

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO



ANA STAROVEŠKI

**DOLOČANJE 17-HIDROKSISTEROIDOV V URINU PRI MOTNJAH  
V DELOVANJU NADLEDVIČNE ŽLEZE**

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA STAROVEŠKI

**DOLOČANJE 17-HIDROKSISTEROIDOV V URINU PRI MOTNJAH  
V DELOVANJU NADLEDVIČNE ŽLEZE**

**DETERMINATION OF URINARY 17-HYDROXYSTEROIDS  
IN ADRENAL GLAND DISORDERS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem. na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Meritve 17-hidroksisteroidov v urinu so bile opravljene v Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo v Ljubljani.

### **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem. za napotke in pomoč pri nastajanju diplomske naloge.

Posebna zahvala gre tudi vodji Laboratorija za analitiko hormonov in tumorskih markerjev dr. Alešu Jerinu, uni. dipl. kem., spec. med. biokem. in Stanki Cankar, dipl. inž. lab. biomed., ki sta mi omogočila in pomagala pri izvedbi praktičnega dela diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi svoji družini in prijateljem, katerih podpora mi je pomagala prestati težke trenutke. Hvala sestri Jasmini, ki mi je s svojimi nasveti vedno stala ob strani.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem..

Ljubljana, junij 2012

Ana Staroveški

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Albin Kristl, mag. farm.

Član diplomske komisije:izr. prof. dr. Iztok Grabnar, mag. farm.

## KAZALO VSEBINE

<b>SEZNAM SLIK .....</b>	<b>III</b>
<b>SEZNAM PREGLEDNIC .....</b>	<b>IV</b>
<b>POVZETEK.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VI</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>VII</b>
<b>SEZNAM TRIVIALNIH IMEN STEROIDOV .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 ENDOKRINI SISTEM.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 HORMONI.....	2
<b>1.2 HIPOTALAMUS IN HIPOFIZA .....</b>	<b>3</b>
1.2.1 MEHANIZEM POVRATNE ZVEZE.....	3
<b>1.3 NADLEDVIČNA ŽLEZA .....</b>	<b>4</b>
1.3.1 HIPOTALAMO-HIPOFIZNO-NADLEDVIČNA OS .....	5
<b>1.4 KORTIZOL in OSTALI 17-HIDROKSISTEROIDI .....</b>	<b>7</b>
1.4.1 BIOSINTEZA KORTIZOLA.....	7
1.4.2 PLAZEMSKI PRENOS STEROIDNIH HORMOV .....	8
1.4.3 MEHANIZEM DELOVANJA STEROIDNIH HORMONOV.....	9
1.4.4 METABOLIZEM IN IZLOČANJE KORTIZOLA.....	10
1.4.5 BIOLOŠKI UČINKI KORTIZOLA.....	12
<b>1.5 MOTNJE V DELOVANJU SKORJE NADLEDVIČNE ŽLEZE .....</b>	<b>13</b>
1.5.1 HIPERFUNKCIJA SKORJE NADLEDVIČNE ŽLEZE - Cushingov sindrom .....	13
1.5.2 ODPOVED SKORJE NADLEDVIČNE ŽLEZE.....	16
1.5.3 KONGENITALNA ADRENALNA HIPERPLAZIJA .....	18
<b>1.6 FUNKCIJSKI TESTI ZA OCENO DELOVANJA SKORJE NADLEDVIČNE ŽLEZE.....</b>	<b>20</b>
1.6.1 STIMULACIJSKI TESTI .....	20
1.6.2 SUPRESIJSKI TESTI.....	21
<b>1.7 METODE ZA DOLOČANJE KONCENTRACIJE KORTIZOLA in OSTALIH 17- HIDROKSISTEROIDOV V URINU .....</b>	<b>22</b>
1.7.1 KOLORIMETRIČNE METODE.....	22
1.7.2 MOLEKULARNA ABSORPCIJSKA SPEKTROMETRIJA.....	23
1.7.3 IMUNOKEMIJSKE METODE.....	26
1.7.4 KROMATOGRAFSKE METODE.....	27
<b>1.8 24-URNI URIN KOT BIOLOŠKI VZOREC .....</b>	<b>28</b>
1.8.1 STEROIDNI HORMONI V RAZLIČNIH BIOLOŠKIH VZORCIH.....	28

<b>2</b>	<b>NAMEN DELA .....</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>31</b>
3.1	OPIS SKUPINE PREISKOVANCEV .....	31
3.2	OPIS ZBIRANJA VZORCEV .....	32
3.3	METODE IN MATERIALI ZA DOLOČANJE 17-HIDROKSISTEROIDOV V URINU .....	32
3.3.1	MODIFICIRANA METODA PO NORIMBERSKU IN APPLEBYJEVI Z ZIMMERMANNOVO REAKCIJO.....	33
3.4	STATISTIČNE METODE .....	41
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>43</b>
4.1	REZULTATI MERITEV 17-HIDROKSISTEROIDOV.....	43
4.2	ANALIZA REZULTATOV .....	46
4.2.1	PRIMERJAVA SKUPINE KONGENITALNA ADRENALNA HIPERPLAZIJA S KONTROLNO SKUPINO.....	49
4.2.2	PRIMERJAVA SKUPINE CUSHINGOV SINDROM S KONTROLNO SKUPINO.....	49
4.2.3	PRIMERJAVA SKUPINE CUSHINGOV SINDROM S SKUPINO KONGENITALNA ADRENALNA HIPERPLAZIJA .....	50
4.2.4	IZRAČUN DIAGNOSTIČNE OBČUTLJIVOSTI IN SPECIFIČNOSTI METODE ZA DOLOČANJE 17-HIDROKSISTEROIDOV .....	51
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA.....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>SKLEP .....</b>	<b>60</b>
	<b>LITERATURA .....</b>	<b>61</b>
	<b>PRILOGA 1 .....</b>	<b>65</b>
	<b>PRILOGA 2 .....</b>	<b>66</b>
	<b>PRILOGA 3 .....</b>	<b>67</b>
	<b>PRILOGA 4 .....</b>	<b>69</b>
	<b>PRILOGA 5 .....</b>	<b>70</b>
	<b>PRILOGA 6 .....</b>	<b>71</b>

## SEZNAM SLIK

<b>Slika 1:</b> Anatomija in histologija nadledvične žleze (7).....	4
<b>Slika 2:</b> Hipotalamo-hipofizno-nadledvična os (8).....	6
<b>Slika 3:</b> (a) Steroidni skelet z oštevilčenimi atomi ogljika in oznakami obročev na primeru holesterola (10). (b) Strukturna formula kortizola (rdeče je obkrožena 17-hidroksilna skupina) (11).....	7
<b>Slika 4:</b> Biosinteza steroidnih hormonov iz holesterola (13).....	8
<b>Slika 5:</b> Genomsko in negenomsko delovanja steroidnih hormonov (14).....	9
<b>Slika 6:</b> Glavne poti metabolizma kortizola (18).....	10
<b>Slika 7:</b> Klinična slika Cushingovega sindroma (22). .....	14
<b>Slika 8:</b> Klinična slika kronične primarne odpovedi skorje nadledvične žleze - Addisonove bolezni (22).....	17
<b>Slika 9:</b> Porter-Silberjeva reakcija za določanje 17-hidroksisteroidov (12). .....	22
<b>Slika 10:</b> Zimmermannova reakcija za določanje skupnih 17-hidroksisteroidov (12). .....	23
<b>Slika 11:</b> Prikaz števila preiskovancev za meritev 17-OHS v urinu po bolnišnicah v letih 2007 do 2011.....	31
<b>Slika 12:</b> Odstotek preiskovancev glede na potrjeno diagnozo in odstotek kontrolnih preiskovancev.....	32
<b>Slika 13:</b> Prikaz stranskih alifatskih verig steroidnih hormonov na C17, pred in po redukciji z natrijevim borhidridom ( $\text{NaBH}_4$ ) ter oksidaciji z natrijevim bizmutatom ( $\text{NaBiO}_3$ ). A: 17-hidroksiprogesteron, 17-hidroksipregnenolon; B: kortizol, kortizon, 11-deoksikortizol in njihovi tetrahidroderivati; C: pregnantriol in derivati; D: kortol in kortolon (5).....	33
<b>Slika 14:</b> Avtomatska pipeta »Socorex Stepper <sup>TM</sup> 411« (35). .....	34
<b>Slika 15:</b> (a) Zgradba enožarkovnega spektrofotometra. (b) Aparatura Shimadzu UV mini 1240. 35	
<b>Slika 16:</b> Metoda po Norymbersku in Applebyjevi z Zimmermannovo reakcijo za določanje skupnih 17-hidroksisteroidov v urinu (12).....	38
<b>Slika 17:</b> Izmerjene vrednosti 17-OHS v 24-urnem urinu (1.vzorci) pri kontrolnih preiskovancih ter pacientih s Cushingovim sindromom, Addisonovo boleznijo in kongenitalno adrenalno hiperplazijo. Označeni sta spodnja in zgornja meja referenčnega območja za moški in ženski spol. ....	46

## SEZNAM PREGLEDNIC

<b>Preglednica I:</b> Skupine hormonov, ki jih izloča skorja nadledvične žleze. Njihov glavni predstavnik, mesto sinteze in delovanje v organizmu (1). .....	5
<b>Preglednica II:</b> Primerjava urina, slin in krvi kot vzorcev v klinični analitiki steroidnih hormonov (33). .....	29
<b>Preglednica III:</b> Shematični prikaz dela. ....	39
<b>Preglednica IV:</b> Referenčne vrednosti (dU – 17-OH-steroidi, snovna koncentracija) (3). .....	40
<b>Preglednica V:</b> Vrednosti 17-hidroksisteroidov pri bolnikih z Addisonovo boleznijo, njihov spol, starost, bolnišnica, kjer so bili obravnavani, datum sprejema vzorca in referenčno območje glede na spol in starost. ....	43
<b>Preglednica VI:</b> Vrednosti 17-hidroksisteroidov pri bolnikih s Cushingovim sidromom, njihov spol, starost, bolnišnica, kjer so bili obravnavani, datum sprejema vzorca in referenčno območje glede na spol in starost. ....	44
<b>Preglednica VII:</b> Vrednosti 17-hidroksisteroidov pri bolnikih s kongenitalno adrenalno hiperplazijo, njihov spol, starost, bolnišnica, kjer so bili obravnavani, datum sprejema vzorca in referenčno območje glede na spol in starost. ....	45
<b>Preglednica VIII:</b> Vrednosti 17-hidroksisteroidov pri kontrolnih preiskovancih, njihov spol, starost, bolnišnica, kjer so bili obravnavani, datum sprejema vzorca in referenčno območje glede na spol in starost. ....	45
<b>Preglednica IX:</b> Absolutno število in relativni delež preiskovancev z zvišano, znižano ali normalno vrednostjo 17-hidroksisteroidov za vsako skupino posebej in vse skupaj. ....	47
<b>Preglednica X:</b> Številno (n) preiskovancev, povprečna starost $\pm$ standardna deviacija in srednje vrednosti (aritmetična sredina $\pm$ standardna deviacija, mediana) 17-hidroksisteroidov za skupine bolnih in skupino kontrolnih preiskovancev. ....	47
<b>Preglednica XI:</b> Shapiro-Wilk test normalnosti porazdelitve vrednosti 17-hidroksisteroidov za skupine bolnih in skupino kontrolnih preiskovancev. ....	48
<b>Preglednica XII:</b> Opredelitev rezultatov meritev 17-OHS glede na potrjeno ali ovrženo diagnozo bolezni. ....	52
<b>Preglednica XIII:</b> Opredelitev rezultatov meritev 17-OHS glede na potrjeno diagnozo bolezni. ....	53

## POVZETEK

Motnje v delovanju nadledvične žleze so relativno redke, vendar lahko imajo neprepoznane in nezdravljene usodne posledice za življenje bolnika. Bolezni najlažje razdelimo glede na to ali gre za čezmerno ali nezadostno izločanje hormonov.

17-hidroksisterodi (17-OHS) so skupina kortikosteroidov s hidroksilno skupino na položaju C<sub>17</sub> in v največji meri predstavljajo metabolite kortizola. Določamo jih v 24-urnem urinu in tako okvirno sklepamo na celodnevno delovanje skorje nadledvične žleze. Metoda po Norymbersku in Applebyjevi je bila ena od prvih laboratorijskih preiskav v diagnostiki bolezni skorje nadledvične žleze. S to metodo pretvorimo skupne 17-OHS z redukcijo in oksidacijo v 17-ketosteroide (17-KS), ki jih določamo kolorimetrično z Zimmermannovo reakcijo. Analiza se opravi ročno. Celoten delovni postopek traja 3 dni.

V diplomski nalogi smo proučili klinični pomen določanja 17-OHS v dnevnem urinu. Preverili smo ujemanje izmerjenih vrednosti 17-OHS s pričakovanimi glede na potrjeno ali ovrženo diagnozo bolezni skorje nadledvične žleze. Zanimalo nas je, ali so razlike med posameznimi skupinami preiskovancev statistično značilne ( $p < 0,05$ ). Izračunali smo diagnostično občutljivost in specifičnost metode.

V raziskavo smo vključili 49 preiskovancev iz 9 slovenskih bolnišnic, ki smo jim med letoma 2007 in 2011 določili vrednost 17-OHS v dnevnem urinu.

Ugotovili smo, da imajo bolniki s Cushingovim sindromom in Addisonovo boleznijo znižane, bolniki s kongenitalno adrenalno hiperplazijo (KAH) zvišane in kontrolni preiskovanci normalne vrednosti 17-OHS. V nasprotju s pričakovanji so bili rezultati pri Cushingovem sindromu, ker vrednosti 17-OHS niso odstopale navzgor, temveč navzdol. Predstavili smo možne razlage za to stanje. Dokazali smo, da se vrednosti 17-OHS v 24-urnem urinu statistično značilno razlikujejo med bolniki s Cushingovim sindromom, KAH in kontrolnimi preiskovanci. Za vse preiskovance smo izračunali 85% diagnostično občutljivost in 93% specifičnost uporabljene metode. Občutljivost za Cushingov sindrom je znašala 83%, za Addisonovo bolezen 50% in za KAH 100%. Iz rezultatov lahko povzamemo, da je vrednost 17-OHS v 24-urnem urinu dokaj dober diagnostični kazalec.

Opazili smo tudi majhno število naročenih preiskav v petletnem obdobju in dejstvo, da prihajajo vzorci zlasti iz perifernih bolnišnic. Sklepali smo, da se za proučevano preiskavo odloča vedno manj zdravnikov. Pričakujemo, da bodo kolorimetrično metodo kmalu dokončno nadomestile sodobnejše, hitrejše, selektivnejše in natančnejše imunokemijske ter kromatografske metode.



## **ABSTRACT**

Adrenal gland disorders are relatively uncommon, but if unrecognized and untreated, they can have fatal consequences for the patient's life. The diseases can best be classified on the basis of excessive or insufficient secretion of hormones.

17-hydroxysteroids (17-OHS) are corticosteroids determined by hydroxyl group at position C<sub>17</sub> and for the most part these are metabolites of cortisol. They can be measured in the 24-hour urine and provide an integrated assessment of the whole-day adrenocortical function. Method described by Norymberski and Appleby was one of the first laboratory analyses used for the diagnosis of adrenal cortical disorders. Using this method the total 17-OHS are firstly converted into 17-ketosteroids (17-KS) by reduction and oxidation and then measured colorimetrically by the Zimmermann reaction. The analysis is performed manually. The entire laboratory process takes 3 days.

The aim of the diploma thesis was to evaluate the clinical importance of determining the 17-OHS in daily urine. We examined the relation between the determined and expected values of 17-OHS according to the confirmed or refuted diagnosis of adrenal gland disease. The statistical significance of difference in level of 17-OHS among groups of subjects ( $p < 0,05$ ) was analysed. The diagnostic sensitivity and specificity were calculated.

The study included 49 subjects from 9 Slovenian hospitals. They were examined between years 2007 and 2011 to determine the value of 17-OHS in their daily urine.

We established that patients with Cushing's syndrome and Addison's disease show lower values, patients with congenital adrenal hyperplasia (CAH) elevated values, and controls show normal values of 17-OHS. Surprisingly, in patients with Cushing's syndrome, the 17-OHS levels deviated downward and not upward as expected. A possible explanation of this situation was presented. We demonstrated significant statistical difference in levels of 17-OHS between patients with Cushing's syndrome, CAH and controls. We calculated the 85% sensitivity and 93% specificity of the method used referring to the total number of subjects. Separately, the sensitivity for Cushing's syndrome was 83%, 50% for Addison's disease, and 100% for CAH. The conclusion was drawn that the values of 17-OHS in the 24-hour urine can be accepted as a quite reliable diagnostic indicator. A small number of tests ordered was noticed along with the fact that most samples came from peripheral hospitals. The conclusion was reached that less and less physicians decide to order the studied investigation. It is expected that the colorimetric method will soon be completely replaced by faster and more accurate immunoassays and chromatographic methods.

## SEZNAM OKRAJŠAV

17-OHS	17-hidroksisteroidi
17-OHKS	17-hidroksikortikosteroidi
17-KGS	17-ketogeni steroidi
17-KS	17-ketosteroidi
17-OHP	17-hidroksiprogesteron
ACTH	adrenokortikotropni hormon
ADH	antidiuretični hormon
AVP	arginin vazopresin
CBG	vezavni protein za kortizol (angl. <i>cortisol binding globulin</i> )
DMT	deksametazon
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dU	dnevni urin
EIA	encimski imunski test (angl. <i>enzyme immunoassay</i> )
ELISA	encimski imunski test na trdnem nosilcu (angl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
FIA	imunofluorescenčni test (angl. <i>fluorescence immunoassay</i> )
GC	plinska kromatografija (angl. <i>gas chromatography</i> )
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. <i>high performance liquid chromatography</i> )
HRE	hormonsko odziven element (angl. <i>hormone response element</i> )
HSD	hidroksisteroid dehidrogenaza
ITT	inzulinski tolerančni test
KAH	kongenitalna adrenalna hiperplazija
LC	tekočinska kromatografija (angl. <i>liquid chromatography</i> )
LH	luteinizirajoči hormon
LIA	luminiscenčni imunski test (angl. <i>luminescence immunoassay</i> )
Mb.	bolezen (lat. <i>morbis</i> )
mRNK	informacijska ribonukleinska kislina
MS	masna spektrometrija
MSH	melanocyte stimulirajoči hormon
nM	nanomolarna koncentracija

POMC	proopiomelanokortin
PRL	prolaktin
RIA	radioimunski test (angl. <i>radioimmunoassay</i> )
SFC	prosti kortizol v slini (angl. <i>salivary free cortisol</i> )
STH	rastni hormon, somatotropni hormon
THE	tetrahidrokortizon
THF	tetrahidrokortizol
a-THF	alo-tetrahidrokortizol
THS	11-deoksitetrahidrokortizol
TSH	ščitnico stimulirajoči hormon
UFC	prosti kortizol v urinu (angl. <i>urinary free cortisol</i> )

## SEZNAM TRIVIALNIH IMEN STEROIDOV

IME STEROIDA	TRIVIALNO IME
4-pregnen-11 $\beta$ ,21-diol-3,18,20-trion	aldosteron
5-androsten-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol	androstendiol
4-androsten-13,17-dion	androstendion
5-androsten-3 $\beta$ -ol-17-on	dehidroepiandrosteron
4-pregnen-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-triol-3,20-dion	kortizol
4-pregnen-17 $\alpha$ ,21-diol-3,20-dion	11-deoksikortizol
4-pregnen-17 $\alpha$ ,21-diol-3,11,20-trion	kortizon
4-pregnen-11 $\beta$ ,21-diol-3,20-dion	kortikosteron
4-pregnen-21-ol-3,20-dion	11-deoksikortikosteron
5-pregnen-3 $\beta$ -ol-20-on	pregnenolon
5-pregnen-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol-20-on	17-hidroksipregnenolon
4-pregnen-3,20-dion	progesteron
4-pregnen-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol-20-on	17-hidroksiprogesteron

# 1 UVOD

Ena od lastnosti večceličnih organizmov je, da imajo diferencirana tkiva, ki s svojimi funkcijami omogočijo preživetje organizma. Za to so potrebni mehanizmi medceličnega komuniciranja. Za usklajevanje medsebojnih reakcij sta se razvila dva sistema. Prvi je živčni sistem, pri katerem se signali prenašajo po živcih, drugi pa je endokrini sistem, v katerem so prenašalci signalov hormoni (1). Hipotalamus in hipofiza tvorita funkcionalno enoto, ki povezuje živčni in endokrini sistem v t. i. nevroendokrini sistem. Oba integracijska sistema usklajujeta delovanje posameznih organov, zagotavljata dinamično ravnovesje in stalnost notranjega celičnega okolja ter skrbita za rast, dozorevanje in razmnoževanje organizma (2,3).

Endokrinologija se je do leta 1950 ukvarjala predvsem z opazovanjem in opisovanjem kliničnih slik čezmernega ali pomanjkljivega delovanja endokrinih žlez. Popoln je opis klinične slike odpovedi skorje nadledvične žleze, ki jo je leta 1856 podal Thomas Addison. Čeprav so bili zdravniki ves čas dobri opazovalci, je vzrok za nastanek večine endokrinih bolezni ostal neznan vse do razmaha biokemije v letih 1930-1960 (4).

J. K. Norymberski s sod. je leta 1953 razvil analizni postopek za določanje skupine metabolitov hormonov skorje nadledvične žleze v urinu, t.i. skupnih 17-hidroksisteroidov (5), ki se v modificirani obliki še danes uporablja v Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo (KIKKB) v Ljubljani.

## 1.1 ENDOKRINI SISTEM

Endokrini sistem sestavljajo endokrine žleze in po različnih tkivih razpršene endokrine celice, ki z izločanjem hormonov uravnavajo rast, razvoj, razmnoževanje, prilagajanje na stres in presnovne aktivnosti organizma (2,3). Glavni organi endokrinega sistema so hipofiza, češarika, ščitnica, obščitnice, nadledvični žlezi, Langerhansovi otočki trebušne slinavke, moda in jajčnika. Hipofizo imenujemo tudi nadrejena žleza, saj usmerja delovanje mnogih drugih endokrinih žlez.

Endokrini sistem vsebuje enote za proizvodnjo prenašalcev signalov (endokrine celice in endokrine nevrone), prenašalce signalov (kemične glasnike - hormone) ter prejemnike (celice različnih tkiv, ki vsebujejo ustrezne receptorje) (3).

### 1.1.1 HORMONI

Hormoni so specializirane kemične snovi, ki uravnavajo delovanje sosednjih ali oddaljenih celic (1,2). Klasično endokrino pojmovanje delovanja hormonov je, da se hormon tvori v eni celici, se izloči in potuje po krvnem obtoku do ciljnega organa, kjer sproži za določen hormon značilen učinek. Danes poznamo tudi intrakrino, avtokrino in parakrino delovanje hormonov. Iz primarnih steroidogenih tkiv se hormoni sproščajo v medcelični prostor in delujejo na iste endokrine celice, ki so hormon izločile (avtokrino delovanje) ter na celice v neposredni okolici endokrinih celic (parakrino delovanje). V primeru, da hormon deluje v isti celici, kjer je nastal, brez sprostitev v zunajcelični prostor, govorimo o intrakrinem delovanju. Hormoni delujejo na celice preko vezave na specifične receptorje, ki imajo do določenih hormonov veliko afiniteto in majhno kapaciteto. Tako je možen natančen in specifičen odgovor ciljne celice na manjše količine hormonov. Hkrati je v krvi več hormonov, ki lahko sočasno delujejo na isto tkivo ali celico. V primerjavi z živčnim sistemom je vpliv hormonov počasnejši in dolgotrajnejši (3,6).

Hormone po kemijski zgradbi uvrščamo v več skupin:

- steroidni hormoni (aldosteron, kortizol, estradiol, progesteron, testosteron...),
- aminokislinski hormoni in amini (adrenalin, noradrenalin, tiroksin, trijodtironin),
- peptidni (adrenokortikotropni hormon, angiotenzin, holecistokinin, eritropoetin, gastrin, inzulin, oksitocin, parathormon, antidiuretični hormon, prolaktin...),
- proteinski hormoni (folikle stimulirajoči hormon, luteotropni hormon...) (1).

Od kemične narave hormonov je odvisen način prenosa po krvi. Steroidni in ščitnični hormoni so topni v maščobah in slabo topni v krvni plazmi, zato se prenašajo po krvi skoraj v celoti vezani na plazemske beljakovine. Hormon, ki je vezan na beljakovino, ne more vstopiti v celico in je biološko neaktiven. Peptidni hormoni in kateholamini so v vodi topni, zato se prosto prenašajo po krvi (2,3).

Obstajata dva mehanizma delovanja hormona na tarčne celice. Nekateri hormoni (peptidi in kateholamini) se vežejo na receptorje v membrani tarčne celice, od kjer učinek v citoplazmo prenesejo celični prenašalci, ki v njej sprožijo kaskado biokemijskih procesov. Po drugem mehanizmu vstopajo hormoni (ščitnični in steroidni hormoni) skozi celično membrano in se vežejo na receptorje v citoplazmi ali v jedru tarčne celice. Kompleks hormon-receptor se veže na DNK in spodbuja oziroma zavira izražanje specifičnih genov (3).

## 1.2 HIPOTALAMUS IN HIPOFIZA

Hipotalamus je majhno območje na možganski bazi, ki leži tik nad hipofizo in je s številnimi živčnimi potmi povezan z drugimi deli osrednjega živčnega sistema in tako pod nadzorom višjih možganskih centrov. Poleg endokrinih funkcij uravnava hipotalamus številne neendokrine homeostatske in fiziološke funkcije, kot so uživanje hrane in tekočine, vpliva na ritem budnosti in spanja, uravnava telesno temperaturo, cirkadiane ritme in delovanje avtonomnega živčevja. Določeni centri so odgovorni za čustva, drugi pa sodelujejo pri višjih miselnih funkcijah. Poglavitna usklajevalna naloga hipotalamusa je neuroendokrino uravnavanje hipofiznih hormonov (3,4).

Hipofiza ali možganski privesek je endokrini žleza, ki je nadrejena nekaterim perifernim žlezam. Sestavljena je iz dveh režnjev: sprednji ali anteriorni reženj (adenohipofiza) in zadnji ali posteriorni reženj (nevrohipofiza) (3,4).

