

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Václav Hána

Steroidní metabolom ve fyziologii a patofyziologii člověka

Steroid metabolome in human physiology and pathophysiology.

Disertační práce

Školitel: Ing. Martin Hill, DrSc.

Praha, 2019

Obsah

1	Poděkování	5
2	Seznam použitých zkratk	6
3	Abstrakt	7
4	Abstract	8
5	Úvod	9
5.1	Historie poznání steroidogeneze	9
5.2	Fyziologie kůry nadledvin	9
5.2.1	Regulace adrenální steroidogeneze	9
5.2.2	Diurnální variabilita běžných steroidů	11
5.2.3	Chemická struktura steroidů a její modifikace	12
5.2.4	Enzymy steroidogenezy	14
5.2.5	Stratifikace adrenální kůry s ohledem na steroidogenezu	15
5.3	Patofyziologie kůry nadledvin	16
5.3.1	Klinicky vyjádřený Cushingův syndrom	16
5.3.1.1	Definice, incidence, klinické projevy	16
5.3.1.2	Rozdělení – typy	16
5.3.1.3	Patogeneze	17
5.3.1.4	Diagnostika	18
5.3.1.4.1	Dexametazonové testy	19
5.3.1.4.2	Půlnoční kortizol ve slinách a v séru	20
5.3.1.4.3	Volný močový kortizol/24 h (UFC)	20
5.3.1.4.4	Diferenciálně diagnostický postup při diagnóze CS	21
5.3.1.4.5	Steroidní změny	24
5.3.1.5	Léčba	25
5.3.2	Subklinický Cushingův syndrom	26
5.3.2.1	Definice	26
5.3.2.2	Diagnostika	26
5.3.2.2.1	ACTH	27
5.3.2.2.2	Diurnální profil a půlnoční hladina kortizolu	27
5.3.2.2.3	Volný močový kortizol/24 h (UFC)	27
5.3.2.2.4	Dexametazonové testy	28
5.3.2.2.5	Aberantní receptory a steroidní změny	28

5.3.2.2.6	Pooperační hypokortizolismus jako projev adrenální autonomie	29
5.3.2.2.7	Oboustranné zvětšení nadledvin	29
5.3.2.3	Komplikace subklinického CS.....	29
5.3.2.4	Léčba.....	30
5.3.3	Primární (hyper)aldosteronismus.....	31
5.3.3.1	Prevalence a rozdělení.....	31
5.3.3.2	Patogeneze	31
5.3.3.3	Projevy	31
5.3.3.4	Diagnostika a terapie	32
5.3.4	Hyperandrogenní stavy při onemocnění nadledvin	33
5.3.4.1	Karcinomy nadledvin	33
5.3.4.2	Adenomy způsobující hyperandrogenemii	34
5.3.4.3	Kongenitální adrenální hyperplazie	34
5.3.5	Incidentalomy nadledvin	36
5.4	Diagnostika funkce nadledvin	40
5.4.1	Klinické hodnocení centrální regulace sekrece glukokortikoidů u pacientů po operaci hypofýzy pomocí stimulačních testů.....	40
5.4.1.1	Inzulinový toleranční test	41
5.4.1.2	Synacthenový test.....	41
5.4.1.3	Ostatní testy centrálního hypokortikalismu	41
5.4.2	Laboratorní stanovení steroidních hormonů	42
5.4.2.1	Imunoanalytické metody	42
5.4.2.2	Hmotnostní spektrometrie	42
6	Cíle práce	46
6.1	Cíle 1. části práce – změny steroidního metabolomu u pacientů s incidentalomy nadledvin a u pacientů s Cushingovým syndromem.....	46
6.2	Cíle 2. části práce – posouzení prediktivní hodnoty bazálního kortizolu u pacientů po operaci tumorů hypofýzy.....	47
7	Metody	49
7.1	Metody stanovení hladin kortizolu a dalších steroidů u pacientů s incidentalomy nadledvin a Cushingovým syndromem	49
7.1.1	Stanovení kortizolu pomocí RIA	49
7.1.2	Stanovení steroidů pomocí GC-MS/MS.....	49
7.1.3	Stanovení ostatních analytů.....	51

