	0.2441	0.1597	0.3132	0.3428	0.1662	0.2508	0.2197
D	0.2086	0.2095	0.3883	0.4094	0.3010	0.2555	0.3705	0.1529	0.3418	0.1675	0.3284	0.3507
E	0.2593	0.3745	0.3839	0.3665	0.2775	0.1900	0.1938	0.1565	0.5443	0.2159	0.2699	0.1412
F	0.4199	0.2986	0.4380	0.4105	0.2749	0.2140	0.1754	0.2877	0.5883	0.1730	0.3447	0.2142
G	0.2419	0.3123	0.5478	0.5266	0.2560	0.2145	0.1677	0.2903	0.4250	0.2004	0.2357	0.1572
H	0.2861	0.6617	0.4637	0.4303	0.2664	0.2358	0.2132	0.2596	0.3826	0.2268	0.4000	0.3211
Checksum		51090										

Tabell 8. Viser rådata fra det andre kortisolforsøket. Resultatene her viser måling av absorpsjon ved 405 nm ved en 1:100 fortykning.

Data: 450 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.0988	0.0933	0.4507	0.2228	0.2108	0.1737	0.3244	0.2378	0.3003	0.0537	0.0604	0.0566
B	0.1311	0.1584	0.4937	0.3640	0.2753	0.2142	0.3200	0.2312	0.2829	0.0546	0.0545	0.0541
C	0.1723	0.2285	0.2570	0.2652	0.1876	0.1669	0.3740	0.2083	0.2704	0.0588	0.0559	0.0554
D	0.2256	0.2065	0.4995	0.4751	0.2037	0.2162	0.2302	0.2175	0.2544	0.0582	0.0581	0.0559
E	0.2636	0.3088	0.2971	0.4914	0.4319	0.1754	0.2386	0.2090	0.3160	0.0583	0.0567	0.0542
F	0.2966	0.2919	0.3343	0.4048	0.2894	0.2696	0.3158	0.2114	0.2818	0.0600	0.0535	0.0542
G	0.3616	0.3734	0.5067	0.3793	0.3016	0.2232	0.3737	0.2324	0.3772	0.0548	0.0532	0.0531
H	0.3817	0.5269	0.4334	0.3670	0.2162	0.1980	0.3729	0.2369	0.3365	0.0557	0.0550	0.0602

## M113

Data: 405 nm

	1	2
A	0.7334	0.2438
B	0.3531	0.2135
C	0.2243	0.2038
D	0.2516	0.1599
E	0.1948	0.1623
F	0.2338	0.1855
G	0.2434	0.1647
H	0.3364	0.2685
Checksum		13883

Figur 16. Rådata M113. Rad 1 – T1 | Rad 2 – T3. Måling ved 1 min ved risting.

Data: 405 nm

	1	2
A	1.6663	0.4433
B	0.6957	0.3668
C	0.3758	0.3429
D	0.4673	0.2390
E	0.3063	0.2431
F	0.3855	0.2895
G	0.4278	0.2330
H	0.6548	0.5212
Checksum		22566

Figur 17. Rådata M113. Rad 1- T1 / Rad 2 – T3. Måling ved 3 min ved risting.

## M106

Data: 405 nm

	1	2
A	0.2000	0.3131
B	0.2778	0.2158
C	0.2320	0.3065
D	0.2724	0.3903
E	0.2205	0.3202
F	0.2683	0.2092
G	0.2447	0.2428
H	0.2886	0.3956
Checksum		16512

Figur 18. Rådata M106. Rad 1- T2 / Rad 3 – T3 Måling ved 1 min ved risting.

Data: 405 nm

	1	2
A	0.3184	0.7351
B	0.5202	0.4045
C	0.4009	0.7006
D	0.5057	0.9782
E	0.3813	0.7406
F	0.5053	0.3859
G	0.4108	0.4881
H	0.5582	0.9594
Checksum		47017

Figur 19. Rådata M106. Rad 1- T2 / Rad 2 – T3 Måling ved 3 min ved risting.

## M107

Data: 405 nm

	1	2
A	2.3095	1.8219
B	1.1850	0.5158
C	0.5281	0.4846
D	0.3388	0.5457
E	0.4426	0.3338
F	0.4003	0.4024
G	0.4461	0.5229
H	1.8033	0.4458
Checksum		11568

Figur 20. Rådata M107. Rad 1- T1 / Rad 2 – T3 Måling ved 1 min ved risting.