### 1.2.1 MEHANIZEM POV RATNE ZVEZE

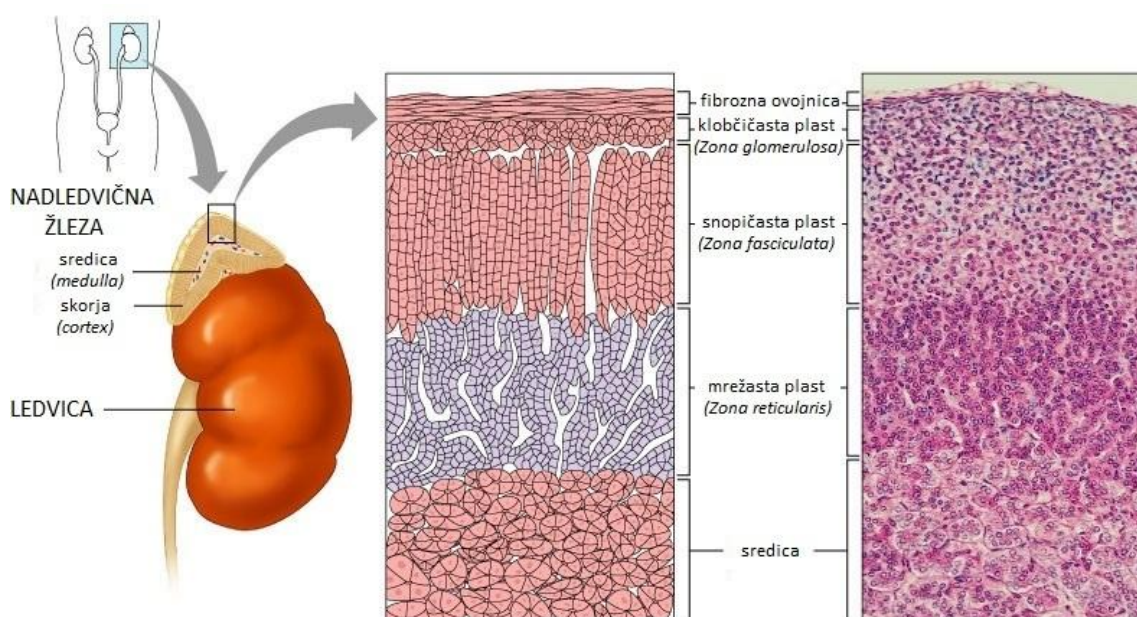
Osnovni kontrolni mehanizem delovanja hormonov je t.i. povratna zveza ali zanka. Hormoni sami ali s svojim presnovnimi učinki v povratnih zvezah uravnavajo lastne regulacijske mehanizme in tako se prepreči premajhno ali čezmerno izločanje hormonov.

Poznamo redko, pozitivno in veliko bolj pogosto negativno povratno zvezo. Primer povratne zanke je kontrola izločanja hormonov na osi hipotalamus-hipofiza-periferna žleza (1). V nevronih hipotalamusa se tvorijo regulacijski sproščujoči (-liberini) ali zavirajoči (-statini) hormoni, ki potujejo do mediane eminence. Tam so skladiščeni, dokler ne pride impulz, da se sprostijo v hipofizni portalni sistem ter vstopajo v kapilarni pletež prednjega režnja hipofize. Tako dosežejo receptorje na celičnih membranah adenohipofize in sprožijo izločanje in tvorbo specifičnih tropnih hormonov (ščitnico spodbujajoči hormon (TSH), adrenokortikotropin (ACTH), luteinizirajoči hormon (LH), folikle stimulirajoči hormon (FSH)). Ti delujejo na podrejene periferne žleze (ščitnica, nadledvična žleza, spolne žleze) in sprožijo izločanje perifernih hormonov, ki v povratni zvezi zavrejo izločanje hormonov adenohipofize in hipotalamusa (3). Rastni hormon (STH) in prolaktin (PRL) iz adenohipofize nimata ciljnih žlez, ampak delujeta na številna tkiva v organizmu, ki imajo ustrezne receptorje (4).

### 1.3 NADLEDVIČNA ŽLEZA

Nadledvični žlezi sta paren organ in ležita nad zgornjima poloma ledvic v višini enajstega prsnega vretenca do prvega ledvenega vretenca. Vsaka žleza tehta v povprečju 4 do 5 g, desna je običajno bolj piramidne oblike, leva bolj polmesečasta. Žlezi sta sestavljeni iz skorje (lat. *cortex*) in sredice (lat. *medulla*), ki sta različnega izvora in imata različne funkcije. Skorja predstavlja 90% žlezne mase in je prostor sinteze steroidnih hormonov. Sredico sestavljajo kromafine celice, ki izločajo kateholamine, adrenalin in noradrenalin. Nadledvični žlezi sta glede na svojo velikost med najbolj prekrvljenimi organi (3).

Skorjo nadledvičnih žlez sestavljajo tri plasti (slika 1), ki izločajo tri skupine steroidnih hormonov (preglednica I), skupaj okoli 50 različnih hormonov, če prištejemo intermediate in metabolite. **Klobčičasta plast (Zona glomerulosa)** je zunanja plast in izloča mineralokortikoide, ki uravnavajo zunajcelično ravnotežje natrija in kalija. Srednja ali **snopičasta plast (Zona fasciculata)** je najširša plast skorje in izloča glukokortikoide, ki uravnavajo predvsem metabolizem ogljikovih hidratov. **Mrežasta plast (Zona reticularis)** predstavlja najbolj notranjo plast. Tvorijo pretežno androgene in majhne količine glukokortikoidov (1-3). Celice endokrinih tkiv, kjer poteka steroidogeneza, so morfološko zaznamovane s številnimi maščobnimi kapljicami, v katerih je holesterol, in s številnimi mitohondriji ter gladkim endoplazemskim retikulumom (4).



Slika 1: Anatomija in histologija nadledvične žleze (7).

**Preglednica I:** Skupine hormonov, ki jih izloča skorja nadledvične žleze. Njihov glavni predstavnik, mesto sinteze in delovanje v organizmu (1).

SKUPINA HORMONOV	GLAVNI PREDSTAVNIK	MESTO SINTEZE	DELOVANJE
glukokortikoidi (C-21 steroidi)	kortizol	snopičasta plast	prilagoditev na stres; uravnavanje koncentracije glukoze v krvi, spodbujanje glukoneogeneze, razgradnja mišičnih beljakovin; protivnetne delovanje; vpliv na rast, krvni tlak
mineralokortikoidi (C-21 steroidi)	aldosteron	klobčičasta plast	uravnavanje koncentracije natrijevih in kalijevih ionov v krvni plazmi – reabsorpcija natrija in izločanje kalija v ledvicah, povečana reabsorpcija natrija iz znoja in slin ter absorpcija natrija iz črevesja; zvišuje krvni tlak in regulira volumen telesnih tekočin
spolni hormoni (C-19 steroidi)	dehidroepiandrosteron - DHEA	mrežasta plast	šibek androgen; različni zaščitni učinki; lahko se pretvori v estrogene; zanj še niso našli receptorja

### 1.3.1 HIPOTALAMO-HIPOFIZNO-NADLEDVIČNA OS

Začetek hipotalamo-hipofizno-nadledvične osi (slika 2) je v paraventricularnem jedru hipotalamusa, kjer se sintetizirata kortikoliberin oziroma kortikotropin sproščujoči hormon (CRH) in arginin-vazopresin (AVP). Peptida po aksonih potujeta v mediano eminenco in od tam po hipofiznem portalnem obtoku dosežeta sprednji reženj hipofize. Pod njunim vplivom se v adenohipofiznih kortikotropnih celicah sintetizira proopimelanokortin (POMC), ki se nato razgradi v podenote, kot so  $\beta$ -lipoprotein,  $\beta$ -endorfin, melanocyte stimulirajoči hormon (MSH) in adrenokortikotropni hormon (ACTH). Pod vplivom ACTH nastaja v skorji nadledvične žleze predvsem kortizol, v manjši meri ACTH vpliva tudi na nastajanje androgenih hormonov nadledvične žleze in na sintezo aldosteron (3).

Hipotalamo-hipofizno-nadledvični sistem ima v svojem delovanju tri prepletajoče se značilnosti (slika 2):

- *Dnevno-nočni ritem*

Ob normalni dnevno-nočni aktivnosti so koncentracije ACTH in kortizola najvišje v jutranjih urah, podnevi pa upadajo in dosežejo najnižje vrednosti med spanjem kmalu po polnoči. Končna skupna pot uravnavanja dnevno-nočnega ritma je CRH, katerega izločanje je pod vplivom hipotalamičnih in centralno živčnih impulzov (4). Jutranje vrednosti kortizola so lahko tudi trikrat večje od popoldanskih oz. nočnih (1).

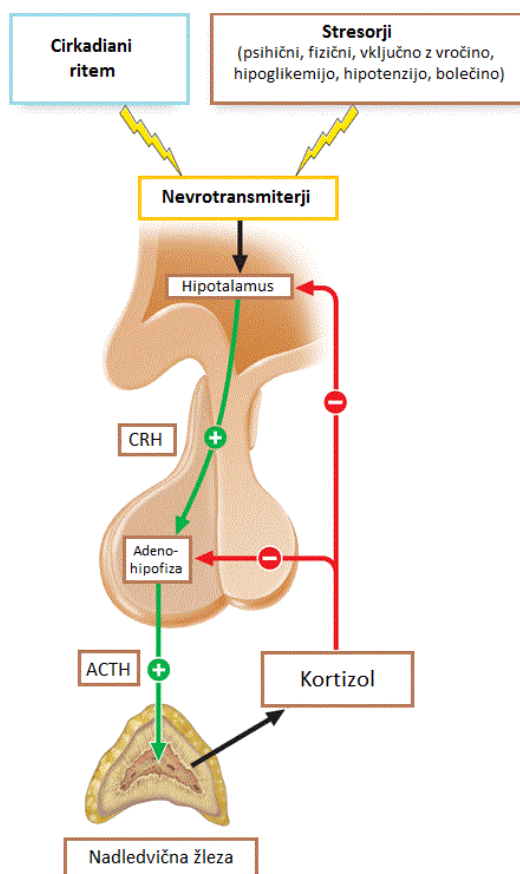


- *Negativna povratna zveza*

Kortizol vpliva na izločanje CRH in ACTH ter s tem na lastno izločanje. Ločimo hitro fazo povratne zveze, ki je odvisna od hitrosti spremembe koncentracije kortizola. Ta zavora je prehodna, deluje takoj in je posledica delovanja glukokortikoidov na membrano celic, ki sproščajo ACTH, morda tudi CRH. Zakasnela faza negativne povratne zveze pa je odvisna tudi od doze in je posledica klasičnega delovanja glukokortikoidov na celice ACTH in CRH preko zmanjšane sinteze glasnika RNK (mRNK) (4).

- *Stresna aktivacija*

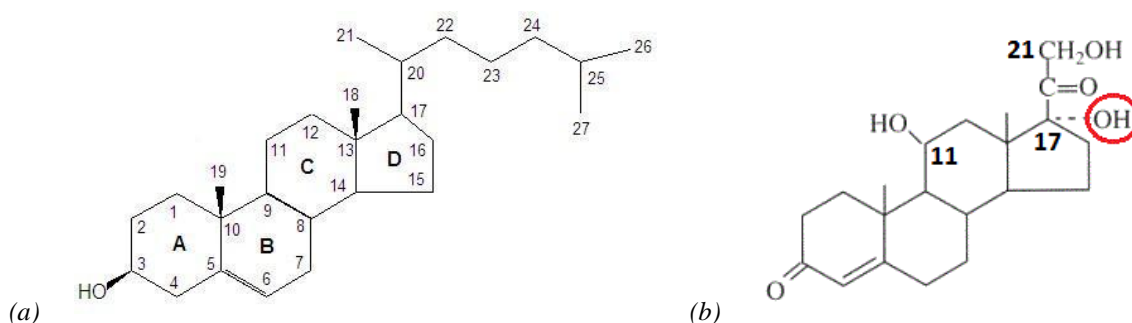
Močan stres, ki ga lahko ponazorimo s hipoglikemijo, sproži izločanje CRH, ACTH in kortizola pod vplivom višjih centrov. Ta aktivacija nadvlada dnevno-nočni ritem, moč pa jo je zmanjšati s predhodnimi visokimi dozami glukokortikoidov. Neposredno ali posredno pripomorejo k večjemu sproščanju in učinkovitosti CRH v stresnih situacijah tudi AVP, katecholamini in še nekateri drugi sekretagogi (npr.  $\alpha$ -endorfin) (4).



Slika 2: Hipotalamo-hipofizno-nadledvična os (8).

## 1.4 KORTIZOL in OSTALI 17-HIDROKSISTEROIDI

Steroidi so skupina organskih spojin. Vsi imajo značilen sistem kondenziranih obročev (ciklopentanoperhidrofenantren), sestavljen iz treh šestčlenskih obročev, označenih s črkami A, B, C, in enega petčlenskega obroča, ki je označen s črko D. Ogljikovi atomi v steroidnem skeletu so oštevilčeni od 1 do 27 (slika 3a). Pri različnih steroidih se sistemi obročev razlikujejo po številu in položaju dvojnih vezi, stranski verigi in številu ter vrsti funkcionalnih skupin (9).



**Slika 3:** (a) Steroidni skelet z oštevilčenimi atomi ogljika in oznakami obročev na primeru holesterola (10).  
(b) Strukturna formula kortizola (rdeče je obkrožena 17-hidroksilna skupina) (11).

**Kortizol** je najpomembnejši glukokortikoid skorje nadledvične žleze. Glukokortikoide glede na število C-atomov označujemo tudi kot C-21 steroide (4). Zanje je značilna še hidroksilna ali ketonska skupina na C<sub>11</sub> položaju in hidroksilna skupina na C<sub>17</sub> položaju (slika 3b).

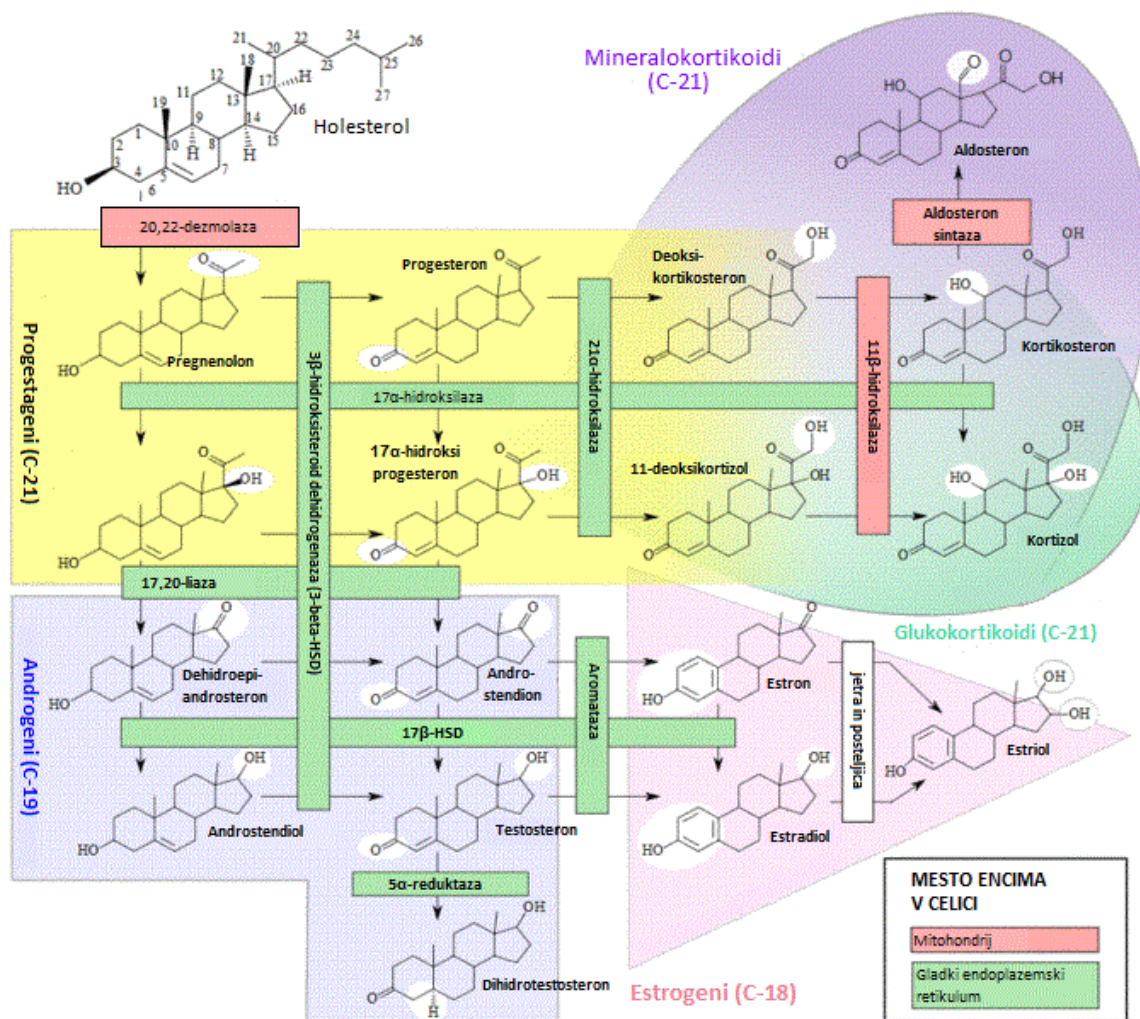
**17-hidroksisteroidi** so kortikosteroidi, za katere je značilna hidroksilna skupina na položaju C<sub>17</sub>. Določamo jih v dnevnem urinu in v največji meri predstavljajo metabolite kortizola.

### 1.4.1 BIOSINTEZA KORTIZOLA

Izhodna spojina za sintezo vseh steroidnih hormonov je holesterol. Hitrost tvorbe kortizola je odvisna od sinteze in aktivacije encimov, ki so udeleženi v njegovi biosintezi. Začetna spodbuda za tvorbo kortizola je vezava ACTH na receptorje v celični membrani (4).

Prva, odločilna in hitrost omejujoča stopnja pri sintezi kortizola je pretvorba holesterola v pregnenolon. Ta konverzija se dogaja v mitohondrijih pod vplivom encimskega kompleksa citokrom P450<sub>sc</sub> (angl. *side chain cleavage*), ki povzroči dvojno hidroksilacijo na mestih

C<sub>20</sub> in C<sub>22</sub> ter cepitev dela stranske verige na položaju C<sub>20-22</sub> (20,22-dezmozolaza). Nato encim 3β-hidroksisteroid dehidrogenaza (3β-HSD) v dveh korakih pretvori pregnenolon v progesteron (1). Iz progesterona po 17α-hidroksilaciji nastane 17α-hidroksiprogesteron. Ta se nato z encimom 21α-hidroksilaza pretvori v 11-deoksikortizol (spojina S). Zadnja reakcija je hidroksilacija C<sub>11</sub> atoma steroidnega obroča, ki jo katalizira encim 11β-hidroksilaza (slika 4) (1). Kortizol (spojina F) se lahko pretvori v kortizon (spojina E), ki ima na mestu C<sub>11</sub> ketonsko skupino.



Slika 4: Biosinteza steroidnih hormonov iz holesterola (13).

#### 1.4.2 PLAZEMSKI PRENOS STEROIDNIH HORMOV

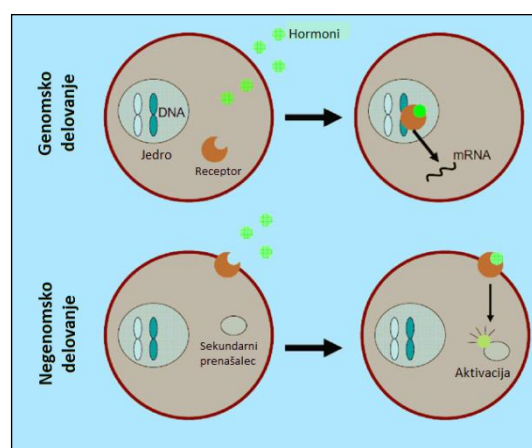
Steroidni hormoni se v celici ne kopičijo. Takoj po sintezi se sproščajo v kri, kjer se nahajajo prosti ali vezani na prenašalne beljakovine. Biološko aktivna je samo prosta oblika hormona, vezani hormoni so zaloga hormonov (3).

Kortizola je v plazmi prostega le okoli 10%, preostala količina je specifično vezana na kortizol vezoči globulin (angl. *cortisol binding globulin* – CBG), imenovan tudi transkortin (80%), in v manjši meri nespecifično na albumin (10%). Koncentracija transkortina je odvisna od mnogih dejavnikov, med katerimi so najpomembnejši estrogini (4). Razpolovna doba prostega kortizola v plazmi je okoli 90 minut (12).

### 1.4.3 MEHANIZEM DELOVANJA STEROIDNIH HORMONOV

Mehanizem delovanja je enak pri vseh steroidnih hormonih. Kljub nizkim koncentracijam v krvi (0,1-1,0 nM) so njihovi fiziološki učinki zelo močni. Zaradi njihove lipofilnosti zlahka prehajajo membrano in se vežejo na znotrajcelične receptorje.

Do nedavnega je veljalo, da steroidni hormoni učinkujejo počasneje, saj vplivajo na izražanje genov (1). Danes pa je znano, da ob vezavi na specifične membranske receptorje steroidni hormoni lahko izzovejo tudi hitre, nengenomske učinke (slika 5) (15).



Slika 5: Genomsko in nengenomsko delovanja steroidnih hormonov (14).

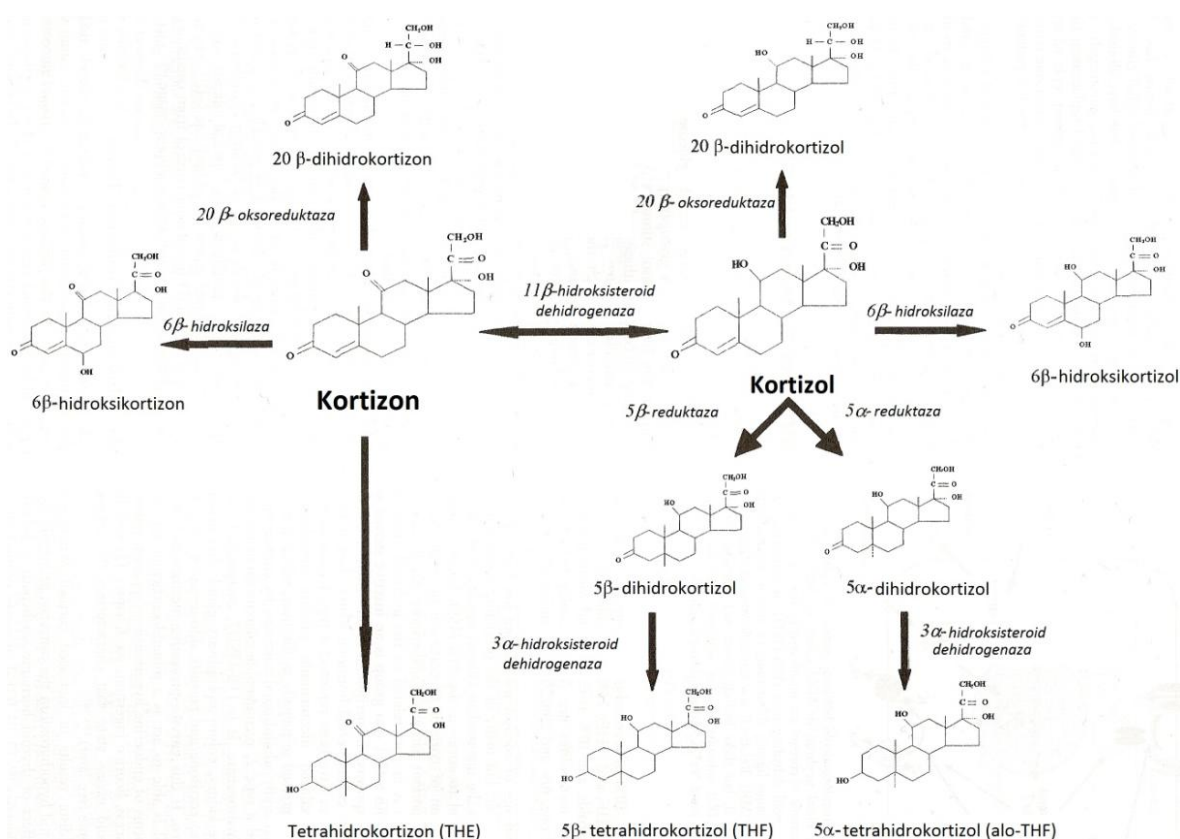
#### 1.4.3.1 Delovanje steroidnih hormonov preko jedrnih receptorjev

Prosti steroidi lahko prehajajo celično membrano in tako vstopijo v tarčno celico. V citosolu se nahajajo steroidni receptorji, ki imajo do steroidov visoko afiniteto. Po vezavi nanje poteče dimerizacija dveh receptorjev in translokacija v jedro. Dimerni kompleks se nato veže na za steroide odzivna mesta na DNK molekuli (angl. *HRE* – *hormone response elements*) in deluje kot transkripcijski faktor. Poteče prepisovanje tarčnega gena in tvorba mRNK. Nato v citoplazmi poteče translacija mRNK in sinteza novega proteina. Nastali proteini (npr. encimi, receptorji) so posledica hormonskega odziva telesa na različne fiziološke ali patofiziološke procese. Kljub enakemu mehanizmu delovanja vseh skupin steroidnih hormonov se zaradi specifičnosti steroidnih receptorjev izražajo različni geni in sintetizirajo različni proteini (6,15).

#### 1.4.4 METABOLIZEM IN IZLOČANJE KORTIZOLA

Kortizol se pri zdravih v manjši meri (<1%, 100 nM) izloča nespremenjen z urinom. Več kot 95% kortizola se pred izločanjem konjugira v jetrih, manjši del konjugacije poteče v ledvicah in prebavnem traktu. Konjugirani presnovki se lažje izločijo s sečem ali z žolčem, saj se jim s konjugacijo poveča topnost v vodi (16-18).

Jetrna presnova kortizola in ostalih steroidov vključuje številne encimske pretvorbe, od katerih je najpomembnejša redukcija dvojne vezi na mestu C<sub>4-5</sub>. Produkt te reakcije je dihidrokortizol, ki se nato s 3 $\alpha$ -hidroksisteroid dehidrogenazo (3 $\alpha$ -HSD) pretvori v tetrahidrokortizol (THF in alo-THF). Interkonverzijo biološko aktivnega kortizola v neaktivni kortizon ter obratno katalizirata dva izoencima 11 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze (11 $\beta$ -HSD) (18). 11 $\beta$ -HSD se nahaja zlasti v ledvicah, kjer prepreči mineralokortikoidno delovanje kortizola (12). Kortizon se nato v jetrih metabolizira do tetrahidrokortizona (THE). THF in THE predstavljata glavni način (50%) izločanja kortizola iz telesa. 30% metabolitov kortizola v urinu predstavljata kortol in kortolon, ki nastaneta s hidrogenacijo keto skupine na položaju C 20. V manjši meri se kortizol presnavlja po drugih poteh (npr. 6-hidroksikortizol) (slika 6) (4,12,17).