7.1.4	Statistické metody.....	52
7.2	Metody stanovení adrenální funkce u pacientů po operaci expanzí hypofýzy.....	52
7.2.1	Synacthenový test.....	52
7.2.2	Inzulinový toleranční test.....	53
7.2.3	Stanovení bazálního kortizolu.....	53
8	Vlastní výsledky výzkumné práce.....	53
8.1	Změny steroidního metabolomu u pacientů s incidentalomy nadledvin.....	53
8.2	Změny steroidního metabolomu u pacientů s Cushingovým syndromem.....	58
8.3	Prediktivní hodnota bazálního kortizolu při hodnocení kortikotropní osy u pacientů po operaci hypofyzárních tumorů.....	61
9	Diskuze.....	64
9.1	Subklinický hyperkortizolismus u pacientů s incidentalomy nadledvin.....	64
9.2	Změny steroidního metabolomu u pacientů s Cushingovým syndromem.....	66
9.3	Prediktivní hodnota bazálního kortizolu při hodnocení kortikotropní osy u pacientů po operaci hypofyzárních tumorů.....	67
10	Závěry.....	70
10.1	První část práce.....	70
10.2	Druhá část práce.....	71
11	Summary.....	73
12	Vlastní publikace autora.....	74
13	Použitá literatura.....	75
14	Prohlášení.....	85
15	Identifikační záznam.....	86
16	Příloha I.....	88
17	Příloha II.....	138
18	Příloha III.....	159

1 Poděkování

Tato práce vznikla na 3. interní klinice 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a v Endokrinologickém ústavu v rámci postgraduálního doktorského studijního programu v biomedicině, v oboru Fyziologie a patofyziologie člověka.

Děkuji především svému školiteli Ing. Martinu Hillovi, DrSc. za odborné vedení studia a všestrannou podporu a pomoc.

Také děkuji celé endokrinologické skupině jmenovitě otci prof. MUDr. Václavu Hánovi, CSc. za odbornou i někdy praktickou pomoc a připomínky, MUDr. Janě Ježkové, Ph.D., MUDr. Mikuláši Kosákovi, Ph.D. a prof. MUDr. Michalovi Krškovi, CSc. za poskytnutí vzorků a konzultace.

Poděkování za podporu patří také přednostovi 3. interní kliniky 1. LF UK a VFN prof. MUDr. Štěpánu Svačinovi, DrSc., MBA a všem dalším kolegům z III. interní kliniky, kteří mi pomáhali v odborné přípravě.

Za praktickou pomoc s odběrem a zpracováním vzorků děkuji laborantkám Martě Velíkové, Ivoně Králové a Miloslavě Čechové, sestřám oddělení D1 a D2 3. interní kliniky.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat svojí rodině, své manželce Ivě a dětem, za podporu a trpělivost.

2 Seznam použitých zkratek

ACTH	adrenokortikotropní hormon
ADH	antidiuretický hormon (vasopresin)
AKR	aldo-keto reduktáza
BIPSS	bilateral petrosal sinus sampling, katetrizace petrosních splavů
BMAH	bilaterální makronodulární hyperplazie
CBG	kortizol vázající globulin
CRH	corticotropin releasing hormone
CS	Cushingův syndrom
CT	počítačová tomografie
DOC	deoxykortikosteron
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
GH	růstový hormon
hCG	lidský choriový gonadotropin
HDDST	dexametazonový supresní test s vysokou dávkou dexametazonu
HPLC	high performance liquid chromatography
HU	Hounsfield unit
ITT	inzulinový toleranční test
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LH	luteinizační hormon
MC	melanocortin
MSH	melanocyty stimulující hormon
PDE	fosfodiesteráza
POMC	pro-opiomelanokortin
PPNAD	primary pigmented adrenocortical disease
PRKACA	C α podjednotka protein kinázy A
SH	subklinický hyperkortizolismus, subklinický Cushingův syndrom
StAR	steroidogenní akutní regulační (protein)
17-OHP	17-hydroxyprogesteron

3 Abstrakt

Dřívější práce ukázaly změny ve spektru steroidů u pacientů s incidentalomy nadledvin se subklinickým hyperkortizolismem a různými formami Cushingova syndromu. Cílem této práce bylo změřit změny steroidů u těchto skupin pacientů mezi sebou a ve srovnání se zdravými kontrolami. Znalosti těchto změn umožní lepší pochopení patofyziologie steroidů u těchto chorob.

V první části práce jsme u pacientů s incidentalomy nadledvin popsali komplexní změny steroidního metabolomu u subklinického hyperkortizolizmu. Dřívější práce jiných autorů popisují pokles DHEAS u subklinického hyperkortizolizmu. Naše data tento fakt potvrzují a zároveň popisují snížení dalších androgenů a jejich metabolitů. Současně jsme porovnávali senzitivitu a specifitu hladin steroidů s běžně používanými parametry k průkazu subklinického hyperkortizolizmu. Poprvé jsme popsali změny steroidů, ke kterým dochází v 1 mg dexametazonovém testu u těchto pacientů.