Data: 405 nm

	1	2
A	3.6000	3.6054
B	2.6880	1.2265
C	1.2581	1.2010
D	0.7244	1.3498
E	0.9977	0.7118
F	0.8587	0.9036
G	1.0572	1.2350
H	3.4619	1.0326
Checksum		34436

*Figur 21. Rådata M107. Rad 1- T1 | Rad 2 – T3 Måling ved 3 min ved risting.*

## M105

Data: 405 nm

	1	2
A	0.7786	0.3030
B	0.4626	0.4521
C	0.2851	0.3981
D	0.5729	0.4016
E	0.5356	0.5453
F	0.3478	0.3859
G	0.3082	0.3505
H	0.2580	0.4013
Checksum		55499

*Figur 22. Rådata M105 - Rad 1- T1 | Rad 2 – T3 Måling ved 1 min ved risting.*



Data:	405 nm	
	1	2
A	1.9380	0.7260
B	1.0838	1.1962
C	0.5867	1.0364
D	1.3987	1.0413
E	1.2974	1.4901
F	0.8179	0.9860
G	0.6778	0.8581
H	0.5231	1.0754
Checksum		7634

*Figur 23. Rådata M105 - Rad 1- T1 | Rad 2 – T3 Måling ved 3 min ved risting.*

## M104

Data:	405 nm	
	1	2
A	0.3543	0.3137
B	0.5697	0.4701
C	0.8456	0.3912
D	0.4491	0.6881
E	0.4709	0.8727
F	0.3359	0.4156
G	0.3216	0.3122
H	0.3579	0.4460
Checksum		441

*Figur 24. Rådata M104 - Rad 1- T1 | Rad 2 – T3 Måling ved 1 min ved risting.*

Data: 405 nm

	1	2
A	0.6599	0.7209
B	1.2420	1.1899
C	1.8130	0.9606
D	0.9207	1.7988
E	0.9998	2.2350
F	0.6496	1.0386
G	0.6140	0.8661
H	0.6758	1.2199
Checksum		16160

Figur 25. Rådata M104 - Rad 1- T1 / Rad 2 – T3 Måling ved 3 min ved resting.

Calibrator	Conc.	Wells	Raw	SEM	Backfit	Recovery %
● Standard1	3200	B1	9.78	3.81	4173	130.4
		B2	17.4		2646	82.68
● Standard2	1600	C1	21.3	7.84	2099	131.2
		C2	37		826.3	51.65
● Standard3	800	D1	36.2	2.67	867	108.4
		D2	30.8		1190	148.7
● Standard4	400	E1	46.8	6.31	462.5	115.6
		E2	59.4		219.2	54.8
● Standard5	200	F1	56	0.656	268.1	134.1
		F2	54.7		289.8	144.9
● Standard6	100	G1	74.1	1.65	91.57	91.57
		G2	77.4		75.32	75.32

Figur 26. Standarder for kortisol.

## Standardene

	1	2
A	0.1208	3.5984
B	0.1270	3.2775
C	0.3916	3.1853
D	0.4097	1.9566
E	0.0568	2.1518
F	0.0582	2.7965
G	0.0558	1.1716
H	0.0581	1.4042
Checksum		41108

Figur 27. Rådata Standard. Amylase 1A - Første test, med standard i rad 1.

Data: 405 nm

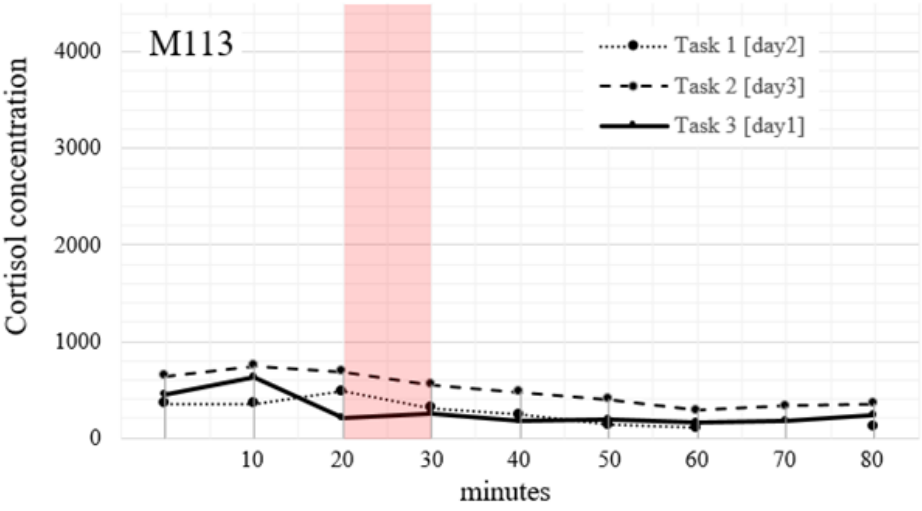
	1	2
A	0.1712	3.8455
B	0.1792	3.6578
C	0.8984	3.6676
D	0.9445	3.6295
E	0.0568	3.5995
F	0.0584	3.7638
G	0.0558	2.6181
H	0.0581	3.2897
Checksum		36978

Figur 28 - Rådata standard. Amylase 2A.