**Slika 6:** Glavne poti metabolizma kortizola (18).

V drugi fazi metabolizma poteče konjugacija z glukuronsko kislino (približno 60%) ali sulfatom (približno 35%) na položaju 3-hidroksilne skupine. Ti produkti se kot glukuronidi oz. sulfati izločajo z urinom. Tvorijo večino substrata pri določanju 17-hidroksisteroidov v urinu, ki pa zaradi možnosti selektivnejših določanj kortizola v plazmi in urinu izgublja na pomenu (4,16).

#### **1.4.4.1 Opredelitev skupin metabolitov kortizola in ostalih steroidnih hormonov, ki jih določamo v urinu**

**17-hidroksisteroidi (17-OHS)** oziroma **17-hidroksikortikosteroidi (17-OHKS)** imajo 17,21-dihidroksi-20-keto (dihidroksiacetonsko) stransko skupino. Določamo jih kolorimetrično s Porter-Silberjevo metodo. Okoli 80% vseh 17-OHS je metabolitov kortizola, ostali delež pripada kortizonu in 11-deoksikortizolu (17,19).

**Skupni 17-hidroksisteroidi** (angl. *total 17-hydroxycorticosteroids, 17-OHCS*) imajo v molekularni strukturi na položaju C<sub>17</sub> hidroksilno skupino. Predstavljajo predvsem metabolite glukokortikoidov. Z metodo po Norymbersku in Applebyjevi jih z redukcijo in oksidacijo pretvorimo v 17-ketosteroide, ki jih določamo kolorimetrično z Zimmermannovo reakcijo.

Obstajajo štiri skupine skupnih 17-hidroksisteroidov:

- skupina I (17-OHS): kortizol, kortizon, 11-deoksikortizol in njihovi tetrahydroderivati THF, a-THF, THE, THS,
- skupina II: kortoli in kortoloni,
- skupina III: pregnantriol in 11-hidroksi derivati,
- skupina IV: 17-hidroksiprogesteron in 17-hidroksipregnenolon (12).

V literaturi pogosto zasledimo termin **17-ketogeni steroidi (17-KGS, 17-oksogeni steroidi)**, katerega uporaba ni poenotena. Nekateri avtorji ga uporabljajo kot sopomenko za skupne 17-hidroksisteroide (12), drugi pa ožje za prve tri skupine skupnih 17-hidroksisteroidov (5). Različna poimenovanja so nastajala v času razvoja in modificiranja omenjene metode za določanje skupnih 17- hidroksisteroidov v urinu.

**17-ketosteroidi (17-KS, 17-oksosteroidi)** so steroidi, za katere je značilna keto skupina na mestu C<sub>17</sub>. Predstavljajo zlasti presnovke androgenih hormonov nadledvične žleze (19). Določamo jih kolorimetrično z Zimmermannovo reakcijo.

#### 1.4.5 BIOLOŠKI UČINKI KORTIZOLA

Vsaj 95% aktivnosti glukokortikoidov nastopa kot posledica delovanja kortizola (12). Običajno najdemo opise glukokortikoidnih učinkov, ki so posledica čezmernih nefizioloških količin glukokortikoidov in jih večinoma ne moremo enačiti z njihovim delovanjem v uravnovešenih zdravih organizmih. Glukokortikoidne receptorje najdemo praktično v celicah vseh tkiv, kar je v skladu z njihovim razprostranjenim delovanjem.

Vendar lahko »normalne« učinke podamo le opisno in so v celoti permisivne narave:

- presnovni: zagotavljanja uravnovešenega metabolizma ogljikovih hidratov, maščob in beljakovin, vzdrževanje energetskega ravnotežja;
- prilagoditev organizma na stres;
- pogojevanje normalnega delovanja ledvic z zagotavljanjem ustreznega glomerularnega pretoka in učinkovanja antidiuretičnega hormona;
- permisivno delovanje na reaktivnost žilja na kateholamine, vzdrževanje krvnega tlaka;
- zagotavljanje omejenosti vnetnih in alergičnih reakcij (4).

Najbolj znan učinek kortizola je **stimulacija glukoneogeneze** v jetrih. Kortizol povzroči tudi zmanjšanje hitrosti porabe glukoze v večini telesnih celic. Oba učinka skupaj povzročita porast koncentracije glukoze v krvi, kar stimulira izločanje inzulina. Visoke koncentracije glukokortikoidov povzročajo odpornost mnogih tkiv za učinek inzulina, t.i. inzulinsko rezistenco, zato inzulin nima običajnega učinka na vzdrževanje nivoja glukoze, kot v navadnih pogojih (3,20). Govorimo o adrenalnem oziroma steroidnem diabetesu.

Eden od osnovnih učinkov kortizola na sistemski metabolizem je **zmanjšanje beljakovinskih zalog** v vseh telesnih celicah, razen v jetrnih. Do tega pride zaradi zmanjšane sinteze beljakovin v ekstrahepatičnih tkivih in obenem povišanega katabolizma proteinov, ki so že v celicah. Aminokisliline se sproščajo iz teh tkiv in transportirajo v jetra, zato se proteini v jetrih povišajo (tudi plazemski proteini) (3,20).

Kortizol je pomemben tudi v **metabolizmu maščob**, saj v času stradanja in hujšanja pospešuje lipolizo, zvišuje koncentracijo maščobnih kislin v plazmi ter pospešuje njihovo oksidacijo v celicah za pridobivanje energije. Kortizol obenem stimulira lipogenezo v določenih tkivih (20).

Kortizol deluje **protivnetno in imunosupresijsko**, kar pogosto izkoriščamo v terapevtske namene. Sicer ne ozdravi samega bolezenskega stanja, preprečuje pa nadaljnje poškodbe zaradi procesa vnetja. Kortizol sproži protivnetne učinke na dva načina: zavre sintezo

vnetnih mediatorjev in proliferacijo vnetnih celic ter stimulira sintezo protivnetnih mediatorjev (lipokortini) (20).

## 1.5 MOTNJE V DELOVANJU SKORJE NADLEDVIČNE ŽLEZE

### 1.5.1 HIPERFUNKCIJA SKORJE NADLEDVIČNE ŽLEZE - Cushingov sindrom

Cushingov sindrom je opredeljen kot skupek klinično-laboratorijskih znakov, ki so posledica delovanja čezmernih in neustreznih količin glukokortikoidov (3,4).

Najpogostejša oblika Cushingovega sindroma je **iatrogeni (eksogeni) Cushingov sindrom**, ki je posledica uporabe sintetičnih glukokortikoidov v terapevtske namene.

**Endogeni (neiatrogeni) Cushingov sindrom** se pojavlja relativno redko, incidenca znaša okoli 5 - 6 primerov/1.000.000 prebivalcev/leto. Najpogosteje nastopi med 30. in 50. letom starosti. Bolezen je pogostejša pri ženskah (3). V grobem ga delimo v dve skupini: od ACTH odvisni in od ACTH neodvisni Cushingov sindrom.

**Psevdo-Cushingov sindrom** je stanje, ko ima bolnik le nekatere klinično-laboratorijske znake Cushingovega sindroma. Lahko se pokaže pri depresiji, debelosti, kroničnem alkoholizmu, motnjah hranjenja.

#### 1.5.1.1 Od ACTH odvisni Cushingov sindrom

Pri oblikah odvisnih od ACTH privede kronično čezmerno sproščanje ACTH do obojestranske hiperplazije skorje nadledvične žleze ter povišanega nivoja kortizola.

ACTH se lahko izloča iz adenoma hipofize (centralni Cushingov sindrom, Cushingova bolezen oz. Mb. Cushing v ožjem pomenu besede), ki je vzrok okoli 65% endogenih Cushingovih sindromov. Pri 10-15% bolnikov pa gre za paraneoplastični sindrom, kjer je izvor ACTH ektopičen v tumorju zunaj hipotalamo-hipofiznega območja (karcinom pljuč, karcinom trebušne slinavke, timom, karcinoid itd.) (3,4).

Zaradi neurejene in naključne hipersekrecije ACTH nivo kortizola v plazmi niha in je lahko v določenem času tudi normalen, pri 24-urnem zbiranju urina pa opazimo povečano izločanje kortizola (3,17).



### 1.5.1.2 Od ACTH neodvisni Cushingov sindrom

Pri ACTH neodvisnih oblikah je primarni patološki proces v sami skorji nadledvične žleze (adenom, redkeje karcinom). Takih je okoli 25% bolnikov. Avtonomno izločanje kortizola zavre sproščanje ACTH s posledično atrofijo skorje zdrave nadledvične žleze (3).

### 1.5.1.3 Klinična slika

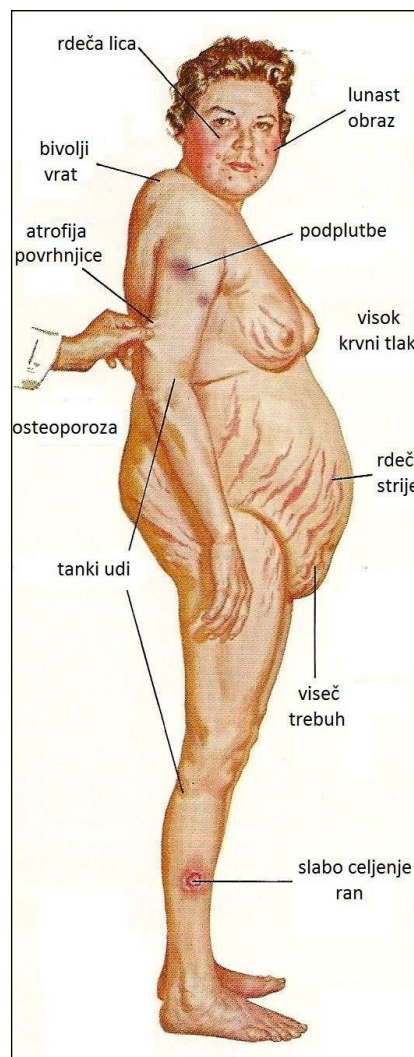
Klinična slika je lahko izražena zelo različno. Tipična je prerazporeditev maščevja na trup s tankimi udi (centripetalna debelost, mišična atrofija), okrogel lunast obraz (facies lunata), bolnice so prekomerno poraščene (hirsutizem) s frontalnim redčenjem las. Pojavijo se mišična slabost, kožne podplutbe, visok krvni tlak in sladkorna bolezen. Značilni simptomi in znaki so tudi akne, rdečica obraza, izguba libida in potence pri moških ter motnje menstrualnega ciklusa (oligoamenoreja) pri ženskah.

Zaradi osteoporoze aksialnega skeleta so možni zlomi vretenc in bolečine v križu.

Pri pregledu lahko ugotovimo še nabiranje maščobe zadaj na vratu (»bivolja grba«) in v nadključničnih jamah, vijolične strije, slabo celjenje ran, atrofijo kože, pretibialne edeme.

Psihične spremembe imajo širok razpon od čustvene labilnosti, povečane razdražljivosti vse do psihotičnih stanj in hudih depresij (3,4). Bolniki imajo zvečan apetit, motnje spanja, težave s spominom in učenjem.

*Laboratorijske značilnosti:* povišan krvni sladkor (motena toleranca za glukozo ali sekundarna sladkorna bolezen), redko je povišan tudi natrij. Kalij je znižan. Lipidogram je patološki.



Slika 7: Klinična slika Cushingovega sindroma (22).

#### 1.5.1.4 Diagnoza

Z diagnostično občutljivimi presejalnimi testi je mogoče med sumljivi bolniki izločiti večino, ki tega sindroma nima. V ta namen najpogosteje uporabljamo *kratki 1-miligramski deksametazonski (DMT) test*. Zaradi možnih lažno pozitivnih rezultatov (depresija, sočasno jemanje zdravil – barbiturati, estrogeni, antiepileptiki) je pri skupini s pozitivnim testom potreben še diagnostično visoko specifični potrditveni *dvodnevni 2-miligramski DMT test*. Šele ko je ta test pozitiven začnemo z nadaljnjo etiološko diagnostiko.

Diagnostika poteka torej v dveh fazah (3,4):

##### 1. Diagnostični testi, ki potrjujejo Cushingov sindrom:

- izguba dnevno-nočnega ritma kortizola (ali določanje polnočnih vrednosti kortizola v slini);
- odsotnost supresije serumskega kortizola po dajanju nizkih odmerkov sintetičnih steroidov (DMT 1 ali 2 mg);
- povečano izločanje presnovkov kortizola (17-OHS) ali prostega kortizola v urinu (4).

##### 2. Opredeljevanje vzroka Cushingovega sindroma:

Hormonske preiskave:

- določitev bazalne, suprimirane (z 8 mg DMT) ter s sintetičnim CRH stimulirane koncentracije ACTH in kortizola v plazmi;
- določitev koncentracij ACTH v invazivno selektivno odvzetih krvnih vzorcih;
- metopironski test (4).

Poleg hormonskih preiskav so za etiološko opredeljevanje Cushingovega sindroma pomembne tudi funkcionalno-morfološke (scintigrafija nadledvičnih žlez z označenim  $^{131}\text{I}$ -norholesterolom) in morfološke preiskave (računalniška tomografija, magnetna resonanca) hipofize, nadledvičnih žlez in drugih delov telesa. (4)

#### 1.5.1.5 Zdravljenje in prognoza

Najboljše zdravljenje Cushingovega sindroma je kirurška odstranitev tumorja, ki sintetizira ACTH ali kortizol. Po uspešni operaciji se prehodno pojavi hipokortizolizem, ki je prognostično ugoden znak. Hipotalamo-hipofizno-nadledvična os potrebuje določen čas, da se ponovno uravnovesi. V tem obdobju je potrebno nadomeščanje glukokortikoidov.

Obojestranska adrenalektomija, ki je bila nekoč edina oblika zdravljenja centralnega Cushingovega sindroma, pride danes le še redko v poštev (4). Bolniki, ki so jih v preteklosti zdravili z obojestransko adrenalektomijo, so vse življenje vezani na nadomestno zdravljenje z glukokortikoidi in mineralokortikoidi.

Nezdravljeni Cushingov sindrom je v večini primerov smrtna bolezen. Starejše študije navajajo 50% umrljivost 5 let po pojavu bolezni. Pri današnjih možnostih zdravljenja je prognoza odvisna od etiologije Cushingovega sindroma. Najboljša je pri adrenalnih adenomih, pri adrenalnih karcinomih je prognoza slaba, pri ektopičnih ACTH sindromih pa je odvisna od narave tumorja (3).

### 1.5.2 ODPOVED SKORJE NADLEDVIČNE ŽLEZE

Insuficienca skorje nadledvične žleze pomeni skupek kliničnih simptomov in klinično-laboratorijskih znakov, ki so posledica pomanjkanja tako glukokortikoidov kot mineralokortikoidov ter androgenih steroidov (pri ženskah) (3,4).

Odpoved nadledvične žleze ni pomembna zaradi pogostosti pojavljanja, temveč zato ker je neprepoznavanje lahko smrtno. Po tujih podatkih je prevalenca primarne odpovedi med 4 in 6 na 100.000 prebivalcev. Vrh pojavljanja je med 30. in 40. letom (3).

Odpoved nadledvične žleze je lahko posledica primarne okvare nadledvičnih žlez (*primarna insuficienca*, *Mb. Addison*), nezadostnega izločanja ACTH iz hipofize (*sekundarna insuficienca*) ali nezadostnega izločanja CRH iz hipotalamusa (*terciarna insuficienca*).

#### 1.5.2.1 Primarna odpoved skorje nadledvične žleze - Addisonova bolezen

Glavna značilnost primarne nadledvične odpovedi je nezadostno izločanje kortizola s posledično povečanim izločanjem ACTH (4). Včasih je bila najpogostejši vzrok tuberkuloza, danes pa prevladuje avtoimuni adrenalitis (3). Avtoimunsko uničenje skorje nadledvične žleze pogosto nastane v povezavi z drugimi avtoimunskimi endokrinimi motnjami in je pogostejše pri ženskah. Zaradi velike funkcionalne rezerve se znaki insuficiencie pokažejo, ko je okvarjeno najmanj 90% skorje obeh nadledvičnih žlez (1).

Akutni zaplet oziroma poslabšanje Addisonove bolezni, ki je lahko tudi prvi pojav nadledvične odpovedi, imenujemo **addisonska kriza**. Običajno jo sproži okužba ali druga oblika stresa. Nezdravljena addisonska kriza vodi v smrt (3).

### 1.5.2.2 Sekundarna in terciarna odpoved skorje nadledvične žleze

Sekundarna odpoved skorje nadledvične žleze nastane zaradi nezadostnega izločanja ACTH iz hipofize. Najpogosteje je vzrok nenadno prenehanje kronične terapije s sintetičnimi glukokortikoidi. Pomanjkanje ACTH nastane tudi pri poškodbah adenohipofize ali hipotalamusa zaradi tumorja, ishemije, radiacijske poškodbe pri obsevanju glave, kirurškega posega, ali pa zaradi izoliranega pomanjkanja CRH (3,4).

### 1.5.2.3 Klinična slika

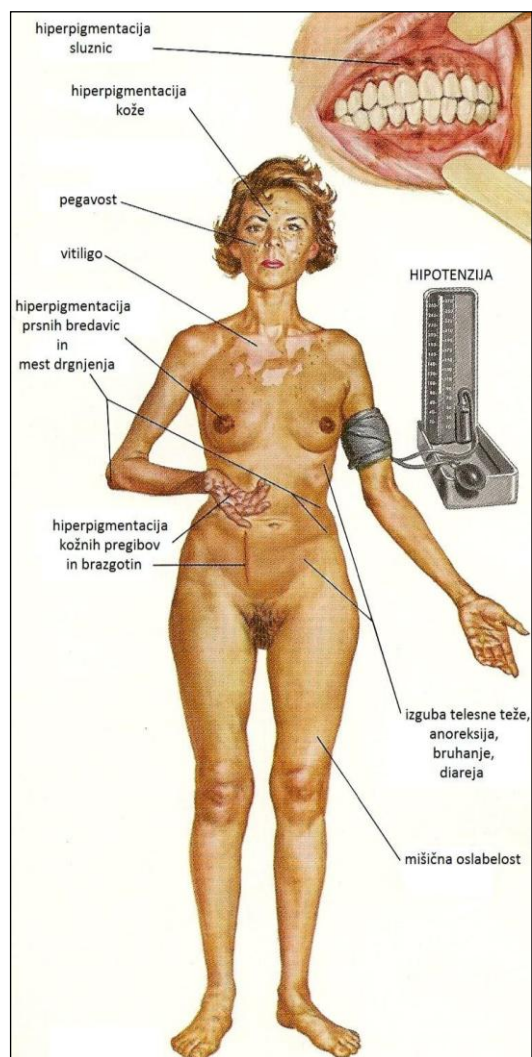
Pogosti so nespecifičnimi simptomi in znaki: oslabeledost, otopelost, hitra utrudljivost, izguba apetita, hujšanje, slabost in bruhanje (3). Značilna je nagnjenost k hipoglikemiji.

Znižan krvni tlak je prisoten že v ležečem položaju, ob vstajanju pa dodaten padec krvnega tlaka povzroča ortostatske simptome (vrtočlavico, sinkopo). Pogosta je želja po soli (4).

Bolnice opazijo izgubo sramnih in pazdušnih dlak ter motnje menstruacijskega ciklusa (4).

Obolenje se izraža tudi kot razdražljivost, nezmožnost koncentracije, čustvena labilnost.

V primeru primarne odpovedi se koža in sluznice bolnikov značilno temno obarvajo, kar imenujemo hiperpigmentacija. V primeru sekundarne odpovedi ni hiperpigmentacij (12).



**Slika 8:** Klinična slika kronične primarne odpovedi skorje nadledvične žleze - Addisonove bolezni (22).

V ospredju klinične slike addisonske krize so bruhanje in bolečine v trebuhu, znaki dehidracije in hipotenzija s šokovnim stanjem, povišana telesna temperatura (4,9).

*Laboratorijske značilnosti:* zvišana sečnina in zvišan kalij, znižan natrij, blaga normokromna normocitna anemija, krvni sladkor na spodnji meji normale (1,4).

#### **1.5.2.4 Diagnoza**

Izločanje kortizola je lahko v bazalnih razmerah še zadovoljivo, že ob najmanjšem stresu pa nadledvična žleza ni več zmožna zagotoviti ustreznega izločanja. Zato so lahko absolutne koncentracije kortizola v jutranjih urah še v normalnem območju in so potrebni za dokončno diagnozo stimulacijski testi. Običajno se uporabljajo ACTH testi. Hitri ACTH test da odgovor na vprašanje, ali je insuficienca nadledvične žleze prisotna ali ne (4). Hitri ACTH test je tudi najzanesljivejši test za razlikovanje med Addisonovo boleznijo in boleznimi, pri katerih se prav tako pojavijo hiperpigmentacije, slabo počutje in izguba telesne teže (npr. malabsorpcijski sindrom, kronična ledvična odpoved, nekateri karcinomi) (3).

Za razlikovanje med primarno in sekundarno insuficienco se uporablja večdnevni ACTH test, ki se opravi samo v bolnišnici, saj lahko pri primarni insuficienci dokončno izčrpamo nadledvično žlezo in sprožimo addisonsko krizo (3,4).

#### **1.5.2.5 Zdravljenje in prognoza**

Pri odpovedi skorje nadledvične žleze je potrebno nadomeščati manjkajoči kortizol in po potrebi še mineralokortikoide. Najpogosteje uporabljajo hidrokortizon in fludrokortizon. Kakovost in pričakovana dolgost življenja se pri bolnikih, ki redno prejemajo nadomestno zdravljenje in so poučeni o ukrepanju v stresnih situacijah, ne razlikuje bistveno od zdrave populacije (3).

### **1.5.3 KONGENITALNA ADRENALNA HIPERPLAZIJA**

Kongenitalna adrenalna hiperplazija (KAH) je oznaka za skupino bolezni, ki so posledica prirojenih motenj v steroidogenezi kortizola. Motnja se deduje monogeno, avtosomno recesivno. Pomanjkljiva sinteza kortizola vodi preko negativne povratne zveze do povečanega izločanja ACTH. Posledica je hiperplazija skorje nadledvičnih žlez.

V 90% je KAH posledica prirojenih okvar gena za citokrom P450 21-hidroksilazo. Incidenca te oblike je približno 1:14.000. Izjema so nekatere izolirane skupnosti, npr. med Eskimi na Aljaski znaša incidenca kar 1:300 (18).

### 1.5.3.1 Klinična slika

Klinično sliko pogojujejo različne stopnje nezadostne sinteze kortizola in/ali ostalih steroidov ob hkratnem presežku metabolitov, ki se kopičijo pred okvarjenim encimom. Lahko se kaže popolnoma ali samo delno, že takoj ob rojstvu ali šele v kasnejšem obdobju. Na možnost KAH posumimo pri mlajših bolnikih nizke rasti, z znaki virilizacije, ki imajo lahko slabo diferencirano zunanje spolovilo, morda še zvišan krvni tlak. Redkeje so to odraščajoči bolniki s slabo izraženo sekundarno spolno poraščenostjo, infantilnim zunanjim spolovilom in hipertenzijo (3,4).

Zaradi kompenzacijsko povečanega izločanja ACTH je izločanje kortizola običajno še v spodnjem območju normale in ni kliničnih znakov pomanjkanja glukokortikoidov, ki pa se lahko pojavijo v stresnih situacijah.

Pri nekaterih bolnikih pride zaradi pomanjkanja mineralokortikoidov do izgube soli in hipotenzije. Pri hudih oblikah je neprepoznan izgubljanje soli, zlasti pri dečkih, lahko vzrok večje neonatalne umrljivosti. Pri deklicah zaradi ambivalentnega spolovila običajno prej posumijo na bolezen in jo začnejo zdraviti (18).

### 1.5.3.2 Diagnoza

Ob kliničnem sumu lahko večino oblik KAH potrdimo z določitvijo 17-ketosteroidov (17-KS) v urinu, ki so pri večini oblik zvišani. Določanje serumskih koncentracij hormonov nadledvičnih žlez in njihovih predstopenj je potrebno za natančnejše opredeljevanje oblike KAH. V nekaterih državah izvajajo *neonatalno presejalno testiranje* za KAH, tako da določajo 17-hidroksiprogesteron (17-OHP) v vzorcu posušene krvi na filter papirju (23).

Pri vseh oblikah je povišana koncentracija serumskega ACTH. Pri popolnoma razvitih oblikah zadošča določanje bazalnih koncentracij predstopenj kortizola, pri latentnih oblikah pa tudi koncentracij po stimulaciji z eksogenim ACTH (3,4).

*Molekularna diagnostika* KAH omogoča natančno opredelitev mutacij pri bolnikih in družinah s KAH in predstavlja temelj za ustrezno genetsko svetovanje, pre-, peri- in postnatalno diagnostiko in ciljano prenatalno zdravljenje (24).

### 1.5.3.3 Zdravljenje in prognoza

Zdravljenje poteka z zadostnimi odmerki sintetičnih glukokortikoidov, ki so običajno nekoliko višji kot pri nadomestnem zdravljenju odpovedi skorje nadledvičnih žlez. Odmerki se določijo na podlagi koncentracij 17-KS in 17-OHS v urinu in serumskih

androgenov ter njihovih presnovnih predstopenj (npr. 17-OHP), ki se morajo normalizirati. Potrebne so tudi korekturne operacije na spolovilih in pogosto še dodatna psihološka obravnava (3).

## **1.6 FUNKCIJSKI TESTI ZA OCENO DELOVANJA SKORJE NADLEDVIČNE ŽLEZE**

### **1.6.1 STIMULACIJSKI TESTI**

#### **1.6.1.1 Hitri ACTH test (preskus s kozintropinom)**

Z njim ugotavljamo odzivnost nadledvične žleze na eksogeni ACTH. Test je pozitiven (patološki), če koncentracija kortizola eno uro po vbrizgu ACTH ne preseže 500 nmol/l. Patološki test je v skladu z nadledvično insuficienco, ne razlikuje pa med primarno in sekundarno insuficienco (1,3).

#### **1.6.1.2 Večdnevni stimulacijski ACTH test**

Podaljšana tridnevna stimulacija z ACTH služi za razlikovanje primarne od sekundarne in terciarne odpovedi skorje nadledvične žleze. Pri sekundarni ali terciarni odpovedi skorje nadledvične žleze serumska koncentracija kortizola drugi ali tretji dan preseže 560 nmol/l, pri primarni odpovedi pa ostaja ves čas pod to vrednostjo (1,4).