U různých forem Cushingova syndromu jsme studovali změny steroidů. Potvrdili jsme snížení nadledvinových androgenů u ACTH independentních forem Cushingova syndromu, a naopak jejich zvýšení u ACTH dependentních forem. Také jsme popsali zvýšení mineralokortikoidních prekurzorů u centrální a ektopické formy Cushingova syndromu. V diferenciální diagnostice centrální a ektopické sekrece ACTH jsme pozorovali steroidní změny, které by mohly, při potvrzení v dalších studiích, pomoci k rozlišení těchto diagnóz.

V druhé části této práce jsme se zabývali použitím časného pooperačního kortizolu u pacientů po operacích hypofýzy k predikci pooperačního hypokortizolizmu. Dřívější práce ukázaly význam bazálního kortizolu zejména u skupin pacientů s velmi nízkým anebo naopak vysokým bazálním kortizolem pooperačně. Naše práce tyto poznatky potvrdila. U pacientů s pooperačními hladinami kortizolu <100 nmol/l je vysoká pravděpodobnost hypokortizolizmu s nutností trvalé substituce, ovšem vyskytly se i případy zlepšení. Na druhou stranu hladiny bazálního kortizolu >500 nmol/l s vysokou pravděpodobností umožňují bezpečné vysazení pooperační substituce glukokortikoidy. U pacientů s hladinami kortizolu mezi 100 a 500 nmol/l je pooperační substituce nutná až do definitivního posouzení ve stimulačním testu s odstupem od operace. Tato data ukázala srovnatelné výsledky našeho a jiných zahraničních endokrinologických pracovišť.

Klíčová slova: Incidentalom nadledviny, Cushingův syndrom, subklinický hyperkortizolismus, hypokortizolismus, stimulační test

4 Abstract

Many studies have shown steroid hormone changes in adrenal incidentalomas with subclinical hypercortisolism and various forms of Cushing's syndrome. The aim of our work was to measure, using novel steroid GC-MS/MS measurement procedure, complex picture of many steroids in these patients. With the knowledge of these changes we could better explain causal pathophysiologic changes.

In the study on patients with adrenal incidentalomas we described complex steroid changes in patients with subclinical hypercortisolism. Previous studies showed decrease of DHEAS in subclinical hypercortisolism. We confirmed this finding and described a decrease in other androgens and their metabolites. We also evaluated their sensitivity and specificity when compared to routinely used parameters for diagnosis of subclinical hypercortisolism. Furthermore, we looked at the alterations in all measured steroids and their changes in the 1 mg dexamethasone suppression test.

In another study, we analyzed steroid changes in various forms of Cushing's syndrome. We confirmed the decrease of adrenal androgens in the ACTH independent forms and mild increase in the ACTH dependent forms. We also described elevations of mineralocorticoid precursors in central and ectopic forms of ACTH secretion. In the distinction of ectopic and central form of CS we describe novel steroid changes that could possibly help, if confirmed by other works, in the differential diagnosis.

The second part of my work was focused on evaluating the utility of early postoperative basal cortisol levels in patients undergoing pituitary surgery to predict the central hypocortisolism. From earlier studies there were data suggesting the usefulness of morning basal cortisol levels postoperatively in patients with either sufficiently high cortisol levels or very low cortisol levels. Our data confirm these studies. In patients with postoperative cortisol levels <100 nmol/l there is a high probability of permanent hypocortisolism, but occasionally improvement can occur. On the other hand, basal cortisol levels >500 nmol/l are very safe for discontinuation of the postoperative glucocorticoid substitution therapy. In patients with cortisol levels 100 – 500 nmol/l postoperative glucocorticoid replacement is necessary until the final stimulation tests. These data confirm findings from other endocrine centers on our Czech cohort.

Keywords: adrenal incidentaloma, Cushing's syndrome, subclinical hypercortisolism, hypocortisolism, stimulation test

5 Úvod

Steroidní metabolom je soubor jednotlivých steroidů v lidském organizmu. V užším slova smyslu se jedná o steroidní hormony – mineralokortikoidy, glukokortikoidy, androgeny, estrogeny a gestageny. Množství těchto hormonů u člověka závisí na pohlaví, věku, diurnálním rytmu, vnitřních i vnějších vlivech a je orgánově specifické. Základními endokrinními orgány produkující steroidní hormony jsou kůra nadledvin a gonády. Dále však byla prokázána mírnější steroidní sekrece i v jiných orgánech a tkáních jako např. nervová tkáň – mozek, kůže, prostata, játra a další. Blíže se tomuto tématu auto- a parakrinní steroidní produkce věnuje takzvaná intrakrinologie (intracrinology) (Labrie F. et al., 2000). Nutno též zmínit exogenní podávání steroidů, zejm. glukokortikoidů za účelem imunosuprese, bronchodilatace, či jen substituce. Tato problematika zaujímá významnou část klinické praxe, nebyla však cílem naší vědecké práce a nebudeme se jí proto dále zabývat.