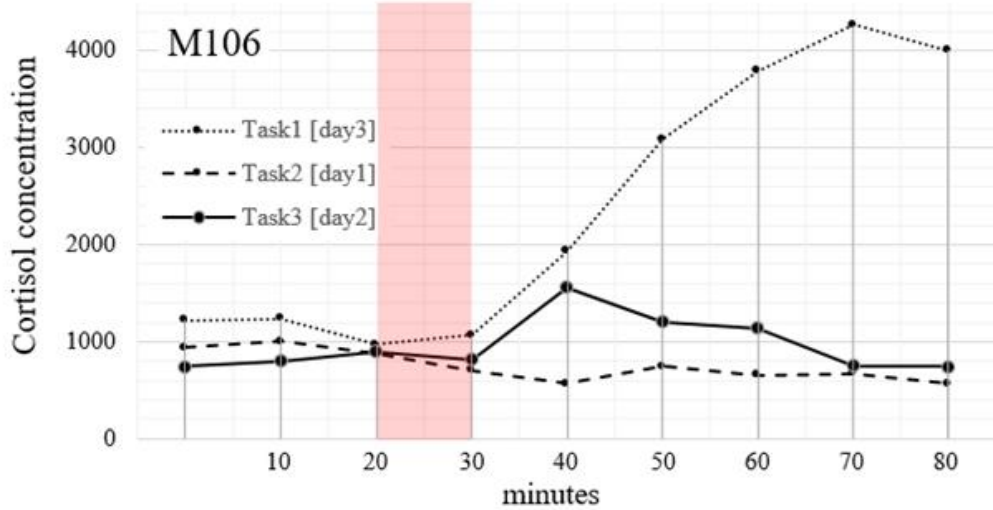
8.257
8.5519
83.0288
87.616

Figur 29 – Utrechnet lav og høy kontroll

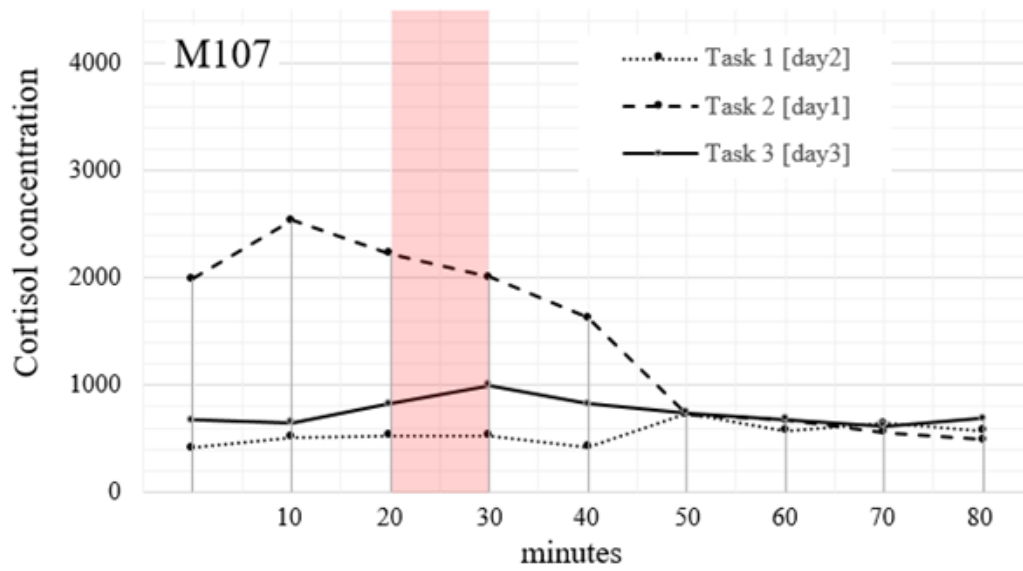
# Stephanies resultater



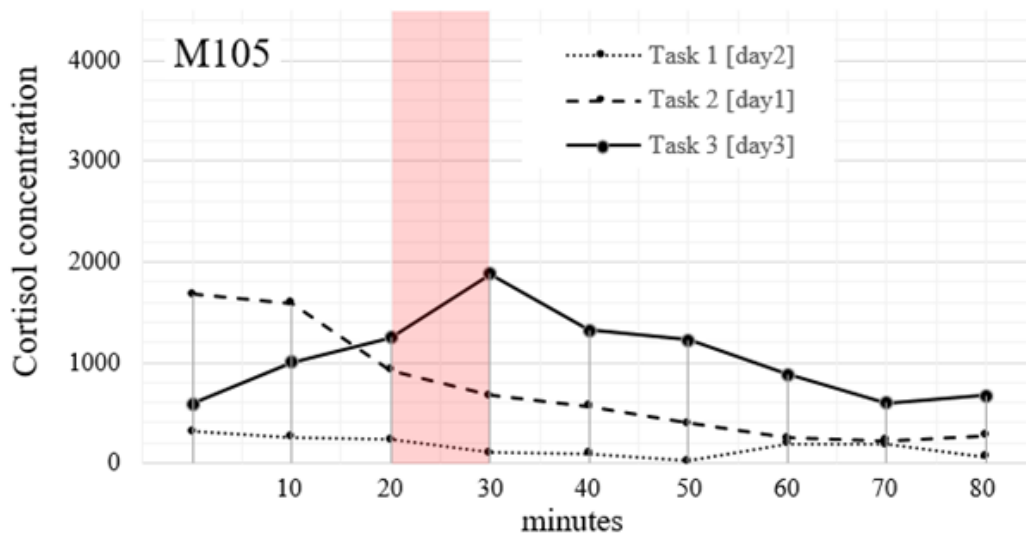
Figur 30. Stephanies kortisolresultat M113.



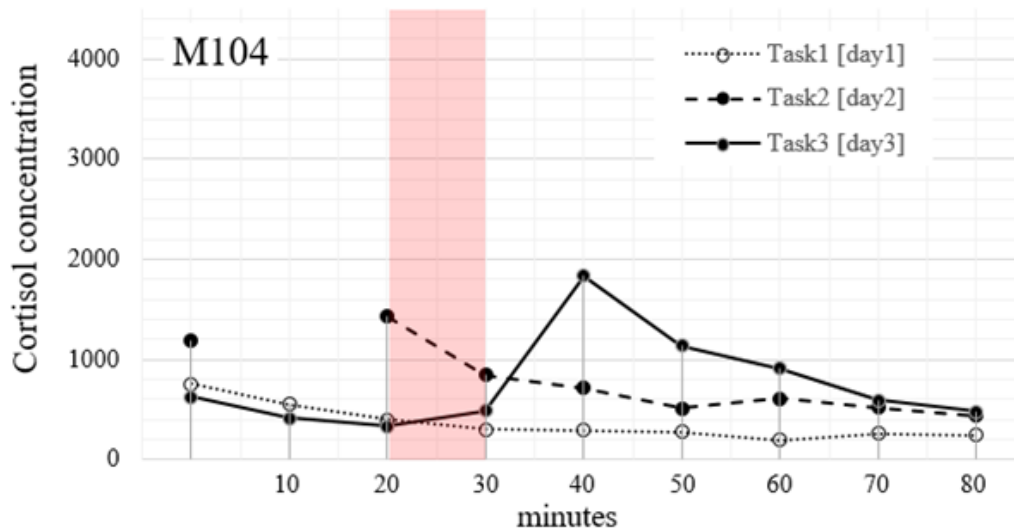
Figur 31. Stephanies kortisolresultat M106.



Figur 32. Stephanies kortisolresultat M107.



Figur 33. Stephanies kortisolresultat M105.



Figur 34. Stephanies kortisolresultat M104.

Tabell 9 og 10. Viser beregnet standardavvik for  $\alpha$ -amylase og kortisol. Disse verdiene er så brukt i figur 10 og 4.

	Standardavvik a-Amylase		Standardavvik kortisol
0 Min	90.92081001	0 min	607,33
10 Min	65.30964846	10 min	324,29
20 Min	47.26199761	20 min	896,07
30 Min	52.61141136	30 min	817,45
40 Min	66.15473884	40 min	2289,29
50 Min	31.39051359	50 min	913,93
60 Min	29.37769012	60 min	836,10
70 Min	70.1144872	70 min	492,12