#### **1.6.1.3 Inzulinski tolerančni test (ITT)**

Z ITT ocenjujemo integriteto hipotalamo-hipofizno-nadledvične osi. Inzulin povzroči hipoglikemijo, ki sproži izločanje CRH. CRH spodbudi izločanje ACTH, ACTH pa izločanje kortizola. Test lahko vrednotimo, če je najnižja koncentracija krvnega sladkorja 2,2 mmol/l ali manj. Največja dosežena koncentracija kortizola nad 500 nmol/l z gotovostjo izključuje insuficienco hipotalamo-hipofizno-nadledvične osi, vrednosti med 450 in 500 nmol/l pa predstavljajo sivo cono (3,4).

#### **1.6.1.4 Stimulacijski test s kortikotropin sproščujočim hormonom - CRH test**

Namen CRH testa je ločevanje med ektopičnim Cushingovim sindromom in Cushingovo boleznijo (centralni Cushingov sindrom). Tolmačenje je v domeni superspecialista.

### **1.6.1.5 Nočni stimulacijski test z enim odmerkom metirapona**

Namen testa je ocena delovanja hipofize in možnosti prisotnosti sekundarne odpovedi nadledvične žleze (12). Metirapon zavira encim 11 $\beta$ -hidroksilazo, ki katalizira eno od stopenj v biosintezi kortizola. Koncentracija kortizola pade in tako je prekinjena negativna povratna zveza, kar normalno povzroči sproščanje ACTH iz hipofize. Stimulirajoči učinek ACTH na nadledvično žlezo povzroči zvečanje koncentracije 11-deoksikortizola. Če ne zaznamo zvišanja koncentracije ACTH in 11-deoksikortizola, je to dokaz obolenja hipofize oziroma hipotalamusa (1,3).

## **1.6.2 SUPRESIJSKI TESTI**

### **1.6.2.1 Nočni supresijski test z majhnim odmerkom (1 mg) deksametazona**

Deksametazon je sintetični glukokortikoid z močnim delovanjem, ki zavira sproščanje ACTH iz hipofize (1,12). Namen testa je ocena supresibilnosti hipotalamo-hipofizno-nadledvične osi in sklepanje o možnosti prisotnosti Cushingovega sindroma. Normalen odgovor na aplikacijo deksametazona je zmanjšanje koncentracije kortizola do 84 nmol/l. Test je diagnostično visoko občutljiv in zato uporaben kot presejalni test.

### **1.6.2.2 Dvodnevni supresijski test z majhnim odmerkom (2 mg) deksametazona**

Namen testa je enak kot pri nočnem supresijskem testu z majhnim odmerkom deksametazona, vendar ima dvodnevni test zaradi večje diagnostične specifičnosti manj lažno pozitivnih rezultatov (3).

### **1.6.2.3 Supresijski test z več velikimi odmerki (skupaj 8 mg) deksametazona**

Supresijski test z več velikimi odmerki deksametazona je pomemben v diferencialni diagnostiki Cushingovega sindroma. Štiri dni zbiramo 24-urni urin in v vsakem določimo prosti kortizol, 17-hidroksisteroide in kreatinin. Določimo tudi kortizol v serumu za oceno dnevnega ritma izločanja. Bolniki s Cushingovim sindromom zaradi Cushingove bolezni kažejo supresijo prostega kortizola in padec koncentracije 17-hidroksisteroidov pod 50% izhodne vrednosti. Pri bolnikih s tumorjem skorje nadledvične žleze ali ektopičnim Cushingovim sindromom ne opazimo tega padca (1,3).

Bolniki, ki se zdravijo z difenilhidantoinom ali fenobarbitalom, deksametazon metabolizirajo hitreje in zato pri njih ne zaznamo supresije (1).



## 1.7 METODE ZA DOLOČANJE KONCENTRACIJE KORTIZOLA in OSTALIH 17-HIDROKSISTEROIDOV V URINU

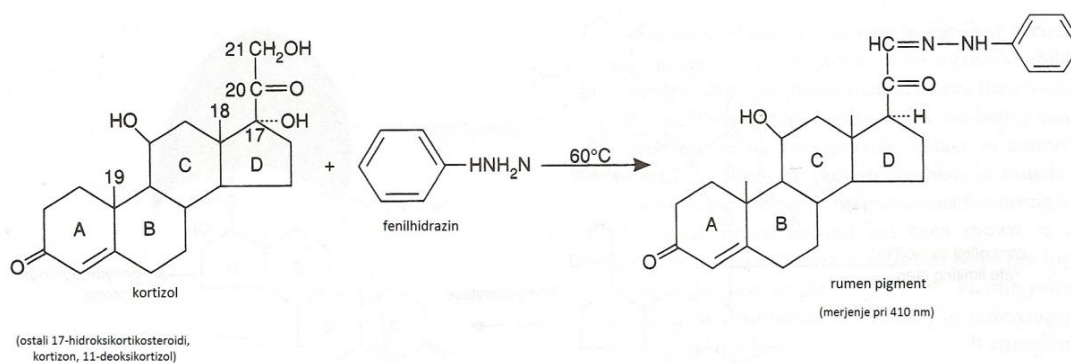
Za analizo steroidnih hormonov in njihovih metabolnih produktov iz bioloških vzorcev obstaja veliko različnih metod. Zaradi zelo nizke merjene koncentracije je prvi pogoj analiznih metod visoka občutljivost. Drugi pogoj je visoka selektivnost, ker so steroidni hormoni v bioloških vzorcih lahko prisotni v bodisi konjugirani bodisi nekonjugirani obliki in ker so biološki vzorci izredno heterogen material ter kot tak vir ko-izoliranih kontaminantov (25).

### 1.7.1 KOLORIMETRIČNE METODE

Kolorimetrija ali fotometrija na osnovi barve in barvnih sprememb določa koncentracije snovi v vzorcu (1). V preteklosti so bile kolorimetrične metode ključnega pomena za oceno delovanja skorje nadledvične žleze. Danes veljajo za zastarele in se opuščajo zaradi možnosti bolj selektivnih in občutljivejših metod določanja kortizola in ostalih steroidnih hormonov ter njihovih presnovkov v urinu, serumu, plazmi in slini. Slabost kolorimetričnih metod je med drugim velika možnost interference z zdravili in drugimi kontaminanti v vzorcih urina, kar zahteva pred določanjem eno ali več stopenj čiščenja vzorca. Priporoča se, da bolnik nekaj dni pred zbiranjem 24-urnega urina opusti jemanje vseh zdravil, v kolikor to ne ogroža njegovega zdravja (19).

#### 1.7.1.1 Porter-Silberjeva metoda

S Porter-Silberjevo metodo določamo koncentracijo 17-OHS v vzorcu urina. Fenilhidrazin selektivno reagira s 17,21-dihidroksi-20-keto (dihidroksiacetonsko) stransko verigo. Tvori se značilno rumeno obarvan produkt, ki ga merimo spektrofotometrično pri 410 nm (12).



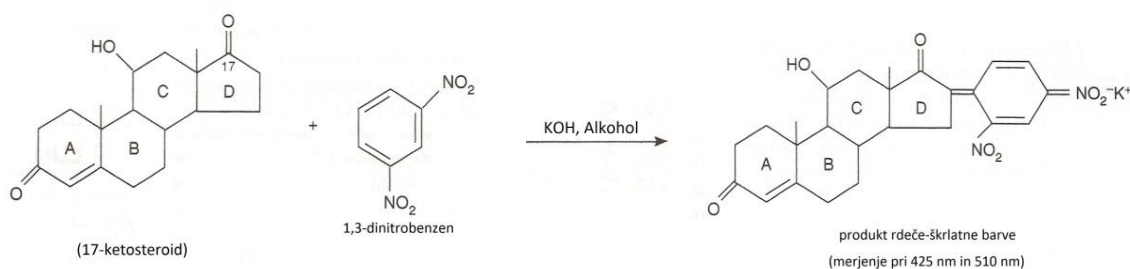
Slika 9: Porter-Silberjeva reakcija za določanje 17-hidroksisteroidov (12).

Zdravila, ki inducirajo jetrne mikrosomalne encime, npr. fenitoin, fenobarbital in mitotan, zmanjšajo izločanje 17-OHS v dnevnem urinu. Vzrok je spodbujanje razgradnje steroidnih hormonov po poti 6 $\beta$ -hidroksilacije v metabolite, ki jih s Porter-Silberjevo reakcijo ne določimo. Nekatera druga zdravila neposredno interferirajo pri določanju 17-OHS in so vzrok lažno zvišanim vrednostim, npr. spironolakton, klordiazepoksid, hidroksizin, meproamat, fenotiazini, kinin, kloralhidrat, sulfonamidi, jodidi in troleandomicin (17,21).

### 1.7.1.2 Metoda po Norymbersku in Applebyjevi z Zimmermannovo reakcijo

Z metodo po Norymbersku in Applebyjevi skupne 17-OHS z redukcijo in oksidacijo najprej pretvorimo v 17-ketosteroide (17-KS), pri čemer se odcepi stranska veriga na položaju C<sub>17</sub> v obroču D in nadomesti s keto skupino. Nastale 17-KS določamo s pomočjo Zimmermannove reakcije. Pri njej 17-KS reagirajo z 1,3-dinitrobenzenom in tvorijo škrlatno rdeče obarvan produkt, ki ga merimo spektrofotometrično.

Vsi 17-KS, ki so že predhodno prisotni v vzorcu urina, se reducirajo v 17-OHS in ne reagirajo z 1,3-dinitrobenzenom (5).



Slika 10: Zimmermannova reakcija za določanje skupnih 17-hidroksisteroidov (12).

Številna zdravila lahko motijo določanje skupnih 17-OHS v urinu. Lažno višje meritve so lahko posledica interference z meproamatom, fenotiazini, spironolaktonom in hidralazinom. Nižje vrednosti so lahko posledica prisotnosti kinina, rezerpina, tiazidnih diuretikov in kronične terapije z glukokortikoidi (17,21).

## 1.7.2 MOLEKULARNA ABSORPCIJSKA SPEKTROMetriJA

Molekularna absorpcijska spektrometrija (kolorimetrija, fotometrija, spektrofotometrija) temelji na merjenju absorpcije svetlobe, ki prehaja skozi preiskovano raztopino. Absorpcijo lahko merimo v ultravijoličnem (UV), vidnem (VIS) ali infrardečem (IR) spektralnem območju, navadno pri absorpcijskem maksimumu. Lahko posnamemo

absorpcijski spekter v širšem spektralnem območju in iz njegove oblike sklepamo na kvantitativno in kvalitativno sestavo preiskovanega vzorca. Spektrofotometrijo v vidnem območju uporabljamo predvsem za kvantitativno določanje posameznih analitov, ki jih prevedemo v obarvano obliko s primerno kemično reakcijo. Spektrofotometrija v UV in IR spektralnem območju je pomembna za analizo organskih spojin.

### 1.7.2.1 Absorpcija in Beer-Lambertov zakon

Absorpcija je proces, pri katerem elektromagnetno sevanje prenesemo na atome, ione ali molekule vzorca in s tem te delce spravimo iz osnovnega v vzbujeno stanje. Atomi, ioni in molekule imajo le omejeno število diskretnih energijskih (kvantnih) nivojev, torej mora energija fotonov, ki jih uporabimo za vzbujanje, natančno sovpadati z energijsko razliko med osnovnim in vzbujenim stanjem. Posledica vzbujanja je zmanjšanje intenzitete žarka elektromagnetnega valovanja, ki prehaja skozi vzorec.

Pri absorpcijskih metodah merimo  $I_0$  (intenziteta vpadnega žarka) in  $I$  (intenziteta prepuščenega žarka). Za opis razmerja med  $I_0$  in  $I$  uporabljamo transmitanco ( $T$ ) in absorbanco ( $A$ ). Transmitanca predstavlja del vpadle svetlobe, ki prehaja skozi preiskovani medij in jo izračunamo po enačbi 1. Največja omejitev transmitance je, da ni v linearnem razmerju s koncentracijo analita v vzorcu. Absorbanca ali ekstinkcija je merilo za količino vpadle svetlobe, ki jo vzorec absorbira; definirana je kot negativni desetiški logaritem transmitance (enačba 2). Absorbanca je v linearnem razmerju s koncentracijo analita ( $c$ ), dolžino poti, ki jo skozi vzorec prepotuje žarek ( $b$ ) in absorptivnostjo snovi ( $a$ ,  $\epsilon$ ), ki je značilna za neko snov pri določeni valovni dolžini, kar opisuje Beer-Lambert-ov zakon (enačba 3).

**Enačba 1:** Formuli za izračun transmitance  $T$  in  $\%T$  ( $I_0$  –intenziteta vpadle svetlobe,  $I$  – intenziteta prepuščene svetlobe):

$$T = \frac{I}{I_0}; \text{ pogosto v obliki procentov } \%T = T \cdot 100$$

**Enačba 2:** Formula za izračun absorbance  $A$  ( $T$  – transmitanca,  $I_0$  –intenziteta vpadle svetlobe,  $I$  – intenziteta prepuščene svetlobe):

$$A = -\log_{10}T = \log \frac{I_0}{I}$$

**Enačba 3:** Beer-Lambertov zakon ( $A =$  absorbanca (ekstinkcija),  $a =$  absorptivnost [ $l \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$ ],  $\varepsilon(\lambda) =$  molarna absorptivnost ali molarni absorptivni koeficient [ $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ],  $c =$  koncentracija [ $g/l$ ] oz. molarna koncentracija [ $mol/l$ ],  $b =$  debelina vzorca [ $cm$ ]):

$$A = a \cdot b \cdot c \quad \text{in} \quad A = \varepsilon(\lambda) \cdot b \cdot c$$

**Kromofor ali kromoforni sistem** je del molekule, ki je odgovoren za absorpcijo vidne ali UV svetlobe. Kromofori vsebujejo  $\pi$  in  $n$  elektrone, ki jih lahko vzbudimo oz. »premaknemo« s fotonom svetlobe na višji energetski nivo. Če imamo v molekuli več  $\pi$  in  $n$  orbital, ki med seboj ne interagirajo, potem lahko v splošnem pričakujemo spekter, ki je vsota posameznih absorpcij izoliranih kromoforov.

**Absorpcijski spekter** posnamemo tako, da preiskovani vzorec obsevamo s svetlobo naraščajo valovne dolžine ( $\lambda$ ) in pri tem določimo del absorbirane svetlobne energije. Absorpcija je največja pri  $\lambda$ , ki imajo ravno pravšnjo energijo za prehod elektronov v vzbujeno stanje. UV-VIS absorpcijske krivulje kažejo v glavnem široke maksimume, ki jih označimo kot **absorpcijske trakove**. Absorpcijske trakove opišemo s položajem absorpcijskega maksimuma ( $\lambda_{\max}$ ), višino ( $\varepsilon_{\max}$ ) in obliko. Velja pravilo, da čim večji je konjugiran sistem, bolj se pomakne absorpcijski maksimum k daljšim valovnim dolžinam in intenzivnejši je.

Absorbanco vedno poskušamo meriti pri valovni dolžini, ki ustreza maksimumu absorpcije. To nam zmanjša napake, izboljša občutljivost in zniža mejo zaznavnosti.

Velike organske molekule pogosto služijo kot kolorimetrični reagenti v anorganski analizi. Za določitev je bistveno, da je absorbanca stabilna, dokler ne izvršimo meritve. Absorbanca se tudi ne sme spreminjati pri manjših spremembah pH, temperature, množine dodanega reagenta itd.

Glavni problem v molekularni absorpcijski spektrometriji so interefence oz. motnje zaradi drugih komponent v vzorcu. Tudi te lahko namreč absorbirajo svetlobo pri izbrani valovni dolžini in povzročajo napake v analizi, ki jih skušamo na različne načine odpraviti.

### 1.7.3 IMUNOKEMIJSKE METODE

Imunokemijski testi so zasnovani na različnih visoko afinitetnih nekovalentnih interakcijah med epitopom liganda (antigena ali haptena) s specifičnim paratopom protitelesa, pri čemer nastane kompleks ligand-protitelo (25). To omogoča identifikacijo in kvantifikacijo specifičnih snovi v bioloških vzorcih (1).

Teste lahko delimo na kompetitivne in nekompetitivne. Pri nekompetitivnih testih analit (x) v prvi stopnji reagira s primarnim protitelesom ( $Ab_1$ ) v kompleks antigen-protitelo ( $x-Ab_1$ ). Če je v prvi stopnji nastal kompleks  $x-Ab_1$ , poteče v drugi stopnji asociativna reakcija med primarnim protitelesom kompleksa in sekundarnim označenim protitelesom ( $Ab_2^*$ ). Nastala količina označenega kompleksa  $[x-Ab_1]Ab_2^*$  je sorazmerna s koncentracijo analita x. Pri pogostejšem kompetitivnih principu testov med seboj tekmujeta neoznačen analit (x) iz vzorca in označen analit ( $x^*$ ) za omejeno znano količino primarnih protiteles. Ker po reakciji nastaneta različna deleža kompleksov  $Ab-x$  in  $Ab-x^*$ , je nastala količina označenega kompleksa obratno sorazmerna koncentraciji analita x iz vzorca.

Uporabljeni imunski testi se med seboj razlikujejo predvsem v načinu aktivacije in detekcije signala označenih kompleksov. Tako poznamo: radioimunske tehnike (RIA), encimskoimunske tehnike (EIA), imunofluorescenčne tehnike (FIA) in luminiscenčne imunske tehnike (LIA) (1,25). V klinični kemiji se za rutinsko analizo steroidnih hormonov najpogosteje uporabljajo encimskoimunski in radioimunski testi. Tovarniško so pripravljene in dostopni reagenčni kiti, večinoma za rutinsko analizo posameznih hormonov (npr. kortizol, progesteron, DHEA-S) (25).

Imunokemijske metode odlikujejo visoka točnost, natančnost in selektivnost, zelo nizka meja detekcije, relativno kratek čas analize ter enostavnost v izvajanju analize. V izvedbah so metode, ki so ročne, delno ali v celoti avtomatizirane (16,25). Slabost imunokemijskih tehnik pa je še vedno prisotna možnost interference zaradi navzkrižnih imunskih reakcij z drugimi steroidi. Za vsak test je potrebno posebej določiti referenčno območje, saj rezultati različnih testov niso popolnoma skladni (16).

#### 1.7.3.1 Encimskoimunske tehnike

Osnova encimskoimunskih tehnik (angl. *enzyme immunoassays* – EIA) je pritrnitev različnih encimov na protitelesa ( $Ab^*$ ) ali antigene ( $Ag^*$ ) tako, da se njihova reaktivnost ne

spremeni. Signal predstavlja sprememba absorbance kromogenega substrata zaradi katalitične aktivnosti encima na molekule substrata (1,25).

Za kvantitativno določanje 17-OHS v urinu in drugih telesnih tekočinah so na voljo tovarniško pripravljene ELISA testi (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Ti testi niso namenjeni uporabi v kliničnih laboratorijih, temveč v raziskovalne namene (26).

Z metodo ELISA lahko selektivno določamo kortizol. Še posebej se v rutinski diagnostični uporabi uveljavljajo testi na vzorcih sline (angl. *salivary free cortisol – SFC*), v kateri so koncentracije kortizola občutno nižje kot v serumu in urinu (27,28).

### 1.7.3.2 Radioimunske tehnike

Radioimunski testi (angl. *radioimmunoassays – RIA*) so med najbolj vsestranskimi in najobčutljivejšimi testi za merjenje antigenov in haptenov. Izmerimo lahko izredno majhne količine (do  $10^{-12}$  g,  $10^{-14}$  mol/l), zato je metoda primerna tudi za kvantitativno določanje hormonov. Pri testu uporabljamo radioaktivno zaznamovane (npr. z izotopom  $^{125}\text{I}$  ali  $^3\text{H}$ ) antigene, protitelesa ali haptene (1). Signal predstavlja emitirano radioaktivno sevanje (25). Radioimunski testi so v kliničnih laboratorijih metoda izbora za določanje kortizola in 17-hidroksiprogesterona v serumu ter prostega kortizola v urinu (angl. *urinary free cortisol – UFC*) (12).

### 1.7.4 KROMATOGRFSKE METODE

Kromatografske tehnike uporabljamo za ločevanje in čiščenje spojin v vzorcu na njihove posamezne sestavine. Njihov namen je odkrivanje in kvantifikacija določenih sestavin ali skupin sestavin v čisti obliki. Temeljijo na različni porazdelitvi sestavin zmesi med dvema fazama. Za kromatografsko ločitev mora biti vzorec uveden v mobilni fazi (tekoči ali plinski), ki potuje skozi stacionarno fazo, ki s svojimi lastnostmi strukture in površine ter zmožnosti raztapljanja snovi omogoča selektivno zadrževanje in ločevanje zmesi na posamezne sestavine. Za določitev, zapis in kvantifikacijo ločenih sestavin uporabljamo različne detektorje, rekorderje, integratorje in računalnike (1).

Za določanje steroidnih hormonov in njihovih metabolitov se uporabljajo plinska kromatografija (angl. *gas chromatography – GC*), tekočinska kromatografija (angl. *liquid-chromatography – LC*) in tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. *high performance/pressure liquid chromatography – HPLC*) (16). Če pri plinski ali tekočinski kromatografiji uporabimo kot detektor masni spektrometer (MS), govorimo o kombinirani

plinsko-masni GC/MS ali tekočinsko-masni LC/MS tehniki (1). Pri kromatografskih metodah je potrebno iz vzorca izoliran analit velikokrat kemično spremeniti s postopki derivatizacije (25).

Ena od prednosti kromatografskih metod je večja selektivnost, npr. s HPLC izmerimo v primerjavi z imunokemijskimi testi bistveno nižje (okoli 40%) vrednosti kortizola (29). S kromatografijo simultano identificiramo in kvantificiramo številne analite v vzorcu in lahko posredno sklepamo o aktivnosti posameznih encimov v metabolnih poteh, kar močno izboljša diagnostično vrednost testa. Npr. iz razmerja  $\alpha$ THF/THF sklepamo o aktivnosti jetrne  $5\alpha$ -reduktaze vs.  $5\beta$ -reduktazi, razmerje THF+ $\alpha$ THF/THF pa je pokazatelj aktivnosti  $11\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze (30). Za kromatografsko analizo zadoščajo že zelo majhne količine vzorca, kar je prednost zlasti v pediatriji (31).

Omejitev za širšo uporabo kromatografskih metod je predvsem visoka cena. So tudi kompleksnejše, zahtevnejše in časovno zamudnejše kot imunokemijske metode. Uporabljajo se v visoko specializiranih laboratorijih (29). V zadnjem času pa tehnološke izboljšave v smeri miniaturizacije sistemov, večje hitrosti in nižje cene omogočajo vedno širšo uporabo tudi v klinično diagnostične namene (16).

## **1.8 24-URNI URIN KOT BIOLOŠKI VZOREC**

Vzorci urina zbiramo v določenem časovnem obdobju zaradi vpliva bioloških ritmov, presnove, telesne aktivnosti, stresa in vnosa tekočine na hitrost izločanja hormonov in njihovih presnovkov. Običajno gre za 12- in 24-urna obdobja zbiranja (32).

Pri zbirnih vzorcih je bistveno časovno točno določeno in dokumentirano zbiranje urina. Nujno je dobro sodelovanje z bolnikom ter nedvoumna ustna in pisna navodila v obliki standardiziranega postopka za zbiranje 24-urnega urina (priloga 1).

### **1.8.1 STEROIDNI HORMONI V RAZLIČNIH BIOLOŠKIH VZORCIH**

Klasični biološki materiali v analizi steroidnih hormonov so krvna plazma ali serum, urin ter slina (25). Nekaj lastnosti posameznih bioloških vzorcev je zapisanih v preglednici II (16,33).

**Preglednica II:** Primerjava urina, sline in krvi kot vzorcev v klinični analitiki steroidnih hormonov (33).

	URIN	SLINA	KRI
<b>So hormoni vezani ali nevezani?</b>	Nekonjugiran hormon je pokazatelj nevezanega (biološko aktivnega) dela hormona v krvi.	Slina dobro odraža nevezan (biološko aktiven) del hormona v krvi.	V serumu največkrat določamo skupno (vezano in nevezano) koncentracijo hormona.
<b>Kaj so prednosti vzorca?</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Omogoča najpopolnejši vpogled v sintezo in razgradnjo hormonov in njihovih metabolitov.</li> <li>• Bolje odraža delovanje hormonov na tkiva in njihov metabolizem.</li> <li>• Pokaže povprečno koncentracijo hormonov v določenem časovnem obdobju, ne glede na nihanje v plazmi zaradi bioloških ritmov.</li> <li>• Vzorce je mogoče neinvazivno zbirati v domačem okolju.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Najboljši način za oceno cirkadianega ritma kortizola in melatonina.</li> <li>• Preprost neinvaziven odvzem vzorca, lahko v domačem okolju.</li> <li>• Odvzem vzorca ne povzroči s stresom sproženega izločanja hormonov nadledvične žleze.</li> <li>• Pokazatelj koncentracije prostega hormona v krvnem obtoku v trenutku odvzema.</li> <li>• Stabilnost hormonov (tudi na sobni temperaturi) omogoča enostavno pošiljanje vzorcev z navadno pošto.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Referenčne vrednosti so jasno določene in poenotene med laboratoriji.</li> <li>• Pokazatelj koncentracije hormonov v krvnem obtoku v trenutku odvzema vzorca.</li> </ul>
<b>Na kaj moramo biti posebej pozorni?</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Urin ni primeren vzorec pri moteni ledvični funkciji, uporabi diuretikov, okužbah urinarnega trakta, menstruaciji.</li> <li>• Steroidni hormoni so prisotni v urinu pretežno v obliki metabolitov.</li> <li>• Hematurija lahko lažno zviša rezultate meritve.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transdermalne hormonske kreme zvišajo izmerjene koncentracije hormonov v slini, ki ne odražajo dejanskega fiziološkega stanja.</li> <li>• Krvavitev iz dlesni lahko lažno zviša meritve.</li> <li>• Naj se ne uporablja skupaj s podjezično hormonsko terapijo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enkratna meritve ne pokaže nihanj koncentracije hormonov.</li> <li>• Stres zaradi samega odvzema krvi lahko vpliva na rezultat.</li> </ul>

Steroide je mogoče določati tudi v vzorcih las. Prednosti določanja v laseh so: preprosto shranjevanje vzorcev, ni vpliva cirkadianega ritma, retrospektivni vpogled v izločanje steroidnih hormonov (16).