5.1 Historie poznání steroidogeneze

První výzkumy ukazující zásadní roli nadledvin na přežití zvířat spadají do 20. let minulého století. Ovšem terapeutické využití extraktů nadledvin začalo až po 2. světové válce v návaznosti na izolaci prvních steroidů (kortikosteronu, 11-dehydrokortikosteronu, kortizonu, kortizolu) (Hench P. S. et al., 1949). V roce 1950 byla za tento výzkum udělena Kendallovi, Henchovi a Reichsteinovi Nobelova cena za fyziologii a medicínu (de Herder W. W., 2014). Díky intenzivnímu zkoumání byla postupně objevena řada dalších produktů steroidního metabolismu. V současné době se jedná o desítky různých látek, hormonů, vyskytujících se za různých podmínek v těle v různé koncentraci. Tyto hormony jsou spolu úzce provázány v metabolických drahách řízených enzymy steroidogeneze.

5.2 Fyziologie kůry nadledvin

5.2.1 Regulace adrenální steroidogeneze

Tvorba a sekrece steroidů z nadledvin jsou z velké míry závislé na endokrinní stimulaci z jiných orgánů.

Základem regulace glukokortikoidní sekrece je stimulace osy hypotalamus-hypofýza-nadledvina. Vychází z neuronů suprachiasmatického jádra hypotalamu, které vylučováním CRH do portálního oběhu hypofýzy stimuluje sekreci ACTH. ACTH vzniká z molekuly polypeptidu (z 241 aminokyselin) pro-opiomelanocortinu (POMC), který je dále štěpen prohormon-konvertázami na β - a γ -lipotrofin a β -endorfin a ACTH (39 aminokyselin). Tato sekrece probíhá v rámci cirkadiánního (s periodou 24hodin) a ultradiánního (pod 24hodin) rytmu (Reppert S. M., Weaver D. R., 2002). Na stimulaci sekrece ACTH mají současně vliv i další hormony jako např. vasopresin, glukagon, či negativní zpětnou vazbou také pokles hladiny glukokortikoidů.

Následné působení ACTH na nadledvinu přes melanocortinový receptor 2 je realizováno na několika úrovních.

Za prvé při dlouhodobé stimulaci ACTH dochází k indukci cAMP, která dále spouští tvorbu IGF-2 (Voutilainen R., Miller W. L., 1987), EGF (Coulter C. L. et al., 1996) a FGF (Mesiano S. et al., 1991), které stimulují buněčný růst a proliferaci.

Za druhé působí ACTH přes cAMP a angiotensin přes kalcium/kalmodulinovou cestu na genomové úrovni, kde spouští tvorbu steroidogenních enzymů a kofaktorů.

Za třetí vyvolává puls ACTH rychlou adrenální odpověď v řádu minut indukci steroidogenic acute regulatory protein (StAR), který se nachází na zevní mitochondriální membráně a umožňuje transmembránový přenos cholesterolu. Ten je dále štěpen na pregnenolon, což je zásadní a kvantitu určující krok v regulaci steroidogeneze (Stocco D. M., Clark B. J., 1996). Chybí-li StAR protein, zůstává steroidogeneza na úrovni asi 14% oproti jeho přítomnosti, což vysvětluje steroidogenezi ve tkáních jako mozku či placenty, kde tento protein nalezen nebyl (Baker B. Y. et al., 2007). Na rozdíl od peptidických hormonů nedochází u steroidních hormonů k jejich skladování a pro rychlou sekreci je tedy určující tento úvodní krok, při kterém vzniká z cholesterolu pregnenolon. Další přeměna steroidů je dána expresí dalších enzymů v celé kaskádě, která je regulována řadou transkripčních faktorů jako např. (SF-1, AP-2, SP-1, SP-3, NF1C, NR4A1, NR4A2, GATA 4, GATA 6) (Parker K., Schimmer B., 1997). Hlavním koncovým glukokortikoidem u lidí je kortizol, u hlodavců je to z důvodu nepřítomnosti 17 α -hydroxylázy v nadledvině

kortikosteron, který působí zpětnovazebně na pulsatilní sekreci CRH a ACTH (Dallman M. F. et al., 1987).