## 2 NAMEN DELA

Določanje skupnih 17-hidroksisteroidov v dnevnem urinu z metodo po Norymbersku in Applebyjevi je ena od prvih klinično laboratorijskih metod, ki se je začela uporabljati v diagnostiki bolezni nadledvične žleze. Še danes jo za Slovenijo v modificirani obliki izvajajo v Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo v Ljubljani.

Cilj diplomske naloge bo proučiti klinično uporabnost določanja skupnih 17-OHS v dnevnem urinu pri diagnostiki motenj v delovanju nadledvične žleze.

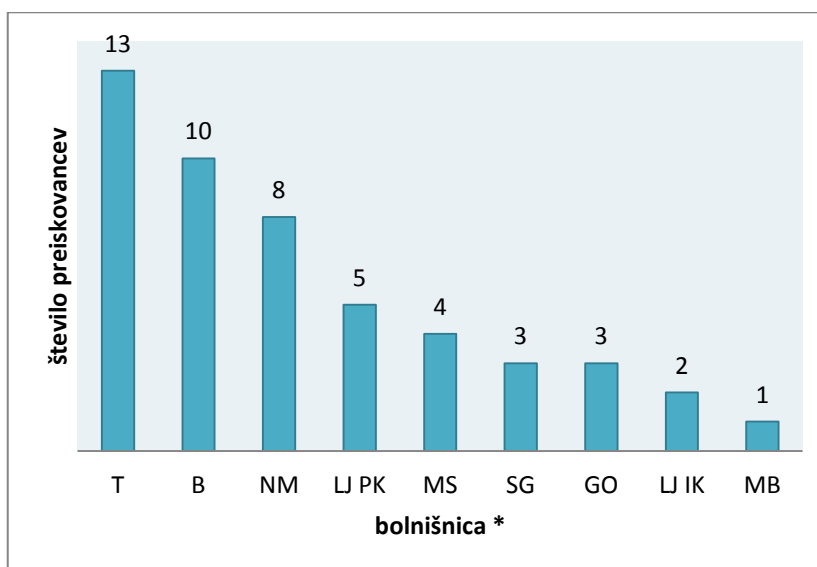
V ta namen bomo v raziskavo vključili skupno 49 preiskovancev iz 9 slovenskih bolnišnic, ki smo jim med letoma 2007 in 2011 določili vrednost skupnih 17-OHS v dnevnem urinu. Zbrali bomo rezultate meritev in jih statistično ovrednotili.

Najprej nas bo zanimalo, kakšno je ujemanje izmerjene vrednosti skupnih 17-OHS v dnevnem urinu s pričakovano vrednostjo glede na potrjeno diagnozo Cushingovega sindroma, Addisonove bolezni, kongenitalne adrenalne hiperplazije in kakšne so vrednosti pri kontrolnih preiskovancih brez motnje v delovanju nadledvične žleze. Nato bomo preverili, ali se rezultati meritev pri skupinah preiskovancev statistično značilno razlikujejo med seboj. Izračunali bomo tudi diagnostično občutljivost in specifičnost metode.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 OPIS SKUPINE PREISKOVANCEV

V raziskavo smo vključili 49 preiskovancev, ki smo jim med letoma 2007 in 2011 v Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev UKC Ljubljana izmerili vrednosti 17-OHS v dnevnem urinu. Vzorci so bili v laboratorij poslani iz 9 slovenskih bolnišnic. Največ vzorcev (13 oziroma 26,53%) je bilo iz Bolnišnice Topolšica (slika 11).

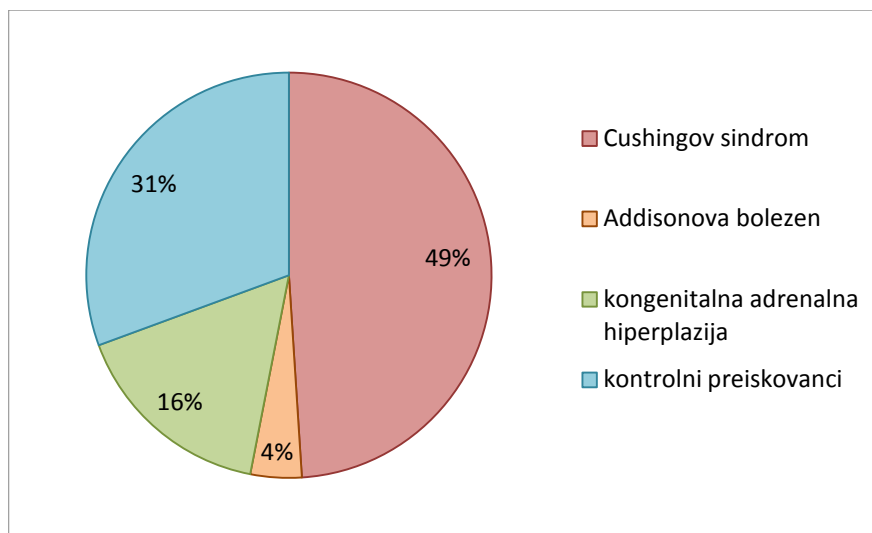


**Slika 11:** Prikaz števila preiskovancev za meritev 17-OHS v urinu po bolnišnicah v letih 2007 do 2011.

\* T = Bolnišnica Topolšica, B = Splošna bolnišnica Brežice, NM = Splošna bolnišnica Novo mesto, LJ PK = Pediatrična klinika Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, MS = Splošna bolnišnica Murska Sobota, SG = Splošna bolnišnica Slovenj Gradec, GO = Splošna bolnišnica »Dr. Franca Derganca« Nova Gorica, LJ IK = Interna klinika Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, MB = Univerzitetni klinični center Maribor

Skupaj smo obravnavali 34 (69,39%) žensk in 15 (30,61%) moških. Povprečna starost preiskovancev je bila 46 let; od tega so imele ženske povprečno 47 let (najmlajša preiskovanka je bila stara 1 mesec, najstarejša pa 90 let), moški pa 44 let (najmlajši je imel 18 let, najstarejši pa 78 let).

Preiskovance smo glede na motnjo v delovanju skorje nadledvične žleze razdelili v štiri skupine, ki so prikazane na sliki 12.



**Slika 12:** Odstotek preiskovancev glede na potrjeno diagnozo in odstotek kontrolnih preiskovancev.

### 3.2 OPIS ZBIRANJA VZORCEV

V 24-urnem oziroma dnevnem urinu (dU) smo merili vrednost skupnih 17-OHS. Za analizo smo potrebovali alikvot (4,5 ml) zbranega urina.

Preiskovanci so ves izločen urin 24 ur zbirali v posebno posodo, t.i. primarni zbiralnik. Navodila KIKKB za zbiranje 24-urnega urina so v prilogi 1. Pridobili smo tudi 9 vzorcev od otrok, t.i. pediatričnih vzorcev. Ustrezne urinske vzorce je težko dobiti predvsem pri novorojenčkih, ker ne morejo hote urinirati. Za odvzem so uporabili posebne plastične vrečke s hipoalergenim adhezivnim sredstvom.

V zbiralnik smo že pred začetkom zbiranja dodali kemični konzervans, in sicer očetno kislino s toluolom. Med zbiranjem je preiskovanec zbiralno posodo hranil na temnem v hladilniku. Po končanem zbiranju so vzorce dostavili v laboratorij, kjer smo najprej izmerili volumen zbranega urina in potreben alikvot za analizo zamrznili na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vzorce lahko hranimo v zamrzovalniku več mesecev (do 6 mesecev).

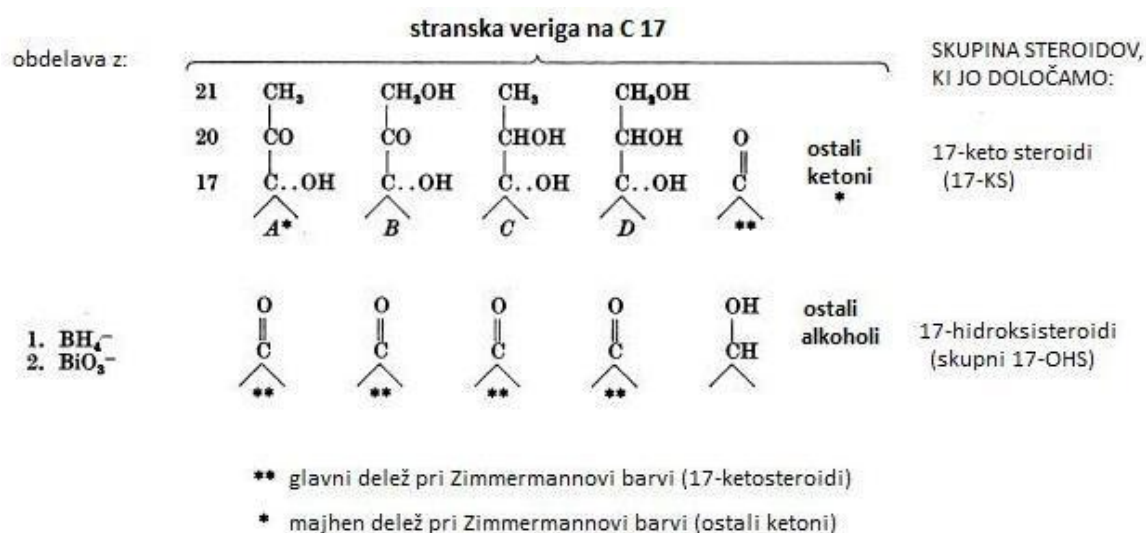
### 3.3 METODE IN MATERIALI ZA DOLOČANJE 17-HIDROKSI-STEROIDOV V URINU

Laboratorij za analitiko hormonov in tumorskih markerjev Kliničnega centra v Ljubljani uporablja za določanje 17-hidroksisteroidov v urinu modificirano metodo po Norymbersku in Applebyjevi z Zimmermannovo reakcijo.

### 3.3.1 MODIFICIRANA METODA PO NORBYMBERSKU IN APPLEBYJEVI Z ZIMMERMANNOVO REAKCIJO

#### 3.3.1.1 Princip metode

V urinu prisotni konjugati 17-hidroksi-20-keto-21-deoksi steroidov se reducirajo z natrijevim borhidridom do 17,20-dihidroksi-21-deoksi steroidov, konjugati 17,21-dihidroksi-20-keto steroidov se reducirajo do 17,20,21-trihidroksi steroidov. 17-ketosteroidi, ki so že prisotni v urinu, se z natrijevim borhidridom reducirajo v C-19 17-hidroksisteroide. V naslednjem koraku z natrijevim bizmutatom selektivno oksidiramo vse C-21 17-hidroksisteroide v C-19 17-ketosteroide (slika 13).



**Slika 13:** Prikaz stranskih alifatskih verig steroidnih hormonov na C<sub>17</sub>, pred in po redukciji z natrijevim borhidridom (NaBH<sub>4</sub>) ter oksidaciji z natrijevim bizmutatom (NaBiO<sub>3</sub>). A: 17-hidroksiprogesteron, 17-hidroksipregnenolon; B: kortizol, kortizon, 11-deoksikortizol in njihovi tetrahidroderivati; C: pregnantriol in derivati; D: kortol in kortolon (5).

Nato konjugate hidroliziramo v kislem mediju pri povišani temperaturi. Prosta frakcija 17-ketosteroidov se izolira z ekstrakcijo s kloroformom. Raztopino ekstrakta očistimo fenolnih derivatov (estrogeni) s spiranjem z vodno raztopino natrijevega hidroksida. V tako izoliranem alikvotu se določijo 17-ketosteroidi z Zimmermannovo reakcijo (raztopina 1,3-dinitrobenzena v alkalnem mediju) za ketone z adjecentno metilensko skupino (-CO-CH<sub>2</sub>-). Količina 17-hidroksisteroidov je sorazmerna s količino Zimmermannovih aduktov, katerih absorbanco določimo spektrofotometrično pri valovnih dolžinah 425 in 510 nm proti reagenčni slepi. Z merjenjem proti reagenčni slepi korigiramo absorbanco

zaradi absorpcije sestavin reagenta, odboja svetlobe na stenah kivete in sipanja svetlobe v raztopini reagenta. Izmerjene absorbance korigiramo po Gibson-Evelyn-ovi korekcijski formuli in podamo koncentracije.

Z merjenjem barve pri dveh valovnih dolžinah in izračunom korigirane absorbance eliminiramo vpliv interferenčnih kromogenov, ki so prisotni tudi v očiščenem urinskem ekstraktu. Zimmermannovi škrlatno-redeče obarvani adukti imajo absorpcijski maksimum v zelenem delu spektra vidne svetlobe, natančneje pri 510 nm. Če bi merili absorbance samo pri 510 nm, bi dobili lažno višje rezultate. Interferirajoči rjavo obarvani kromogeni imajo širok absorpcijski maksimum v vijoličnem delu spektra vidne svetlobe; za meritev smo uporabili valovno dolžino 425 nm.

Korigirano absorbance bi lahko računali tudi po Allenovi formuli. Allenova korekcija zahteva meritev absorbance pri treh valovnih dolžinah, zato je lahko slabša ponovljivost.

### 3.3.1.2 Aparature in pribor

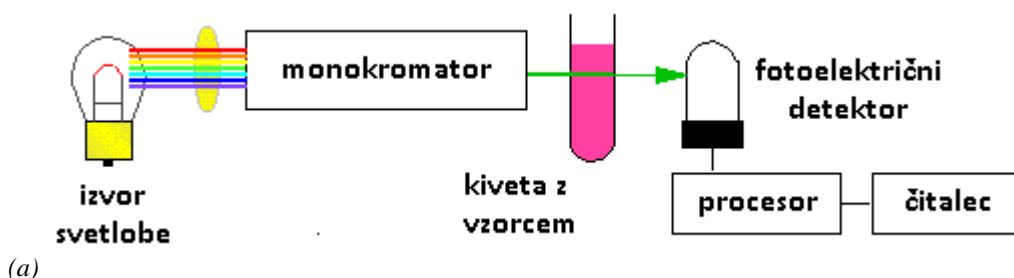
- aparatura Shimadzu UV mini 1240 proizvajalca Shimadzu Corporation
- stresalnik Schütler SP2
- centrifuga Tehnica
- analitska tehtnica Mettler B6
- avtomatska pipeta Socorex *Stepper*<sup>TM</sup>411
- steklene epruvete 24x170 mm z obrusom NS 14/26 z zamaški
- vakuumaska črpalka, vodna kopel
- standardna laboratorijska oprema



Slika 14: Avtomatska pipeta »Socorex Stepper<sup>TM</sup>411« (35).

### Aparatura Shimadzu UV mini 1240

Aparatura Shimadzu UV mini 1240 je enožarkovni UV-VIS spektrofotometer (slika 15). S tem instrumentom smo merili absorbanco obarvane raztopine v vidnem delu (380-750 nm) spektralnega območja. Instrument je sicer namenjen spektrometriji v območju od 190 do 1100 nm. Izvor svetlobe v vidnem območju je halogenska žarnica, UV-izvor svetlobe je devterijeve žarnica. Element za izbiro določene valovne dolžine iz polikromatske svetlobe je monokromator. Njegov glavni del je disperzni sistem, pri spektrofotometru UV mini 1240 je to konkavna uklonska mrežica, ki razprši vpadno svetlobo na posamezne valovne dolžine. Ukrivljene ali konkavne uklonske mrežice imajo prednost pred ravnimi, ker razpršijo svetlobo in jo tudi usmerijo na izhodno režo. Zaradi tega ni nujno potrebna žariščna leča ali ogledalo. Z zmanjšanjem števila optičnih elementov se tudi zveča energija radiacije, ki prehaja skozi monokromator. Uporabili smo vstavljive oglate kivete iz navadnega stekla s standardnim premerom 10 mm. Instrument ima kot detektor svetlobe vgrajeno silikonsko fotodiodo, ki pretvori svetlobni signal v električni. Rezultat meritve odčitamo na digitalnem čitalcu.



**Slika 15:** (a) Zgradba enožarkovnega spektrofotometra. (b) Aparatura Shimadzu UV mini 1240.

### 3.3.1.3 Reagenti

- natrijev borhidrid,  $\text{NaBH}_4$  (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- natrijev bizmutat,  $\text{NaBiO}_3$  (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- natrijev hidroksid 3 mol/l,  $\text{NaOH}$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO ZDA)
- natrijev disulfit 1,2 mol/l,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO ZDA)
- brezvodni natrijev sulfat,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (Riedel-de Häen AG, Nemčija)
- klorovodikova kislina, 36% (w/w),  $\text{HCl}$  (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- očetna kislina, min. 99,9% (w/w),  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$  (Carlo Erba Reagenti, Italija)
- kloroform,  $\text{CHCl}_3$  (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- absolutni etanol,  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$  (Riedel-de Häen AG, Nemčija)
- 1,3-dinitrobenzen 2% (w/v),  $\text{C}_6\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_4$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo ZDA)
- kalijev hidroksid,  $\text{KOH}$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo ZDA)

#### Priprava reagentov

##### *Natrijev hidroksid (3 mol/l)*

Raztopimo 120,0 g natrijevega hidroksida, p.a. ( $\text{NaOH}$ , Mr 40.00 g/mol) v nekaj deionizirane vode in dopolnimo do 1l z deionizirano vodo.

##### *Natrijev disulfit (1,2 mol/l)*

Raztopimo 22,81 g natrijevega disulfita, p.a. ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , Mr 190.10 g/mol) v nekaj deionizirane vode in dopolnimo do 100 ml z deionizirano vodo.

##### *1,3-dinitrobenzen (2% (w/v))*

Raztopimo 1 g 1,3-dinitrobenzena, p.a. ( $\text{C}_6\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_4$ , Mr 168.11 g/mol) v 50 ml etanola segretega na 40-45°C. Zimmermannov reagent pripravimo sproti in do uporabe shranjujemo v temnem prostoru.

##### *Etanolna raztopina kalijevega hidroksida*

Raztopimo 1,4025 g kalijevega hidroksida, p.a. ( $\text{KOH}$ , Mr 56.11 g/mol) v 1 ml deionizirane vode in dodamo 9 ml absolutnega etanola. Pripravimo svež reagent in ga do uporabe shranjujemo v temnem prostoru.

### 3.3.1.4 Delovni postopek

Analiza se opravi ročno. Delovni postopek traja 3 dni.

#### Prvi dan:

- Vso steklovino je pred delom potrebno dobro sprati z absolutnim etanolom in posušiti.
- **REDUKCIJA:** V 50 ml epruvete z obrusom NS 14/26 odpipetiramo 4,5 ml 24-urnega urina, dodamo (s prekalibrirano žličko) 20 mg natrijevega borhidrida in premešamo. Ko se reakcijska mešanica preneha peniti (vsaj 1 ura), epruvete zamašimo in pustimo 17-20 ur (čez noč) na sobni temperaturi, zaščitene pred svetlobo. Uporabimo stojalo, ovito s črnim papirjem.

#### Drugi dan:

- **OKSIDACIJA:** Naslednji dan previdno dodamo v vsako epruveto po 4,5 ml očetne kisline (z 20 ml pipeto) in 1 g natrijevega bizmutata. Epruvete zamašimo in na stresalniku stresamo 30 minut v temnem papirju.
- **HIDROLIZA:** Vzorce prelijemo v male steklene epruvete in centrifugiramo 10 minut na 3000 x g. V čiste 50 ml epruvete odpipetiramo po 6 ml supernatantov, v vsako epruveto dodamo 5 kapljic 1,2 M natrijevega disulfita, 6 ml destilirane vode in 1 ml koncentrirane klorovodikove kisline (36%). Po dodatku kisline premešamo in takoj hidroliziramo reakcijske zmesi v vreli vodni kopeli 20 minut. Epruvete po hidrolizi dobro ohladimo pod hladno tekočo vodo.
- **EKSTRAKCIJA:** Vzorcem dodamo po 9 ml kloroforma, zapremo in ekstrahiramo s stresanjem na stresalniku 15 minut. Odsesamo zgornji, vodni sloj in spiramo kloroformski ekstrakt dvakrat s po 5 ml 3N raztopine natrijevega hidroksida in nato še dvakrat s po 5 ml deionizirane vode. Po vsakem spiranju odstranimo vodno fazo s sesanjem. Po zadnjem spiranju vodo dobro odločimo in organski ekstrakt sušimo s potrebno količino brezvodnega natrijevega sulfata čez noč v temi v hladilniku.

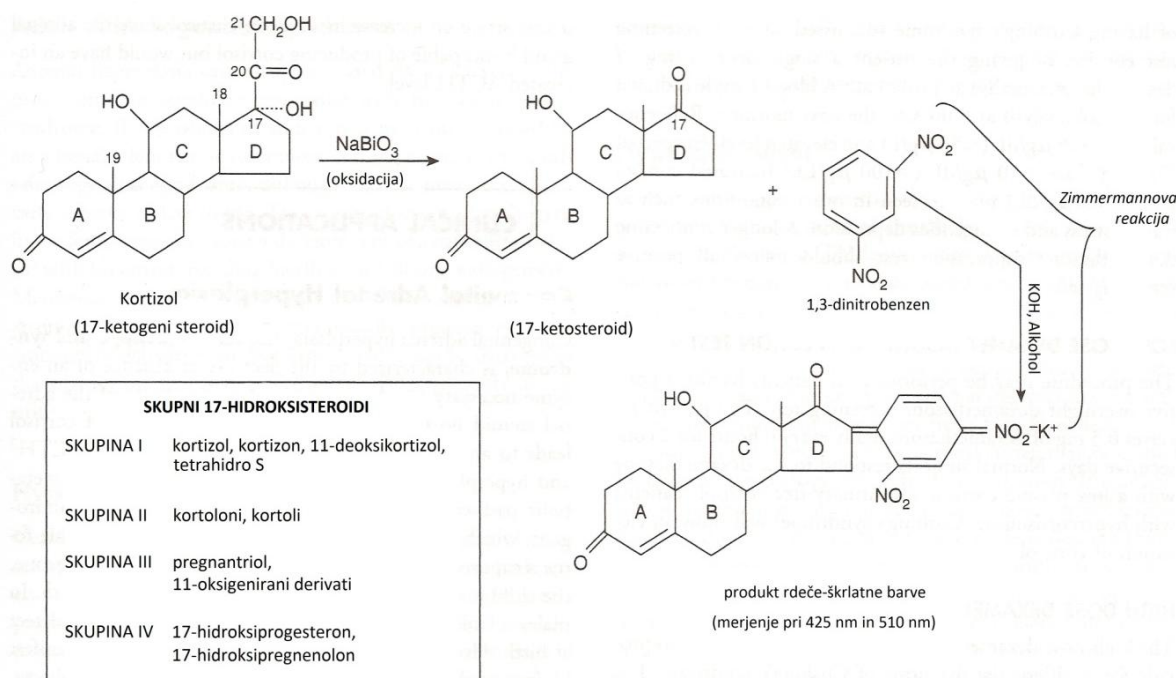
#### Tretji dan:

- **ČIŠČENJE EKSTRAKTA:** Osušen ekstrakt filtriramo v nove epruvete in odpipetiramo 6 ml v steklene epruvete z obrusi, dodamo vrelne kamenčke in previdno odparimo do suhega s pomočjo vodne kopeli v digestoriju. Sledove topila odstranimo z vakuumom.



• **RAZVIJANJE IN MERJENJE BARVE ZIMMERMANNOVIIH PRODUKTOV:**

Suhi ostanek raztopimo v 0,1 ml absolutnega etanola. Za slepi vzorec pipetiramo v dvojniku 0,1 ml absolutnega etanola v stekleni epruveti z obrusi. V vse epruvete dodamo po 0,1 ml etanolne raztopine kalijevega hidroksida in nato še po 0,1 ml Zimmermannovega reagenta (2% (w/v) etanolna raztopina 1,3-dinitrobenzena). Reakcijsko zmes dobro premešamo in zaščiteno od svetlobe razvijamo barvo 60 minut pri sobni temperaturi. Nastalim barvnim spojinam nato dodamo po 5 ml absolutnega etanola, premešamo, filtriramo in merimo absorbanco na spektrofotometru pri valovnih dolžinah 425 in 510 nm najpozneje 20 minut po razredčitvi reakcijske zmesi z absolutnim etanolom.



**Slika 16:** Metoda po Norymbersku in Applebyjevi z Zimmermannovo reakcijo za določanje skupnih 17-hidroksisteroidov v urinu (12).

- Absorbance vzorcev in volumen 24-urnega urina (ml) vnesemo v računalniški program Excel 17-OH, ki izračuna korigirano absorbanco po Gibson-Evelyn-ovi korekcijski formuli in poda koncentracije.

Shematičen prikaz dela je povzet v preglednici III.

**Preglednica III:** Shematični prikaz dela.

4,5 ml	Vzorec
20 mg	Natrijev borhidrid
17-20 ur	Redukcija na sobni temperaturi
4,5 ml	Ocetna kislina
1 g	Natrijev bizmutat
30 minut	Stresanje na stresalniku
10 minut	Centrifugiranje 3000 x g
6 ml	Supernatant
1 ml	Klorovodikova kislina
20 minut	Hidroliza v vodni kopeli pri 100°C
	Ohlajanje hidrolizata
9 ml	Kloroform
15 minut	Stresanje na stresalniku
	Spiranje, odsesavanje vodnega sloja
5 ml	3 N natrijev hidroksid
	Spiranje, odsesavanje vodnega sloja
5 ml	3 N natrijev hidroksid
	Spiranje, odsesavanje vodnega sloja
5 ml	Deionizirana voda
	Spiranje, odsesavanje vodnega sloja
5 ml	Deionizirana voda
	Spiranje, odsesavanje vodnega sloja
17-20 ur	Sušenje z natrijevim sulfatom
	Filtriranje
6 ml	Filtrat v nove epruvete
	Odporevanje, vakuumska odstranitev topila
0,1 ml	Absolutni etanol, slepa
0,1 ml	2,5 N kalijev hidroksid
0,1 ml	Zimmermannov reagent
60 minut	Razvijanje barve
5 ml	Absolutni etanol
	Merjenje absorbance, izračun

### 3.3.1.5 Izračun

**Enačba 4:** Gibson-Evelyn-ova korekcijska formula za izračun korigirane absorbance.

$$A_{\text{korigirana}} = \frac{A_{510\text{nm}} - 0,6 \cdot A_{425\text{nm}}}{0,73}$$

**Enačba 5:** Formula za izračun vrednosti 17-hidroksisteroidov.

$$17 - \text{hidroksisteroidi } (\mu\text{mol}/24 \text{ ur}) = \frac{A_{510\text{nm}} - 0,6 \cdot A_{425\text{nm}}}{0,73} \cdot 0,232 \cdot V_{24\text{urURIN}}$$

Volumen 24-urnega urina podamo pri izračunu v ml. Rezultate podajamo v  $\mu\text{mol}/24 \text{ ur}$ ;  $(\text{mg}/24 \text{ ur}) \cdot 2,759 = (\mu\text{mol}/24 \text{ ur})$ .

### 3.3.1.6 Referenčne vrednosti

Referenčne vrednosti so odvisne od starosti in spola preiskovanca.

**Preglednica IV:** Referenčne vrednosti (dU – 17-OH-steroidi, snovna koncentracija) (3).

Starost (leta)	Moški	Ženske	dU – 17OH-steroidi
0 - 5	6,3 – 18,2	6,3 – 18,2	$\mu\text{mol}/24 \text{ h}$
5 - 10	10,2 – 28,9	10,2 – 28,9	$\mu\text{mol}/24 \text{ h}$
10 - 15	14,0 – 38,9	13,2 – 36,1	$\mu\text{mol}/24 \text{ h}$
15 - 20	17,4 – 49,1	15,1 – 43,3	$\mu\text{mol}/24 \text{ h}$
20 - 25	20,6 – 57,6	17,4 – 48,5	$\mu\text{mol}/24 \text{ h}$
25 - 30	22,8 – 63,4	18,4 – 51,5	$\mu\text{mol}/24 \text{ h}$
30 - 35	23,4 – 65,4	19,0 – 52,9	$\mu\text{mol}/24 \text{ h}$
35 - 40	23,1 – 64,5	18,5 – 51,5	$\mu\text{mol}/24 \text{ h}$
40 - 45	21,7 – 55,7	17,6 – 48,6	$\mu\text{mol}/24 \text{ h}$
45 - 50	19,5 – 54,9	16,5 – 45,7	$\mu\text{mol}/24 \text{ h}$
50 - 55	17,6 – 48,8	14,8 – 42,7	$\mu\text{mol}/24 \text{ h}$
55 - 60	15,7 – 46,3	13,2 – 36,6	$\mu\text{mol}/24 \text{ h}$
60 - 65	13,8 – 39,1	11,8 – 32,5	$\mu\text{mol}/24 \text{ h}$
Nad 70	12,4 – 34,5	10,7 – 29,7	$\mu\text{mol}/24 \text{ h}$

### 3.3.1.7 Vzdrževanje sistema

Vzdrževanje sistema in ravnanje v primeru težav je opredeljeno v Navodilih za delo z aparaturom Shimadzu UV mini 1240 proizvajalca Shimadzu Corporation. Vzdrževanje se dokumentira in obvesti odgovornega vodjo skupine ali vodjo laboratorija v primeru kakršnihkoli težav in odstopanj od postavljenih kriterijev za optimalno delovanje sistema.

### 3.3.1.8 Validacija in zagotavljanje kakovosti

Validacija je dokumentiran postopek preizkušanja in potrjevanja, da katerikoli material, proces, postopek, aktivnost, sistem, oprema ali mehanizem, uporabljen pri razvoju, proizvodnji, kontroli in distribuciji, lahko dosega, dosega in bo dosegal predpisane rezultate (34).

Metoda je bila validirana na KIKKB. Kakovost predanalitske, analitske in postanalitske faze postopka zagotovimo z ustreznimi navodili (Navodila za delo z aparaturom Shimadzu UV mini 1240, Priročnik kakovosti KIKKB).

Zagotavljanje kakovosti metode določanja 17-OHS v urinu dokumentiramo dnevno v knjigo sledljivosti. Za težave, ki bi se pojavile pri izvedbi postopka, je predviden Načrt ravnanja in reševanja težav. Tehnik obvesti odgovornega vodjo skupine ali vodjo laboratorija v primeru sprememb in težav, ki jih ne more odpraviti sam, in odstopanj od postavljenih kriterijev kakovosti (34).

## 3.4 STATISTIČNE METODE

Podatke meritev 17-OHS v 24-urnem urinu smo za vsako skupino posebej (Addisonova bolezen, Cushingov sindrom, KAH, kontrole) predstavili z aritmetično sredino ( $\bar{x}$ ) in standardno deviacijo (SD) ter mediano (M) in razponom vrednosti od minimalne (min) do maksimalne (max).

**Aritmetična sredina** ali **povprečje** ( $\bar{x}$ ) je najpogosteje uporabljena srednja vrednost. Izračunamo jo tako, da seštejemo vrednosti vseh enot in vsoto delimo s številom enot (enačba 7, priloga 2). Povezana je z normalno oz. Gaussovo porazdelitvijo. Nanjo vplivajo posamezne vrednosti vsake statistične enote. Vsota vseh odklonov od aritmetične sredine je enaka nič (36). Iz vsote kvadratov odklonov od aritmetične sredine je izpeljana varianca, pomembna mera za variabilnost podatkov (37).

**Standardna deviacija (SD)** ali **standardni odklon** je kvadratni koren variance (enačba 8, priloga 2), ki je povprečje kvadratov odklonov posameznih vrednosti od aritmetične sredine (36). Standardna deviacija ima izjemen pomen med merami variiranja, ker je eden od parametrov Gaussove ali normalne porazdelitve (37).

**Mediana (M)** ali **centralna vrednost** je tista vrednost spremenljivke, od katere ima polovica enot manjše ali enake, polovica enot pa večje ali enake vrednosti spremenljivke (priloga 2). Ni povezana z nobeno teoretično porazdelitvijo in pri popolnoma normalni porazdelitvi je enaka aritmetični sredini. Uporabna je v primerih, ko je statistična spremenljivka porazdeljena nesimetrično (36).

Normalnost porazdelitve vrednosti 17-OHS za vsako skupino smo testirali s **Shapiro-Wilk testom**, saj njegovo rabo priporočajo za vzorce, ki štejejo od 3 do 2000 enot; Kolmogorov-Smirnov test je primernejši za vzorce, ki štejejo nad 2000 enot. Shapiro-Wilk test izračuna testno statistiko in pripadajočo značilost (p vrednost). Ničelna hipoteza ( $H_0$ ) predpostavlja, da je empirična porazdelitev enaka normalni porazdelitvi. Če je bila p vrednost večja od 0,05, smo ničelno hipotezo sprejeli in v nadaljnji statistični analizi uporabili parametrični test (**t-test**). Če je bila p vrednost manjša od 0,05, smo ničelno domnevo zavrnil in sprejeli alternativno hipotezo ter v nadaljnji statistični analizi uporabili neparametrični test (**Mann-Whitneyjev U-test** ali **Wilcoxonov W test z vsoto rangov**). Ugotavljali smo ali se vrednosti skupnih 17-OHS statistično značilno razlikujejo med posameznimi skupinami preiskovancev.

Rezultate smo grafično predstavili in statistično analizirali s pomočjo računalniških programov *Microsoft Office Excel 2007* ter *SPSS 16.0 for Windows*.

Pri vseh testih smo kot statistično značilno opredelili vrednost pri 5% statističnem tveganju ( $p < 0,05$ ).

## 4 REZULTATI

### 4.1 REZULTATI MERITEV 17-HIDROKSISTEROIDOV

Rezultate meritev 17-OHS v 24-urnem urinu smo prikazali v štirih preglednicah. Preiskovance smo razdelili v tri skupine bolnikov s potrjeno diagnozo motnje v delovanju nadledvične žleze in kontrolno skupino brez potrjene diagnoze. V preglednici V so zbrani preiskovanci s potrjeno diagnozo Addisonove bolezni (n=2), v preglednici VI preiskovanci s Cushingovim sindromom (n=24) in v preglednici VII preiskovanci s kongenitalno adrenalno hiperplazijo (n=8). V preglednici VIII so zbrani preiskovanci iz kontrolne skupine (n=15). V posamezne skupine smo vključili tako ženske kot moške, saj bi bile dodatno po spolu deljene podskupine premajhne za statistično obdelavo. Združitev tako moških kot žensk različnih starosti v eno skupino (glede na skupno diagnozo) smo opravičili s tem, da so preiskovanci po spolu in starosti v posameznih skupinah dokaj enakovredno zastopani. Tako definirane skupine smo v nadaljevanju statistično analizirali in primerjali med seboj.

Vsakemu preiskovancu smo določili zaporedno številko, ki se lahko zaradi večkrat oddanih vzorcev urina ponovi. Nekateri pacienti so oddali urin dvakrat zaradi funkcijskih testov in terapij. V statistično analizo smo vključili samo vrednosti 17-OHS za prvi vzorec.

**Preglednica V:** Vrednosti 17-hidroksisteroidov pri bolnikih z Addisonovo boleznijo, njihov spol, starost, bolnišnica, kjer so bili obravnavani, datum sprejema vzorca in referenčno območje glede na spol in starost.

Zap. št. preisk.	Spol	Starost (let)	Bolnišnica *	Datum sprejema vzorca	dU-17-OHS ( $\mu\text{mol}/24$ ur)	Referenčne vrednosti ( $\mu\text{mol}/24$ ur)
1 (1. vzorec)	M	30	NM	30.05.2008	24,6	23,4 – 65,4
1 (2. vzorec)	M	30	NM	30.05.2008	<b>4,4 ↓</b>	23,4 – 65,4
2 (1. vzorec)	M	46	NM	25.08.2008	<b>12,4 ↓</b>	19,5 – 54,9
2 (2. vzorec)	M	46	NM	25.08.2008	<b>7,1 ↓</b>	19,5 – 54,9

\* T = Bolnišnica Topolšica, B = Splošna bolnišnica Brežice, NM = Splošna bolnišnica Novo mesto, LJ PK = Pediatrična klinika Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, MS = Splošna bolnišnica Murska Sobota, SG = Splošna bolnišnica Slovenj Gradec, GO = Splošna bolnišnica »Dr. Franca Derganca« Nova Gorica, LJ IK = Interna klinika Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, MB = Univerzitetni klinični center Maribor

**Preglednica VI:** Vrednosti 17-hidroksisteroidov pri bolnikih s Cushingovim sindromom, njihov spol, starost, bolnišnica, kjer so bili obravnavani, datum sprejema vzorca in referenčno območje glede na spol in starost.

Zap. št. preisk.	Spol	Starost (let)	Bolnišnica *	Datum sprejema vzorca	dU-17-OHS ( $\mu\text{mol}/24\text{ ur}$ )	Referenčne vrednosti ( $\mu\text{mol}/24\text{ ur}$ )
3 (1. vzorec)	Ž	14	LJ PK	06.03.2007	<b>46,1</b> ↑	10,7 – 29,7
3 (2. vzorec)	Ž	14	LJ PK	06.03.2007	<b>40,7</b> ↑	10,7 – 29,7
4 (1. vzorec)	Ž	55	NM	28.04.2009	<b>5,19</b> ↓	13,2 – 36,6
4 (2. vzorec)	Ž	55	NM	28.04.2009	<b>5,4</b> ↓	13,2 – 36,6
5 (1. vzorec)	Ž	72	NM	08.06.2009	<b>5,37</b> ↓	10,7 – 29,7
5 (2. vzorec)	Ž	72	NM	08.06.2009	<b>6,01</b> ↓	10,7 – 29,7
6 (1. vzorec)	Ž	70	NM	09.09.2008	<b>2,7</b> ↓	10,7 – 29,7
6 (2. vzorec)	Ž	70	NM	09.09.2008	<b>6,1</b> ↓	10,7 – 29,7
7	Ž	12	SG	18.04.2007	<b>5,1</b> ↓	13,2 – 36,1
8	M	50	SG	31.07.2007	20,3	17,6 – 48,8
9	Ž	52	MS	14.09.2007	<b>7,5</b> ↓	14,8 – 42,7
10	Ž	46	GO	07.02.2008	<b>8,8</b> ↓	16,5 – 45,7
11	M	44	B	17.03.2008	<b>8,9</b> ↓	21,7 – 55,7
12	Ž	69	T	01.04.2008	<b>2,9</b> ↓	10,7 – 29,7
13	Ž	20	LJ IK	21.04.2008	<b>8,8</b> ↓	17,4 – 48,5
14	Ž	55	T	16.05.2008	16,4	13,2 – 36,6
15	Ž	16	LJ PK	20.06.2008	<b>2,8</b> ↓	15,1 – 43,3
16	M	50	T	06.01.2009	<b>5,1</b> ↓	17,6 – 48,8
17	Ž	24	SG	26.05.2009	<b>8,1</b> ↓	17,4 – 48,5
18	M	78	NM	17.07.2009	<b>4,2</b> ↓	12,4 – 34,5
19	Ž	33	T	18.01.2010	<b>15,7</b> ↓	19,0 – 52,9
20	M	18	LJ PK	28.01.2010	39,5	17,4 – 49,1
21	M	37	B	02.02.2010	<b>5,3</b> ↓	23,1 – 64,5
22	M	57	B	19.11.2010	41,3	15,7 – 46,3
23	Ž	70	B	01.06.2011	<b>10,3</b> ↓	10,7 – 29,7
24	Ž	90	B	12.07.2011	<b>5,9</b> ↓	10,7 – 29,7
25	Ž	56	LJ IK	12.09.2011	<b>1,7</b> ↓	13,2 – 36,6
26	Ž	46	B	13.09.2011	<b>3,2</b> ↓	16,5 – 45,7

\* T = Bolnišnica Topolšica, B = Splošna bolnišnica Brežice, NM = Splošna bolnišnica Novo mesto, LJ PK = Pediatrična klinika Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, MS = Splošna bolnišnica Murska Sobota, SG = Splošna bolnišnica Slovenj Gradec, GO = Splošna bolnišnica »Dr. Franca Derganca« Nova Gorica, LJ IK = Interna klinika Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, MB = Univerzitetni klinični center Maribor

**Preglednica VII:** Vrednosti 17-hidroksisteroidov pri bolnikih s kongenitalno adrenalno hiperplazijo, njihov spol, starost, bolnišnica, kjer so bili obravnavani, datum sprejema vzorca in referenčno območje glede na spol in starost.

Zap. št. preisk.	Spol	Starost (let)	Bolnišnica *	Datum sprejema vzorca	dU-17-OHS ( $\mu\text{mol}/24\text{ ur}$ )	Referenčno območje ( $\mu\text{mol}/24\text{ ur}$ )
27	Ž	63	T	19.03.2007	<b>126,3</b> ↑↑	11,8 – 32,5
28	M	18	T	03.04.2007	<b>49,5</b> ↑	17,4 – 49,1
29	M	19	B	08.04.2010	<b>49,9</b> ↑	17,4 – 49,1
30	M	61	T	14.04.2010	<b>39,7</b> ↑	13,8 – 39,1
31	Ž	62	B	08.06.2010	<b>105,4</b> ↑↑	11,8 – 32,5
32	M	54	T	15.06.2010	<b>59,2</b> ↑	17,6 – 48,8
33	M	24	B	29.06.2010	<b>73,2</b> ↑	20,6 – 57,6
34	Ž	7	MS	23.03.2011	<b>29,7</b> ↑	10,2 – 28,9

\* T = Bolnišnica Topolšica, B = Splošna bolnišnica Brežice, NM = Splošna bolnišnica Novo mesto, LJ PK = Pediatrična klinika Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, MS = Splošna bolnišnica Murska Sobota, SG = Splošna bolnišnica Slovenj Gradec, GO = Splošna bolnišnica »Dr. Franca Derganca« Nova Gorica, LJ IK = Interna klinika Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, MB = Univerzitetni klinični center Maribor

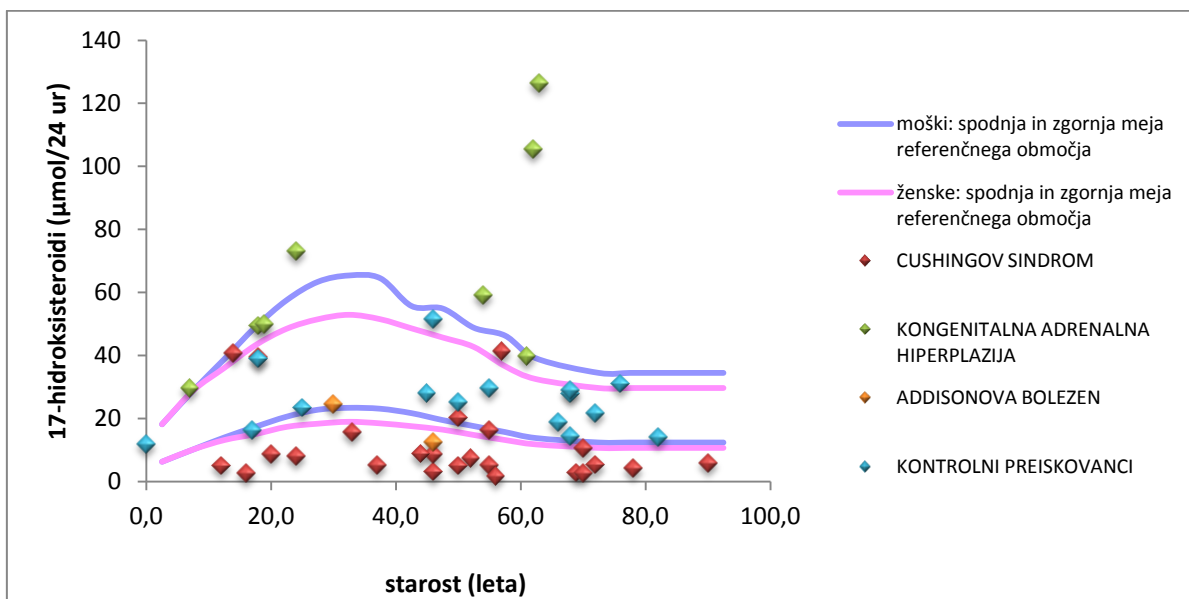
**Preglednica VIII:** Vrednosti 17-hidroksisteroidov pri kontrolnih preiskovancih, njihov spol, starost, bolnišnica, kjer so bili obravnavani, datum sprejema vzorca in referenčno območje glede na spol in starost.

Št. preisk.	Spol	Starost (let)	Bolnišnica *	Datum sprejema vzorca	dU-17-OHS ( $\mu\text{mol}/24\text{ ur}$ )	Referenčno območje ( $\mu\text{mol}/24\text{ ur}$ )
35	Ž	68	MS	25.05.2007	14,4	10,7 – 29,7
36	Ž	68	B	30.08.2007	27,9	10,7 – 29,7
37	Ž	25	LJ PK	11.09.2007	23,5	18,4 – 51,5
38	Ž	46	GO	07.02.2008	<b>51,6</b> ↑	16,5 – 45,7
39	Ž	45	GO	22.02.2008	28,1	16,5 – 45,7
40	Ž	66	T	25.02.2008	18,9	10,7 – 29,7
41	Ž	17	T	24.04.2008	16,3	15,1 – 43,3
42	Ž	68	T	28.11.2008	29	10,7 – 29,7
43	Ž	0	MB	02.12.2008	12	6,3 – 18,2
44	M	76	NM	16.03.2009	31,1	12,4 – 34,5
45	Ž	50	T	15.11.2010	25,1	14,8 – 42,7
46	Ž	55	T	15.12.2010	29,8	13,2 – 36,6
47	Ž	18	LJ PK	02.03.2011	39	15,1 – 43,3
48	Ž	72	MS	05.04.2011	21,9	10,7 – 29,7
49	Ž	82	NM	01.08.2011	14	10,7 – 29,7

\* T = Bolnišnica Topolšica, B = Splošna bolnišnica Brežice, NM = Splošna bolnišnica Novo mesto, LJ PK = Pediatrična klinika Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, MS = Splošna bolnišnica Murska Sobota, SG = Splošna bolnišnica Slovenj Gradec, GO = Splošna bolnišnica »Dr. Franca Derganca« Nova Gorica, LJ IK = Interna klinika Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, MB = Univerzitetni klinični center Maribor



Rezultate meritev vrednosti 17-hidroksisteroidov v 24-urnem urinu smo zaradi večje nazornosti prikazali tudi grafično (slika 17).



**Slika 17:** Izmerjene vrednosti 17-OHS v 24-urnem urinu (1.vzorci) pri kontrolnih preiskovancih ter pacientih s Cushingovim sindromom, Addisonovo boleznijo in kongenitalno adrenalno hiperplazijo. Označeni sta spodnja in zgornja meja referenčnega območja za moški in ženski spol.

## 4.2 ANALIZA REZULTATOV

Diagnoza motnje v delovanju skorje nadledvične žleze je bila potrjena pri 34 (69%) preiskovancih (tj. *preiskovanci s Cushingovim sindromom, kongenitalno adrenalno hiperplazijo in Addisonovo boleznijo*). Pri 15 (31%) preiskovancih diagnoza ni bila potrjena (tj. *kontrolni preiskovanci*).

Za vsako od skupin posebej in vse preiskovance skupaj smo proučili, kolikšno je absolutno število in kolikšen je relativni delež preiskovancev z zvišanimi, znižanimi ali normalnimi vrednostmi 17-OHS v 24-urnem urinu. Rezultati so prikazani v preglednici IX.

**Preglednica IX:** Absolutno število in relativni delež preiskovancev z zvišano, znižano ali normalno vrednostjo 17-hidroksisteroidov za vsako skupino posebej in vse skupaj.

	Kontrolni preiskovanci	Cushingov sindrom	Kongenitalna adrenalna hiperplazija	Addisonova bolezen	SKUPAJ
↑ vrednost 17-OHS-dU	1 (7 %)	1 (4 %)	8 (100 %)	0 (0 %)	10 (20 %)
↓ vrednost 17-OHS-dU	0 (0 %)	19 (79 %)	0 (0 %)	1 (50 %)	20 (41 %)
norm. vrednost 17-OHS-dU	14 (93 %)	4 (17 %)	0 (0 %)	1 (50 %)	19 (39 %)
n vseh preiskovancev	15 (100 %)	24 (100 %)	8 (100 %)	2 (100 %)	49 (100 %)

Nato smo za vsako od skupin preiskovancev za izmerjene vrednosti 17-OHS izračunali aritmetično sredino, standardno deviacijo in mediano. Za izračun mediane smo se odločili, ker imamo eno skupino z nenormalno porazdeljenimi podatki. Dve skupini pa imata normalno porazdelitev podatkov, zato smo računali aritmetično sredino in standardno deviacijo. Rezultati izračunov so prikazani v preglednici X.

**Preglednica X:** Število (*n*) preiskovancev, povprečna starost ± standardna deviacija in srednje vrednosti (aritmetična sredina ± standardna deviacija, mediana) 17-hidroksisteroidov za skupine bolnih in skupino kontrolnih preiskovancev.

	Kontrolni preiskovanci	Cushingov sindrom	Kongenitalna adrenalna hiperplazija	Addisonova bolezen
n preiskovancev	15	24	8	2
Povprečna starost ± SD	50,4 ± 24,9 let	47,3 ± 21,9 let	38,5 ± 23,6 let	38,0 ± 11,3 let
Aritmetična sredina ± SD 17-OHS-dU	25,51 ± 10,42 μmol/24 ur	(11,50 ± 12,10 μmol/24 ur)*	66,61 ± 33,43 μmol/24 ur	18,50 ± 8,63 μmol/24 ur
Mediana (min - max) 17-OHS-dU	25,10 (12,00 – 51,60) μmol/24 ur	6,70 (1,70 – 41,30) μmol/24 ur	54,55 (29,70 – 126,30) μmol/24 ur	18,50 (12,40 – 24,60) μmol/24 ur

\* Vrednosti 17-OHS pri bolnikih s Cushingovim sindromom se ne razporejajo po Gaussovi krivulji, zato aritmetična sredina in SD nista ustrezni statistični meri za predstavitev lastnosti skupine, ampak je ustrežnejša mediana.

V nadaljevanju nas je zanimalo ali obstajajo statistično značilne razlike naše spremenljivke, vrednosti 17-OHS v 24-urnem urinu, med skupinami preiskovancev. Da smo lahko izbrali test za testiranje hipoteze o razliki med dvema neodvisnima vzorcema, smo najprej preverili normalnost porazdelitve vrednosti 17-OHS. To smo storili z izvedbo Shapiro-Wilk testa s pomočjo programa SPSS. Rezultati so prikazani v preglednici XI.

Postavili smo hipotezi:

**H<sub>0</sub>:** Vrednosti 17-hidroksisteroidov se v proučevani skupini normalno porazdeljujejo.

**H<sub>a</sub>:** Vrednosti 17-hidroksisteroidov se v proučevani skupini ne porazdeljujejo normalno.

**Preglednica XI:** Shapiro-Wilk test normalnosti porazdelitve vrednosti 17-hidroksisteroidov za skupine bolnih in skupino kontrolnih preiskovancev.

SKUPINA PREISKOVANCEV		Shapiro-Wilk test		
		Statistika	df	Sig.
17-OHS-dU	Kontrolni preiskovanci	0,923	15	0,213
	Cushingov sindrom	0,697	24	0,000
	Kongenitalna adrenalna hiperplazija	0,900	8	0,288
	Addisonova bolezen	premajhen vzorec za izračun (df=2)		

V skupini kontrolnih preiskovancev ter v skupini s kongenitalno adrenalno hiperplazijo sta izračunani p vrednosti (sig.) večji od 0,05, zato smo ničelno hipotezo sprejeli in v nadaljnji statistični obdelavi uporabili parametrični test (t-test).

V skupini bolnikov s Cushingovim sindromom je izračunana p vrednost (sig.) manjša od 0,05, zato smo ovrgli ničelno hipotezo in privzeli alternativno hipotezo, da vrednosti 17-hidroksisteroidov niso razporejene skladno z normalno porazdelitvijo. Pri nadaljnji statistični obdelavi smo uporabili neparametrični test (Mann-Whitneyjev U-test ali Wilcoxonov *W* test z vsoto rangov).

Skupina bolnikov z Addisonovo boleznijo je premajhna in zato neprimerna za nadaljnjo statistično obdelavo.

#### 4.2.1 PRIMERJAVA SKUPINE KONGENITALNA ADRENALNA HIPERPLAZIJA S KONTROLNO SKUPINO

S parametričnim t-testom za dva neodvisna vzorca smo primerjali vrednosti 17-OHS v 24-urnem urinu med skupino preiskovancev s KAH in skupino kontrolnih preiskovancev.

Postavili smo hipotezi:

**H<sub>0</sub>:** Med kontrolnimi preiskovanci in bolniki s kongenitalno adrenalno hiperplazijo ni statistično značilne razlike v vrednosti 17-hidroksisteroidov v vzorcih urina.

**H<sub>a</sub>:** Med kontrolnimi preiskovanci in bolniki s kongenitalno adrenalno hiperplazijo je statistično značilna razlika v vrednosti 17-hidroksisteroidov v vzorcih urina.

Preden smo uporabili t-test razlike med povprečjema dveh majhnih neodvisnih vzorcev, smo z F-testom preverili domnevo o podobnosti varianc.

Izračunali smo razmerje med večjo in manjšo varianco – F eksperimentalno ( $F_{exp}$ ) ter nato določili še F tabelarično ( $F_{tab}$ ). Izračunana vrednost  $F_{exp}$  je bila večja kot kritična  $F_{tab}$  ( $F_{exp} > F_{tab}$ ), zato smo ničelno hipotezo o enakih variancah zavrnil. V nadaljnji statistični analizi nismo mogli uporabiti navadnega t-testa razlik povprečij dveh vzorcev, ampak smo uporabili t-test, ki se uporablja pri dveh vzorcih, ki imata različni varianci, t.i. Behrens-Fisherjev test (38).

Izračunali smo, da je  $t'_{exp} > t_{tab}$ , kar pomeni, da se povprečni vrednosti 17-OHS v 24-urnem urinu med obema skupinama statistično značilno razlikujeta.

Skupini smo primerjali še z neparametričnim testom in dobili isti rezultat.

Postopek obeh izračunov je prikazan v prilogi 3 in 4.

#### 4.2.2 PRIMERJAVA SKUPINE CUSHINGOV SINDROM S KONTROLNO SKUPINO

Z neparametričnim testom za dva neodvisna vzorca (Mann-Whitneyev U-test ali Wilcoxonov  $W$  test vsote rangov) smo primerjali vrednosti 17-OHS v 24-urnem urinu med skupino preiskovancev s Cushingovim sindromom in skupino kontrolnih preiskovancev.

Postavili smo hipotezi:

**H<sub>0</sub>:** Med kontrolnimi preiskovanci in bolniki s Cushingovim sindromom ni statistično značilne razlike v vrednosti 17-hidroksisteroidov v vzorcih urina.

**H<sub>a</sub>:** Med kontrolnimi preiskovanci in bolniki s Cushingovim je statistično značilna razlika v vrednosti 17-hidroksisteroidov v vzorcih urina.

Podatke obeh skupin smo uredili v skupno ranžirno vrsto. Nato smo podatke rangirali glede na to, kateri skupini so pripadali. Zatem smo sešteli range vseh enot manjšega vzorca, tako da smo dobili vsoto njihovih rangov  $T_1$ , ki je znašala 426.

V tabeli kritičnih vrednosti vsote rangov  $T$  po Wilcoxonu (37) smo poiskali kritični interval vrednosti  $T_1$  ( $n_1 = 15$  in  $n_2 = 24$ ,  $p = 0,05$ ), ki je 232 - 368. Naša vrednost  $T_1$  je bila večja od drugega števila iz tabele, zato smo ničelno domnevo zavrnil. Pri 5% tveganju smo sprejeli domnevo, da se vrednosti 17-OHS v 24-urnem urinu statistično značilno razlikujejo med skupino s Cushingovim sindromom in skupino kontrolnih preiskovancev.

Opisan postopek, skupaj s še drugim načinom izračuna testne statistike (39), je prikazan v prilogi 5.

#### 4.2.3 PRIMERJAVA SKUPINE CUSHINGOV SINDROM S SKUPINO KONGENITALNA ADRENALNA HIPERPLAZIJA

Z neparametričnim testom za dva neodvisna vzorca (Mann-Whitneyev U-test ali Wilcoxonov  $W$  test vsote rangov) smo primerjali vrednosti 17-OHS v 24-urnem urinu pri bolnikih s Cushingovim sindromom in bolnikih s kongenitalno adrenalno hiperplazijo.

Postavili smo hipotezi:

**H<sub>0</sub>:** Med bolniki s Cushingovim sindromom in kongenitalno adrenalno hiperplazijo ni statistično značilne razlike v vrednosti 17-hidroksisteroidov v vzorcih urina.

**H<sub>a</sub>:** Med bolniki s Cushingovim sindromom in kongenitalno adrenalno hiperplazijo je statistično značilna razlika v vrednosti 17-hidroksisteroidov v vzorcih urina.

Podatke obeh skupin smo uredili v skupno ranžirno vrsto. Nato smo podatke rangirali glede na to, kateri skupini so pripadali. Zatem smo sešteli range vseh enot manjšega vzorca, tako da smo dobili vsoto njihovih rangov  $T_1$ , ki je znašala 223.

V tabeli kritičnih vrednosti vsote rangov T po Wilcoxonu (37) smo poiskali kritični interval vrednosti  $T_1$  ( $n_1 = 8$  in  $n_2 = 24$ ,  $p = 0,05$ ), ki je 81 - 178. Naša vrednost  $T_1$  je bila večja od drugega števila iz tabele, zato smo ničelno domnevo zavrnil. Pri 5% tveganju smo sprejeli domnevo, da se vrednost 17-OHS v 24-urnem urinu statistično značilno razlikuje med bolniki s Cushingovim sindromom in kongenitalno adrenalno hiperplazijo.

Opisan postopek, skupaj s še drugim načinom izračuna testne statistike (39), je prikazan v prilogi 6.

#### 4.2.4 IZRAČUN DIAGNOSTIČNE OBČUTLJIVOSTI IN SPECIFIČNOSTI METODE ZA DOLOČANJE 17-HIDROKSISTEROIDOV

Na podlagi pridobljenih vrednosti 17-OHS v naši raziskavi smo izračunali in podali diagnostično občutljivost in diagnostično specifičnost določanja 17-OHS v 24-urnem urinu z modificirano metodo po Norymbersku in Applebyjevi. Pri preiskovancih z dvema oddanima vzorcema smo v izračun vključili samo vrednosti 17-OHS za 1. vzorec. Občutljivost in specifičnost običajno izražamo v odstotkih (%), redko pa ju podajamo z relativno vrednostjo.

**Diagnostično občutljivost** (angl. *sensitivity*) predstavlja delež bolnikov s preiskovano boleznijo, pri katerih je rezultat testa pozitiven. Z drugimi besedami, predstavlja verjetnost pozitivnega izida testa pri osebah, pri katerih je bolezen prisotna. Večja kot je diagnostična občutljivost testa, manjše je število lažno negativnih rezultatov. Metoda je občutljiva, kadar lahko z njo dobimo pozitiven rezultat in je bolezen resnično prisotna. Če pri preiskovancu, ki je bolan, z neko metodo ne izmerimo patološko zvišane ali znižane vrednosti, pričakujemo pa, da so vrednosti znižane ali zvišane, pravimo, da smo dobili lažno negativen rezultat. Vzroka za lažno negativen rezultat sta dva: mogoče metoda res ne zazna zvišanih ali znižanih vrednosti, ki so v vzorcu in je rezultat tudi analitsko napačen. Pogosto pa je lažno negativen rezultat vezan na biološko raznolikost in ne na samo metodo: bolnik dejansko nima patološkega parametra, ki ga pričakujemo in je rezultat z analitskega vidika pravilen (37, 42).

**Diagnostična specifičnost** (angl. *specificity*) predstavlja delež oseb, ki nimajo preiskovane bolezni in pri katerih je rezultat testa negativen. Predstavlja delež resnično negativnih dogodkov (bolniki, ki nimajo bolezni), ki smo jih pravilno ugotovili. Pri določanju diagnostične specifičnosti predvidevamo, da v vzorcu ni iskanega parametra. Če s testom dobimo pozitiven rezultat, je ta lažno pozitiven. Večja kot je diagnostična specifičnost testa, manjše je število lažno pozitivnih rezultatov (37). Če pri testiranju ni nobenega lažno pozitivnega vzorca, je diagnostična specifičnost 1 (100%). Pozitiven rezultat pri kontrolnih preiskovancih se vrednoti kot lažno pozitiven (42).

Diagnostična občutljivost je parameter, ki vrednoti sposobnost za ustrezno razvrščanje oseb z boleznijo. Diagnostična specifičnost je parameter, ki vrednoti sposobnost za ustrezno razvrščanje oseb brez bolezni.

**Enačba 6:** Formuli za izračun diagnostične občutljivosti in specifičnosti (42).

$$\text{Diagnostična specifičnost (\%)} = \frac{\text{pravilno negativni}}{\text{pravilno negativni} + \text{lažno pozitivni}} \cdot 100$$

$$\text{Diagnostična občutljivost (\%)} = \frac{\text{pravilno pozitivni}}{\text{pravilno pozitivni} + \text{lažno negativni}} \cdot 100$$

Kot pravilno pozitivne (PP) ali pravilno negativne (PN) smo ovrednotili tiste rezultate, ki so bili skladni s potrjeno ali ovrženo diagnozo motnje v delovanju skorje nadledvične žleze. Lažno pozitivni (LP) ali lažno negativni (LN) pa so bili tisti rezultati, ki so bili neskladni s potrjeno ali ovrženo diagnozo motnje v delovanju skorje nadledvične žleze (preglednica XII).

**Preglednica XII:** Opredelitev rezultatov meritev 17-OHS glede na potrjeno ali ovrženo diagnozo bolezni.

		BOLEZEN**			
		Prisotna (B+)	34	Odsotna (B-)	15
TEST* (1.vzorec)	Pozitiven (T+)	30	PP 29	LP 1	
	Negativen (T-)	19	LN 5	PN 14	

\* Določanje vrednosti 17-OHS v dU. Pozitiven rezultat testa je pomenil vrednost izven referenčnega območja, negativen rezultat testa je pomenil vrednost znotraj referenčnega območja. \*\* Bolezen skorje nadledvične žleze (Addisonova bolezen, Cushingov sindrom, kongenitalna adrenalna hiperplazija) je bila potrjena ali ovržena.

Izračun diagnostične specifičnosti in občutljivosti metode za določanje 17-OHS v dU za vse preiskovance skupaj:

$$\text{Diagnostična specifičnost (\%)} = \frac{PN}{PN + LP} \cdot 100 = \frac{14}{14 + 1} \cdot 100 = 93\%$$

$$\text{Diagnostična občutljivost (\%)} = \frac{PP}{PP + LN} \cdot 100 = \frac{29}{29 + 5} \cdot 100 = 85\%$$

Posebej smo izračunali diagnostično občutljivost še za posamezne skupine bolnikov. Kot pravilno pozitivne (PP) smo ovrednotili bodisi znižane bodisi zvišane vrednosti 17-OHS pri bolnih preiskovancih. Lažno negativne (LN) pa so bile normalne vrednosti 17-OHS pri bolnikih (preglednica XIII).

**Preglednica XIII:** Opredelitev rezultatov meritev 17-OHS glede na potrjeno diagnozo bolezni

		BOLEZEN		
		Cushingov sindrom	Addisonova bolezen	Kongenitalna adrenalna hiperplazija
TEST* (1.vzorec)	PP	20	1	8
	LN	4	1	0

\* Določanje vrednosti 17-OHS v dU. Pozitiven rezultat testa je pomenil vrednost izven referenčnega območja, negativen rezultat testa je pomenil vrednost znotraj referenčnega območja.

Izračun občutljivosti metode za določanje 17-OHS v dU za posamezne bolezni:

$$\text{Diagnostična občutljivost}_{\text{Cushingov sindrom}} (\%) = \frac{PP}{PP + LN} \cdot 100 = \frac{20}{20 + 4} \cdot 100 = 83\%$$

$$\text{Diagnostična občutljivost}_{\text{Addisonova bolezen}} (\%) = \frac{PP}{PP + LN} \cdot 100 = \frac{1}{1 + 1} \cdot 100 = 50\%$$

$$\text{Diagnostična občutljivost}_{\text{KAH}} (\%) = \frac{PP}{PP + LN} \cdot 100 = \frac{8}{8 + 0} \cdot 100 = 100\%$$



## 5 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo proučevali klinični pomen določanja skupnih 17-hidroksisteroidov (17-OHS) v dnevnem urinu pri diagnostiki bolezni nadledvične žleze. Ovrednotili smo meritve pri skupinah bolnikov s Cushingovim sindromom, kongenitalno adrenalno hiperplazijo in Addisonovo boleznijo ter pri kontrolnih preiskovancih brez motnje v delovanju nadledvične žleze.

Skupni 17-OHS predstavljajo skupino metabolitov hormonov skorje nadledvične žleze, in sicer v največji meri presnovke glukokortikoidov. Z njihovim določanjem v 24-urnem urinu lahko posredno in okvirno sklepamo na celokupno dnevno izločanje kortizola iz skorje nadledvične žleze. Pri nekaterih bolezenskih stanjih, kot je npr. KAH, večji delež skupnih 17-OHS zavzamejo presnovki 17-hidroksiprogesterona.

V petdesetih letih 20. stoletja, ko je J. K. Norymberski s sod. razvil analizni postopek za določanje skupnih 17-OHS, so drugi raziskovalci vzporedno odkrivali etiopatogenezo bolezni skorje nadledvične žleze in jo povezali z zvišanim oziroma znižanim izločanjem njenih steroidnih hormonov. Do danes so uspeli že do podrobnosti pojasniti dogajanja pri motnjah v delovanju skorje nadledvične žleze in znanje se neprestano pogloblja.

Na osnovi podatkov iz literature (1,3-5,12,16-23) smo pričakovali zvišane vrednosti 17-OHS v dnevnem urinu pri bolnikih s Cushingovim sindromom in KAH ter znižane vrednosti pri bolnikih z Addisonovo boleznijo.

V raziskavo smo vključili 2 moška bolnika z Addisonovo boleznijo, stara 30 in 36 let. Naša domneva se je potrdila. Pri obeh smo določili znižane vrednosti 17-OHS. Povprečna vrednost 17-OHS pri bolnikih z Addisonovo boleznijo je znašala 18,50  $\mu\text{mol}/24$  ur. Pri enem preiskovancu je bila vrednost 17-OHS v prvem vzorcu urina na spodnji meji referenčnega območja, v drugem vzorcu pa znižana. Žal nismo uspeli pridobiti podatka, ali je bil med prvim in drugim odvzemom vzorca urina narejen kateri od funkcijskih testov ali uvedeno zdravljenje. Te informacije bi nam omogočile bolj poglobljeno interpretacijo rezultatov. Ker sta bila v tej skupini samo dva preiskovanca, ju nismo vključili v nadaljnjo statistično analizo. Zaradi popolnoma različne narave bolezni ju tudi nismo mogli priključiti kateri od drugih dveh skupin bolnikov. Če bi imeli dostop do več podatkov o poteku in diagnostiki njune bolezni, bi lahko izvedli študijo primera (angl. *case study*).

Skupina bolnikov s Cushingovim sindromom je zajemala 24 preiskovancev, starih od 12 do 90 let (povprečje  $47,3 \pm 21,9$ ). 17 je bilo žensk in 7 moških (razmerje 2,4 : 1), kar se ujema z znanimi podatki, da je bolezen pogostejša pri ženskah. S Shapiro-Wilk testom smo ugotovili, da se podatki za 17-OHS v dnevnem urinu ne porazdeljujejo normalno, zato smo izračunali mediano, ki je znašala  $6,7 \mu\text{mol}/24 \text{ ur}$ , kar je znatno pod spodnjo mejo referenčnega intervala. Znižane vrednosti 17-OHS je imelo 19 (79%) bolnikov, zvišano vrednost ena (4%) preiskovanka, normalne vrednosti pa 4 (17%) bolniki. Rezultati meritev, razen pri eni preiskovanki, niso bili v skladu s pričakovanji, da imajo bolniki s Cushingovim sindromom zaradi hiperfunkcije skorje nadledvične žleze in posledičnega hiperkortizolizma zvečano izločanje metabolitov kortizola, kar pomeni tudi 17-OHS, v 24-urnem urinu. Lahko bi šlo za napake v predanalitski, analitski ali postanalitski fazi postopka določanja, vendar se nam zdi malo verjetno, da bi se to zgodilo pri toliko preiskovancih iz ene skupine. Morda je pri katerem izmed preiskovancev razlog v nenatančnem zbiranju urina, ko bolnik ni zbral vsega urina in smo zato določili nižje vrednosti. Vzorci so bili odvzeti v različnih ustanovah (9 slovenskih bolnišnicah), zato so lahko variacije nastopile zaradi morebitnih sprememb, ki so bile posledica različnega rokovanja z vzorci po odvzemu. Vendar predvidevamo, da so podatki z analitskega vidika pravilni in da bi rezultate lahko pojasnili z boljšim poznavanjem zgodovine bolezni naših preiskovancev, ki nam v okviru naše raziskave niso bili dostopni. Možno je, da gre pri katerem od preiskovancev za ciklični Cushingov sindrom (18), pri katerem je hiperkortizolizem periodičen in smo meritev opravili v obdobju normalne sekrecije kortizola. Šest bolnikov z znižanimi 17-OHS je starih od 70 do 90 let, vemo pa, da se bolezen najpogosteje pojavlja med 30. in 50. letom starosti. Torej gre zelo verjetno za že znane bolnike in morda je bil kateri izmed njih v preteklosti operativno zdravljen z obojestransko adrenalektomijo, ki je bila še v 70-ih letih 20. stoletja metoda izbora v terapiji Cushingovega sindroma. Bolniki so po tem posegu doživljenjsko odvisni od nadomestnega zdravljenja z glukokortikoidi in mineralokortikoidi. Peta možna razlaga za znižane vrednosti 17-OHS v urinu je, da je bil kateri ob bolnikov pred kratkim kirurško zdravljen in je sedaj v fazi, ko se še ni vzpostavilo normalno delovanje hipotalamo-hipofizno-nadledvične osi oziroma je še prisotna prehodna insuficienca osi. Šesta možnost je, da kateri bolnik prejema adrenostatično zdravilo mitotan. Točen biokemijski mehanizem delovanja mitotana ni poznan, podatki, ki so na voljo, pa kažejo, da dajanja mitotana pri človeku spremeni presnovo kortizola izven nadledvične žleze, kar zmanjša

merljive koncentracije 17-OHS v urinu, čeprav ostanejo koncentracije kortikosteroidov v plazmi nespremenjene. Očitno mitotan povzroči povečano tvorbo 6- $\beta$ -hidroksikortizola (43).

Skupino bolnikov s KAH je predstavljalo 8 preiskovancev, starih od 7 do 63 let (povprečje  $38,5 \pm 23,6$ ). Vsi so imeli zvišane vrednosti 17-OHS v urinu, v povprečju smo izmerili  $66,61 \pm 33,43$   $\mu\text{mol}/24$  ur. Od tega so imeli štiri bolniki vrednosti tik nad zgornjo mejo referenčnega območja, dve preiskovanki pa sta imeli močno zvišane 17-OHS, na kar trikratnik oziroma štirikratnik zgornje meje. Zvišane vrednosti 17-OHS pri bolnikih s KAH smo na temelju znanih podatkov iz literature predvideli. Najpogosteje je vzrok KAH dedna okvara encima 21-hidroksilaze, pri čemer se kopičijo intermedijati v biosintezi kortizola, ki se sintetizirajo pred encimskim blokom. V primeru motnje delovanja 21-hidroksilaze sta to 17-hidroksiprogesteron (17-OHP) in njegov presnovek pregnantriol; oba sodita v skupino skupnih 17-OHS. Z nadomestno glukokortikoidno terapijo skušajo zdravniki nadomestiti manjkajoč kortizol in tako preko negativne povratne zveze zmanjšati hiperstimulacijo skorje nadledvične žleze z ACTH. Pri nadzoru terapije lahko pomaga določanje 17-OHS v 24-urnem urinu. Leta 2010 je ameriško endokrinološko združenje (*The Endocrine Society*) izdalo klinične smernice za KAH (23), v katerih priporočajo za spremljanje ustreznosti odmerkov nadomestnih glukokortikoidov določanje 17-OHP (iz skupine 17-OHS), androstendiona (iz skupine 17-KS) in testosterona bodisi v vzorcih krvi, sline, urina ali na vzorcu posušene krvi na filter papirju. Testi s primerno občutljivostjo so po omenjenih smernicah imunokemijski testi ali LC/MS-MS. Cilj zdravljenja ni doseči normalen nivo 17-OHP in ostalih steroidov, ampak rahlo zvišane vrednosti. Normalen nivo bi pomenil previsoko odmerjanje glukokortikoidov. Če obravnavamo določitev 17-OHS v naši raziskavi kot približek za bolj selektivno določanje 17-OHP, lahko za štiri naše preiskovance, pri katerih smo določili mejno zvišane vrednosti 17-OHS v urinu, sklepamo, da prejemajo ustrezen odmerek glukokortikoidov. Pri dveh bolnicah, ki imata močno povišane vrednosti 17-OHS, pa bi lahko bil vzrok premajhen odmerek nadomestnih glukokortikoidov.

V skupino kontrolnih preiskovancev smo uvrstili 15 preiskovancev brez motnje v delovanju skorje nadledvične žleze. Stari so bili od 4 tednov do 82 let (povprečno  $50,4 \pm 24,9$  let). Vrednosti 17-OHS so bile pri večini znotraj referenčnega intervala, povprečno so

znašale  $25,51 \pm 10,42$   $\mu\text{mol}/24$  ur. Samo ena preiskovanka je imela zvišano vrednosti 17-OHS. Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da so normalne vrednosti 17-OHS tudi pri naših preiskovancih pravilno nakazale odsotnost motnje v delovanju skorje nadledvične žleze. Ob tem velja omeniti, da ima interval normalnih vrednosti 17-OHS v urinu širok razpon. Pri posameznem bolniku lahko vrednosti precej nihajo, pa se še zmeraj nahajajo znotraj referenčnih meja.

V naslednjem koraku smo primerjali izračunane srednje vrednosti 17-OHS v dnevnem urinu po posameznih skupinah. Mediana 17-OHS pri bolnikih s Cushingovim sindromom ( $6,7$   $\mu\text{mol}/24$  ur) in pri bolnikih z Addisonovo boleznijo ( $18,5$   $\mu\text{mol}/24$  ur) je bila nižja kot pri kontrolnih preiskovancih ( $25,1$   $\mu\text{mol}/24$  ur). Bolniki s KAH so imeli najvišjo mediano ( $54,55$   $\mu\text{mol}/24$  ur). Ob primerjavi aritmetičnih sredin smo dobili iste odnose med skupinami. Nato smo želeli ugotoviti, ali so razlike v vrednostih 17-OHS med posameznimi skupinami bolnih preiskovancev in kontrolno skupino statistično značilne ali ne (pri  $p=0,05$ ). Število bolnikov z Addisonovo boleznijo ( $n=2$ ) v našem primeru ni bilo zadostno, da bi jih lahko vključili v analizo.

S parametričnim t-testom za dva neodvisna vzorca smo primerjali skupino preiskovancev s KAH in skupino kontrolnih preiskovancev in potrdili statistično značilno razliko. Z neparametričnim testom za dva neodvisna vzorca (Mann-Whitneyjev U-test ali Wilcoxonov test vsote rangov) smo najprej primerjali skupino bolnikov s Cushingovim sindromom s skupino kontrolnih preiskovancev in ugotovili statistično značilno razliko. Zatem smo z Mann-Whitneyjevim testom ugotovili statistično značilno razliko tudi med bolniki s Cushingovim sindromom in bolniki s KAH.

Statistično pomembne razlike med posameznimi skupinami smo pričakovali, ker 17-OHS dobro korelirajo s sintezo glukokortikoidov v skorji nadledvične žleze, ki je znižana oziroma zvišana v primeru obravnavanih bolezni. Presenetila nas je skupina bolnikov s Cushingovim sindromom, ki v naši raziskavi po vrednostih 17-OHS ne odstopa navzgor, ampak navzdol. Možne razlage za to stanje smo že predstavili.

Na podlagi vrednosti 17-OHS v naši raziskavi smo za vse preiskovance skupaj izračunali 85% diagnostično občutljivost in 93% diagnostično specifičnost uporabljene metode za določanje skupnih 17-OHS po Norymbersku in Applebyjevi. Iz rezultata lahko sklepamo, da je vrednost 17-OHS v 24-urnem urinu dokaj dober diagnostični kazalec. Diagnostično

občutljivost metode smo določili tudi za vsako od diagnoz posebej; za Cushingov sindrom je znašala 83%, za Addisonovo bolezen 50% in za KAH 100%. Občutljivost, ki smo jo izračunali za Cushingov sindrom, je najbližje podatkom iz literature (44,45). Za Addisonovo bolezen je vzorec bolnikov premajhen, da bi bil lahko reprezentativen. Pri KAH pa se zdi rezultat zelo dober, vendar vemo, da imajo kar štirje (50%) preiskovanci minimalno zvišane vrednosti 17-OHS, ki bi lahko bile ob ponovitvi določitve tudi znotraj referenčnega intervala in bi bil izvid testa negativen.

Crapo L. (44) je v preglednem članku o diagnostičnih testih za Cushingov sindrom strnil rezultate osmih študij, ki so ugotavljale pomen določanja bazalne vrednosti skupnih 17-OHS v diagnostiki Cushingovega sindroma. Poročal je o 76% diagnostični občutljivosti in 95% diagnostični specifičnosti metode po Norymbersku in Applebyjevi. Lažno negativen rezultat testa je imelo 56 (23%) od 235 bolnikov s Cushingovim sindromom. V članku je povzel tudi 14 študij, v katerih so za določanje bazalne vrednosti 17-OHS uporabili Porter-Silberjevo metodo. Rezultati so bili podobni kot pri prvi metodi; diagnostična občutljivost metode je bila 89%, diagnostična specifičnost pa 88%. Lažno negativen izvid so dobili pri 11% od 311 bolnikov s Cushingovim sindromom, od 173 debelih preiskovancev pa jih je 27% imelo povišane, lažno pozitivne vrednosti 17-OHS. Na podlagi združenih podatkov 15 različnih študij je kot najboljši način določanja bazalnega izločanja kortikosteroidov v urinu navedel določanje prostega kortizola v dnevnem urinu (angl. *UFC*), ki omogoča najzanesljivejše razlikovanje med bolniki s Cushingovim sindromom in ostalimi preiskovanci. Le pri 3,3% od 479 kontrolnih preiskovancev so izmerili lažno pozitiven rezultat. Obenem pa je le 5,6% od 248 bolnikov s Cushingovim sindromom imelo normalne vrednosti UFC. Po tej metaanalizi je diagnostična občutljivost določanja UFC 94%, diagnostična specifičnost pa 97%. Zaradi nizkega števila lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov je Crapo priporočal določanje UFC kot presejalni test za Cushingov sindrom pri ambulantnih bolnikih. Kasneje sta Mengden T. in Hubmann P. s sod. (45) poročala o 100% diagnostični občutljivosti in 98% diagnostični specifičnosti določanja bazalnih vrednosti UFC za diferenciacijo med 48 bolniki s Cushingovim sindromom in 94 zdravimi z normalno telesno težo ter 95 debelimi ( $ITM > 30 \text{ kg/m}^2$ ) posamezniki. Določanje UFC so primerjali z določanjem 17-OHS po Porter-Silberjevi metodi, za katero so pokazali široko prekrivanje vrednosti 17-OHS med skupinami zdravih in bolnih, z 73% občutljivostjo in 94% specifičnostjo metode. Smernice ameriškega endokrinološkega združenja (angl. *The Endocrine Society's Clinical Guideline*) iz leta 2008 (46) priporočajo

kot prvo linijo testiranja pri sumu na Cushingov sindrom enega izmed naslednjih visoko občutljivih testov: UFC (vsaj dve meritvi), polnočno meritev prostega kortizola v slini (2 meritvi), 1 mg DMT supresijski test ali 2 mg DMT supresijski test. Določanje 17-OHS odsvetujejo zaradi visoke stopnje lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov.

Uradne klinične smernice (23,46) in novejši učbeniki interne medicine in endokrinologije (3,18) preiskave za določanje 17-OHS ne omenjajo več oziroma jo odsvetujejo ter priporočajo uporabo bolj selektivnih in občutljivejših metod, s katerimi lahko identificiramo in kvantificiramo posamezne analite v vzorcih.

Nizkemu številu vzorcev v naši raziskavi je botrovalo tudi dejstvo, da se za preiskavo iz leta v leto odloča manj zdravnikov. Videli smo, da prihajajo vzorci v večji meri iz manjših bolnišnic, kjer sami ne izvajajo hormonskih preiskav. Pričakujemo lahko, da se bo metoda v bližnji prihodnosti v Sloveniji opustila.

Ker je število preiskovancev v naši raziskavi majhno, je tudi majhna možnost, da so skupine reprezentativne in da so dobljeni izračuni dovolj točni. Poleg tega ne vemo, če in pri katerih bolnikih je bila potrjena diagnoza na novo odkrita in so meritve služile v postopku diferencialne diagnostike oziroma v kolikšni meri so bile meritve namenjene kontroli že znanih in zdravljenih bolnikov. Zavedati se moramo tudi, da pri obravnavani skupini bolnikov s Cushingovim sindromom nismo dobili pričakovanih zvišanih vrednosti 17-OHS, temveč znižane. Iz tega sledi, da lahko rezultate razlagamo le v okviru naše raziskave in iz njih ne moremo sklepati na značilnosti populacije.

Problem bi lahko rešili z večjim številom preiskovancev in več znanimi podatki (družinska anamneza, dedni dejavniki, prisotnost kliničnih simptomov in znakov, podatki o jemanju zdravil in že opravljenih kirurških posegih...), saj bi tako dobili zanesljivejše rezultate in bi lahko bolje predstavili populacijo.

Poleg ugotovitev hormonskih preiskav sta za ugotavljanje motenj v delovanju skorje nadledvične žleze posebno pomembni skrbna anamneza in klinični pregled bolnika. Pri dokončni potrditvi vrste bolezni si zdravnik dodatno pomaga s funkcionalnimi in morfološki preiskavami. Pomemben je dialog med zdravniki in laboratorijem, zlasti kadar se laboratorijski rezultati ne skladajo z izvidi ostalih preiskav.

## 6 SKLEP

Namen diplomske naloge je bil proučiti klinično uporabnost določanja 17-OHS v dnevnem urinu z modificirano metodo po Norymbersku in Applebyjevi pri diagnostiki motenj v delovanju nadledvične žleze.

Obravnavali smo 3 skupine bolnikov in kontrolno skupino ter ugotovili naslednje:

- Izločanje 17-OHS se razlikuje glede na vrsto bolezni skorje nadledvične žleze.
- Bolnika z Addisonovo boleznijo sta imela pričakovan znižan rezultat meritve 17-OHS oziroma je bila vrednost na spodnji meji normale.
- 19 (79%) bolnikov s Cushingovim sindromom je imelo znižane vrednosti 17-OHS. Le ena preiskovanka (4%) je imela zvišane 17-OHS v urinu, štirje (17%) pa niso odstopali od referenčnega območja. Pri Cushingovem sindromu smo pričakovali večji delež zvišanih vrednosti. Menimo, da bi neznačilne rezultate lahko pojasnili z boljšim poznavanjem poteka bolezni in zdravljenja. Analitske napake se nam zdijo malo verjetne.
- Pri vseh osmih bolnikih s KAH smo določili predvidene zvišane vrednosti 17-OHS.
- 14 (93%) kontrolnih preiskovancev je imelo normalne vrednosti 17-OHS, le pri eni preiskovanki je meritev rahlo odstopala navzgor.
- Med skupinami bolnikov s Cushingovim sindromom, KAH in kontrolnimi preiskovanci smo potrdili statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) v vrednostih 17-OHS.
- Za vse preiskovance skupaj je diagnostična občutljivost metode 85% in diagnostična specifičnost 93%, iz česar sklepamo, da je vrednost 17-OHS v 24-urnem urinu dokaj dober diagnostični kazalec. Diagnostična občutljivost za Cushingov sindrom je znašala 83%, za Addisonovo bolezen 50% in za KAH 100%.

Za bolj kritično in natančnejše ovrednotenje rezultatov bi potrebovali več podatkov o bolnikih. Poleg tega smo obravnavali majhno število preiskovancev. Razlog temu je gotovo tudi dejstvo, da se za preiskavo 17-OHS v urinu odloča vedno manj zdravnikov. Pričakujemo lahko, da jo bodo tudi v Sloveniji kmalu dokončno nadomestile sodobnejše, hitrejše, selektivnejše in natančnejše imunokemijske ter kromatografske metode.

## LITERATURA

1. Osredkar J: Izbrana poglavja iz klinične kemije, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2008: 16-9, 29-33, 299.
2. Štiblar Martinčič D, Cör A, Cvetko E, Marš T: Anatomija, histologija in fiziologija, 1. izdaja, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2007: 77-83.
3. Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina, 3. izdaja, Littera Picta, Ljubljana, 2005: 794-800, 850-64, 951.
4. Kocijančič A: Endokrinologija, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1987: 6-12, 204-11, 855-6.
5. Appleby JI, Norymberski JK, Gibson G, Stubbs RD: Indirect analysis of corticosteroids. 1. The determination of 17-hydroxycorticosteroids. *Biochem J.* 1955 Jul; 60 (3): 453-60.
6. Berne RM, Koepfen BM, Stanton BA: *Berne&Levy Physiology*, 6. izdaja, Mosby/Elsevier, Philadelphia, 2008: 762-4.
7. Dostopno 7. 5.2012:  
<http://apbrwww5.apsu.edu/thompsonj/Anatomy%20&%20Physiology/2010/2010%20Exam%20Reviews/Exam%205%20Final%20Review/CH%2016%20The%20Adrenal%20Glands.htm>
8. Dostopno 5.5.2012:  
<http://cmk-proxy.mf.uni-lj.si:3401/popup.aspx?aID=9140944&searchStr=hypothalamic-pituitary-adrenal%20axis>
9. Boyer R: Temelji biokemije, 2. izdaja, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 219.
10. Dostopno 7. 5. 2012:  
[http://en.citizendium.org/wiki/File:Cholesterol\\_structure\\_nomenclature\\_DEVolk.jpg](http://en.citizendium.org/wiki/File:Cholesterol_structure_nomenclature_DEVolk.jpg)
11. Dostopno 7. 5. 2012: <http://www.cyberlipid.org/cyberlip/home0001.htm>
12. Anderson SC, Cockayne S: *Clinical chemistry-concepts and applications*, popravljena izdaja, Waveland press, Long Grove, Illinois, ZDA, 2007: 521-9.
13. Dostopno 4.5.2012: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Steroidogenesis.svg>
14. Dostopno 11.5.2012: <http://ibk.mf.uni-lj.si/teaching/objave/steroidiA12.pdf>
15. Devlin TM: *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, 5. Izdaja, Wiley-Liss, New York, 2002: 907-10.



16. Nozaki O: Steroid analysis for medical diagnosis. Review. J Chromatogr A. 2001 Nov 23; 935(1-2): 267-78.
17. Štraus B: Medicinska biokemija, 2. izdaja, Medicinska naklada, Zagreb, 1992: 591-629.
18. Stewart PM: The adrenal cortex. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS eds: Williams textbook of endocrinology. 10. izdaja, WB Saunders Company, Philadelphia, 2002: 532-3.
19. Jacobs DS, Demott WR, Grady HJ, Horvat RT, Huestis DW, Kasten BL: Laboratory test handbook, 4. izdaja, Lexi-Comp, Hudson, 1996: 30, 147, 151-3.
20. Osredkar J: Endokrinologija, delovanje hormonov, 4. del, Nadledvična žleza. Predavanja iz instrumentalnih tehnik v biomedicinskih laboratorijih za študente laboratorijske biomedicine, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, študijsko leto 2007/2008.
21. Felig P, Frohman LA: Endocrinology & metabolism, McGraw-Hill, New York, London, 2001: 440.
22. Netter FH: The Ciba collection of medical Illustrations, Ciba, Summit, New York, 1965: 85, 101.
23. Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, Merke DP, Meyer-Bahlburg HF, Miller WL, Montori VM, Oberfield SE, Ritzen M, White PC: Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. J Clin Endocrinol Metab. 2010 Sept; 95(9): 4133-60.
24. Dolžan V, Trebušak-Podkrajšek K, Žerjav-Tanšek M, Stopar-Obreza M, Battelino T: Novosti v molekularni analizi kongenitalne adrenalne hiperplazije pri slovenskih bolnikih s pomanjkanjem 21-hidroksilaze. Povzetek predavanja s 1. simpozija slovenske medicinske genetike, Redke bolezni v Sloveniji. 2008.  
Dostopno 2.5.2012:  
[http://www.zmg-szd.si/javne\\_datoteke/novice/datoteke/8-povzetki.pdf](http://www.zmg-szd.si/javne_datoteke/novice/datoteke/8-povzetki.pdf)
25. Žavbi M: Modifikacija in optimizacija pogojev ekstrakcije steroidnih hormonov iz humanega tkiva. Diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, september 2010: 36-7.
26. Dostopno 6.5.2012: [http://www.abnova.com/protocol\\_pdf/KA1249.pdf](http://www.abnova.com/protocol_pdf/KA1249.pdf)

27. Špendal N: Koncentracija kortizola v slini kot pokazatelj stresa pri otrocih med manjšim operativnim posegom. Diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2009: 26-37.
28. Dostopno 7.5.2012: [http://www.idiagnostic.si/?page\\_id=45](http://www.idiagnostic.si/?page_id=45)
29. Gatti R, Antonelli G, Prearo M, Spinella P, Cappellin E, De Palo EF: Cortisol assays and diagnostic laboratory procedures in human biological fluids. Clin Biochem. 2009 Aug; 42 (12): 1205-17.
30. Dostopno 10.5.2012:  
[http://www.usbiotek.com/Downloads/information/24\\_Hour\\_Interpretation\\_Guide.pdf](http://www.usbiotek.com/Downloads/information/24_Hour_Interpretation_Guide.pdf)
31. Rauh M: Steroid measurement with LC-MS/MS in pediatric endocrinology. Mol Cell Endocrinol. 2009 Mar 25; 301 (1-2): 272-81.
32. Skitek M, Trambuš Bakija A: Priporočeni postopek za odvzem, zbiranje, stabiliziranje in transport urina, Slovensko združenje za klinično kemijo, Ljubljana, 2001: 4-15.
33. Dostopno 5.5.2012:  
<http://www.gdx.net/core/support-guides/Hormone-Sample-Selections-Support-Guide.pdf>
34. SOP Določanje 17-hidroksisteroidov v urinu, Interno navodilo za delo (dokumentacija se nahaja na delovnem mestu).
35. Dostopno 10.5.2012:  
[http://www.rometsch-heilbronn.de/index.php?Nav\\_Nummer=4&SubNav\\_Nummer=33&R=](http://www.rometsch-heilbronn.de/index.php?Nav_Nummer=4&SubNav_Nummer=33&R=)
36. Locatelli I: Urejanje in prikazovanje podatkov I. Predavanja pri predmetu farmacevtska informatika, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, študijsko leto 2011/2012.  
Dostopno 10.5.2012:  
[http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/12/em%C5%A1f-Farmaceutska\\_informatika/Locatelli\\_I.-Prikazovanje\\_podatkov.pdf](http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/12/em%C5%A1f-Farmaceutska_informatika/Locatelli_I.-Prikazovanje_podatkov.pdf)
37. Adamič Š: Temelji biostatistike, 2. izdaja, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 1995: 27-9, 34-5, 83-7, 163-4.
38. Grabnar I: Testiranje hipotez o razliki med dvema vzorcema. Predavanja pri predmetu farmacevtska informatika, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, študijsko leto 2010/2011.  
Dostopno 10.5.2012:

- [http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/12/lbm2-IPBMI/IPBMI-5\\_Testiranje\\_hipotez\\_o\\_razliki\\_med\\_dvema\\_vzorcema.pdf](http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/12/lbm2-IPBMI/IPBMI-5_Testiranje_hipotez_o_razliki_med_dvema_vzorcema.pdf)
39. Locatelli I: Vaja 5, Sklepna statistika. Vaje pri predmetu farmacevtska informatika, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, študijsko leto 2009/2010.  
Dostopno 10.5.2012:  
[http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/12/d-Farmacevtska\\_informatika/5.\\_vaja\\_-\\_predstavitev\\_2009-2010.pdf](http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/12/d-Farmacevtska_informatika/5._vaja_-_predstavitev_2009-2010.pdf)
40. Dostopno 10.5.2012:  
[http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/12/d-Farmacevtska\\_informatika/F\\_porazdelitev.pdf](http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/12/d-Farmacevtska_informatika/F_porazdelitev.pdf)
41. Dostopno 10.5.2012:  
[http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/12/d-Farmacevtska\\_informatika/t\\_porazdelitev.pdf](http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/12/d-Farmacevtska_informatika/t_porazdelitev.pdf)
42. Devetak A: Vaja 5, Biostatistika diagnostičnih testov. Vaje pri predmetu biomedicinska informatika, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, študijsko leto 2010/2011.  
Dostopno 14.5.2012:  
[http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/12/UPLB-Biomedicinska\\_informatika/5.\\_vaja\\_-\\_predstavitev.pdf](http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/12/UPLB-Biomedicinska_informatika/5._vaja_-_predstavitev.pdf)
43. Dostopno 23.5.2012:  
[http://www.ema.europa.eu/docs/sl\\_SI/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000521/WC500047235.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000521/WC500047235.pdf)
44. Crapo L: Cushing's syndrome: a review of diagnostic tests. *Metabolism*. 1979 Sept; 28(9): 955-77.
45. Mengden T, Hubmann P, Müller J, Greminger P, Vetter W: Urinary free cortisol versus 17-hydroxycorticosteroids: a comparative study of their diagnostic value in Cushing's syndrome. *Clin Investig*. 1992 Jul; 70(7): 545-8.
46. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, Montori VM: The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 May; 93(5): 1526-40.

## PRILOGA 1

KLINIČNI INŠTITUT ZA KLINIČNO KEMIJO IN BIOKEMIJO

Laboratorij za analitiko urina in spremljanje koncentracij zdravil

Njegoševa 4, 1525 Ljubljana

**IME:**

**PRIIMEK:**

### NAVODILA ZA ZBIRANJE URINA – PROSIMO PAZLJIVO PREBERITE

**Za pravilno vrednotenje preiskav urina je ključnega pomena pravilno zbiranje 24-urnega (dnevnega) urina.**

**V času zbiranje ne uživajte alkohola!**

1. Prvi dan ob določeni začetni uri (običajno zjutraj, ko vstanete) izpraznite mehur v stranišče in zabeležite točen čas

Datum: \_\_\_\_\_ Ura: \_\_\_\_\_

2. Ves naslednji urin zbirate nadaljnjih 24 ur v označeno zbiralno posodo, ki ste jo dobili v laboratoriju. Ob veliki potrebi najprej urinirajte v zbiralnik in šele nato se izčistite v stranišče.
3. Drugi dan ob določeni uri kot ste prejšnji dan urinirali v stranišče (običajno zjutraj) zadnjič izpraznite mehur v zbiralnik in zabeležite točen čas.

Datum: \_\_\_\_\_ Ura: \_\_\_\_\_

4. Med zbiranjem zbiralno posodo hranite v hladilniku ali na ledu v temnem prostoru.
5. Za izračun očistka kreatinina je potreben tudi podatek o vaši telesni višini in teži. Prosimo vpišite podatka:

Višina: \_\_\_\_\_ cm; Teža: \_\_\_\_\_ kg.

6. Nato urin čim hitreje dostavite v dobro zaprtem zbiralniku v laboratorij, kjer se natančno izmeri ter dokumentira celotna izločena količina urina. Ves vzorec se dobro premeša in iz zbiralnika se odvzameta dva vzorca z zadostno količino za zahtevane analize.

**HVALA ZA RAZUMEVANJE IN SODELOVANJE**

## PRILOGA 2

### 1. Aritmetična sredina ali povprečje

**Enačba 7:** Formula za izračun aritmetične sredine vzorca ( $\bar{x}$ ) (36).

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

### 2. Standardna deviacija ali standardni odklon

**Enačba 8:** Formula za izračun standardne deviacije vzorca ( $s$ ) (36).

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n}}{n - 1}}$$

### 3. Mediana ali centralna vrednost

Podatke uredimo v ranžirno vrsto (36):

⇒ Če je  $n$  liho število: mediana je enaka vrednosti srednje enote oziroma

- Mediana je  $m$ -ta največja vrednost, pri čemer je  $m = (n+1)/2$ .

⇒ Če je  $n$  sodo število: mediana je povprečje vrednosti srednjega para podatkov oziroma

- Mediana je povprečje  $m_{1-te}$  in  $m_{2-te}$  največje vrednosti, pri čemer je  $m_1 = n/2$  in  $m_2 = n/2 + 1$ .

## PRILOGA 3

**Tabela 1:** Podatki za t-test razlike med povprečjema dveh neodvisnih vzorcev za dve skupini preiskovancev.

	KAH	Kontrole
Število preiskovancev	$n_1 = 8$	$n_2 = 15$
Število prostostnih stopenj	$m_1 = n_1 - 1 = 7$	$m_2 = n_2 - 1 = 14$
Povprečna vrednost dU-17-OHS	$\bar{x}_1 = 66,61 \mu\text{mol}/24 \text{ ur}$	$\bar{x}_2 = 25,51 \mu\text{mol}/24 \text{ ur}$
Standardna deviacija dU-17-OHS	$s_1 = 33,43 \mu\text{mol}/24 \text{ ur}$	$s_2 = 10,42 \mu\text{mol}/24 \text{ ur}$

### 1. F-test podobnosti varianc:

$$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

$$H_a: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$$

Izračun F eksperimentalno ( $F_{exp}$ ):

$$F_{exp} = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{33,43^2}{10,42^2} = 10,29$$

F tabelarično ( $F_{tab}$ ): V tabeli distribucije F (40) smo pri dvostranskem tveganju in stopnji tveganja ( $\alpha = 0,05$ ) ter  $m_1 = 7$  in  $m_2 = 14$  odčitali:

$$F_{tab} = \text{cca. } 3,95$$

$$F_{exp} > F_{tab} (10,29 > 3,95) \rightarrow \text{privzeli smo } H_a$$

### 2. t-test za dva vzorca z različnima variancama - Behrens-Fisherjev test:

Izračun t` eksperimentalno ( $t'_{exp}$ ):

$$t'_{exp} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} = \frac{66,61 - 25,51}{\sqrt{\frac{33,43^2}{8} + \frac{10,42^2}{15}}} = 3,39$$

Izračun t tabelarično ( $t_{tab}$ ):

$n_1 \neq n_2$ , zato smo dalje računali po formulah:

$$t_{tab} = \frac{w_1 \cdot t_1 + w_2 \cdot t_2}{w_1 + w_2} = \frac{139,27 \cdot 2,36 + 13,58 \cdot 2,14}{139,27 + 13,58} = 2,34$$

$$w_1 = \frac{s_1^2}{n_1} = \frac{33,43^2}{8} = 139,27 \quad w_2 = \frac{s_2^2}{n_2} = \frac{10,42^2}{15} = 13,58$$

Iz tabele distribucije t (41) smo za dvostransko tveganje pri stopnji tveganja ( $\alpha = 0,05$ ) odčitali vrednost t: pri  $m_1 = 7$  je  $t_1 = 2,36$  ter pri  $m_2 = 14$  je  $t_2 = 2,14$ .

$t'_{exp} > t_{tab}$  ( $3,39 > 2,34$ )  $\rightarrow$  sprejmemo  $H_a$

## PRILOGA 4

**Tabela 2:** Podatki o vrednostih 17-hidroksisteroidov pri dveh skupinah preiskovancev in rangi teh podatkov.

KONTROLNI PREISKOVANCI		KONGENITALNA ADRENALNA HIPERPLAZIJA	
17-OHS –dU [μmol/24ur]	RANG	17-OHS –dU [μmol/24ur]	RANG
12	1	29,7	12
14	2	49,5	16
14,4	3	49,9	17
16,3	4	73,2	18
18,9	5	59,2	20
21,9	6	39,7	21
23,5	7	105,4	22
25,1	8	126,3	23
27,9	9	Vsota rangov manjšega vzorca T <sub>1</sub>	149
28,1	10		
29	11		
29,8	13		
31,1	14		
39	15		
51,6	19		
Vsota rangov večjega vzorca T <sub>2</sub>	127		

Izračun absolutne standardizirane vrednosti testne statistike (z njo preverjamo domnevo o razliki v vrednosti 17-OHS v dU med dvema skupinama preiskovancev):

$$z = \frac{|T_1 - n_1 \cdot (n_1 + n_2 + 1)/2|}{\sqrt{n_1 \cdot n_2 \cdot (n_1 + n_2 + 1)/12}} = \frac{|149 - 8 \cdot (8 + 15 + 1)/2|}{\sqrt{8 \cdot 15 \cdot (8 + 15 + 1)/12}} = \frac{53}{\sqrt{240}} = 3,42$$

$T_1$  = testna statistika, ki je enaka vsoti rangov manjše skupine = 149

$n_1$  = velikost manjšega vzorca = 8

$n_2$  = velikost večjega vzorca = 15

Vrednost testne statistike  $T_1$  je statistično značilna pri  $p < 0,05$ , če je njena absolutna standardizirana vrednost ( $z$ ) večja od 1,96 (vrednost testne statistike  $z$  pri dvosmernem testu pri 5% stopnji tveganja ( $\alpha=0,05$ )).  $\Rightarrow 3,42 > 1,96 \rightarrow$  privzamemo  $H_a$ , ki pravi, da obstaja statistično značilna razlika v vrednosti 17-hidroksisteroidov v dnevnem urinu med kontrolnimi preiskovanci in bolniki s kongenitalno adrenalno hiperplazijo.



## PRILOGA 5

**Tabela 3:** Podatki o vrednostih 17-hidroksisteroidov pri dveh skupinah preiskovancev in rangi teh podatkov.

CUSHINGOV SINDROM		KONTROLNI PREISKOVANCI	
17-OHS –dU [μmol/24ur]	RANG	17-OHS –dU [μmol/24ur]	RANG
1,7	1	12	19
2,7	2	14	20
2,8	3	14,4	21
2,9	4	16,3	23
3,2	5	18,9	25
4,2	6	21,9	27
5,1	7,5	23,5	28
5,1	7,5	25,1	29
5,19	9	27,9	30
5,3	10	28,1	31
5,37	11	29	32
5,9	12	29,8	33
7,5	13	31,1	34
8,1	14	39	35
8,8	15,5	51,6	39
8,8	15,5	Vsota rangov manjšega vzorca T <sub>1</sub>	426
8,9	17		
10,6	18		
15,7	22		
16,4	24		
20,3	26		
39,5	36		
40,7	37		
41,3	38		
Vsota rangov večjega vzorca T <sub>2</sub>	354		

Izračun absolutne standardizirane vrednosti testne statistike:

$$z = \frac{|T_1 - n_1 \cdot (n_1 + n_2 + 1)/2|}{\sqrt{n_1 \cdot n_2 \cdot (n_1 + n_2 + 1)/12}} = \frac{|426 - 15 \cdot (15 + 24 + 1)/2|}{\sqrt{15 \cdot 24 \cdot (15 + 24 + 1)/12}} = \frac{126}{\sqrt{1200}} = 3,64$$

$T_1$  = testna statistika, ki je enaka vsoti rangov manjše skupine = 426

$n_1$  = velikost manjšega vzorca = 15

$n_2$  = velikost večjega vzorca = 24

Vrednost statistike  $T_1$  je statistično značilna pri  $p < 0,05$ , če je njena absolutna standardizirana vrednost ( $z$ ) večja od 1,96  $\Rightarrow 3,64 > 1,96 \rightarrow$  privzamemo  $H_a$ .

## PRILOGA 6

**Tabela 4:** Podatki o vrednostih 17-hidroksisteroidov pri dveh skupinah preiskovancev in rangi teh podatkov.

CUSHINGOV SINDROM		KONGENITALNA ADRENALNA HIPERPLAZIJA	
17-OHS –dU [μmol/24ur]	RANG	17-OHS –dU [μmol/24ur]	RANG
1,7	1	29,7	22
2,7	2	49,5	27,5
2,8	3	49,9	27,5
2,9	4	73,2	30
3,2	5	59,2	29
4,2	6	39,7	24
5,1	7,5	105,4	31
5,1	7,5	126,3	32
5,19	9	Vsota rangov manjšega vzorca T <sub>1</sub>	223
5,3	10		
5,37	11		
5,9	12		
7,5	13		
8,1	14		
8,8	15,5		
8,8	15,5		
8,9	17		
10,6	18		
15,7	19		
16,4	20		
20,3	21		
39,5	23		
40,7	25		
41,3	26		
Vsota rangov večjega vzorca T <sub>2</sub>	305		

Izračun absolutne standardizirane vrednosti testne statistike:

$$z = \frac{|T_1 - n_1 \cdot (n_1 + n_2 + 1)/2|}{\sqrt{n_1 \cdot n_2 \cdot (n_1 + n_2 + 1)/12}} = \frac{|223 - 8 \cdot (8 + 24 + 1)/2|}{\sqrt{8 \cdot 24 \cdot (8 + 24 + 1)/12}} = \frac{91}{\sqrt{528}} = 3,96$$

$T_1$  = testna statistika, ki je enaka vsoti rangov manjše skupine = 223

$n_1$  = velikost manjšega vzorca = 8

$n_2$  = velikost večjega vzorca = 24

Vrednost statistike  $T_1$  je statistično značilna pri  $p < 0,05$ , če je njena absolutna standardizirana vrednost ( $z$ ) večja od 1,96  $\Rightarrow 3,96 > 1,96 \rightarrow$  privzamemo  $H_a$ .