Hlavní lidský mineralokortikoid aldosteron se vyvinul u živočichů v souvislosti s přechodem na souš a nutností zadržovat vodu a sodné ionty (Vinson G. P. et al., 1979). Jeho hlavní úlohou je resorpce sodíku za současné exkrece draselných a vodíkových iontů v distální části nefronu ledvin, tlustém střevě, slinných žlázách, ale v malé míře i v dalších tkáních. Sekrece aldosteronu je regulována renin-angiotensin-aldosteronovým systémem. V juxtaglomerulárních buňkách ledvin je při poklesu natremie, anebo perfusního tlaku, působením prostaglandinů štěpen prorenin na renin. Naopak negativní vliv na sekreci reninu má dopamin, atriální natriuretický peptid a angiotensin II. Renin dále štěpí angiotensinogen na angiotensin I, který je dále především v plicích štěpen angiotensin-konvertujícím enzymem na angiotensin II. Ten dále působí vasokonstrikčně přes receptory spojené s G-proteinem a současně na buňky *zóna glomerulosa* kůry nadledvin, kde stimuluje tvorbu aldosteron syntetázy a tím aldosteronu (Weir M. R., Dzau V. J., 1999). Kromě stimulace angiotensinem II je sekrece aldosteronu řízena přímo hladinou kalemie (Okubo S. et al., 1997). Menší, ale též významný vliv na stimulaci sekrece aldosteronu vykazuje ACTH. Koncentrace ACTH potřebné k stimulaci aldosteronu jsou dokonce nižší, než pro kortizol a DHEA (Daidoh H. et al., 1995). ACTH působí na aldosteron jak akutním vzestupem, tak při dlouhodobé stimulaci. Při kontinuálním podání ACTH je stimulace aldosteronu pouze přechodná, zatímco při pulsatilní aplikaci ACTH je aldosteron stimulován trvale (El Ghorayeb N. et al., 2016).

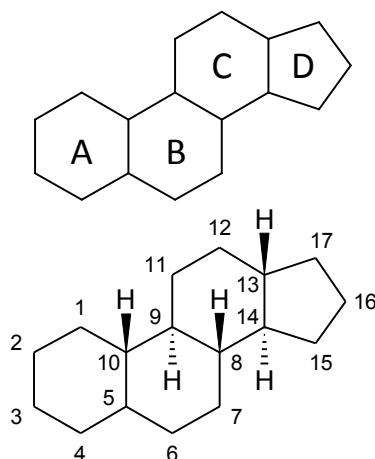
5.2.2 Diurnální variabilita běžných steroidů

Základem fyziologické sekrece řady steroidů je jejich diurnální variabilita. Je podmíněna pulsatilní sekrecí ACTH z hypofýzy. Tato sekrece probíhá v cirkadiánním (s periodou 24hodin) a ultradiánním (pod 24hodin) rytmu. Během 24 h dochází kromě bazální sekrece ACTH k přibližně 40 dalším pulsům s vzestupem ACTH v průměru o 24pg/ml během pulsu. Pulsace kortizolu korelují s pulsy ACTH a CRP. Míra odpovědi kortizolu závisí na amplitudě pulsu ACTH, nikoliv však na frekvenci, která je za fyziologických okolností stacionární. Při vyšší amplitudě pulsu ACTH dochází k vzestupu plazmatického kortizolu. Nejvyšší hladiny kortizolu a ACTH nacházíme ráno mezi 6. a 9. hodinou, a naopak nejnižší bývá kortizol v noci mezi 23

a 2.hodinou. Důvod ranního vzestupu kortizolu není zcela jasný, ale jedou z teorií je zvýšení inzulínorezistence na periférii, což následně vede k zvýšené dodávce glukózy pro mozek před probuzením. K mírným vzestupům kortizolu dochází i po jídlech (Melmed S., 2011).

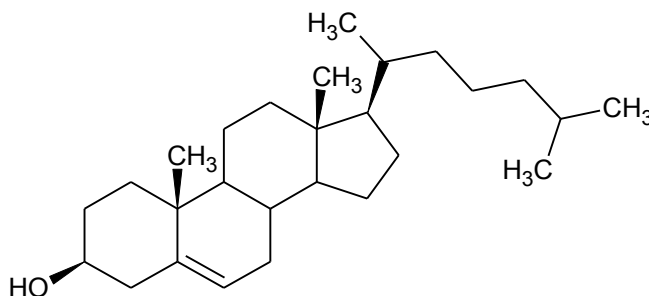
5.2.3 Chemická struktura steroidů a její modifikace

Steroidy jsou chemické organické látky odvozené ze struktury steranu (cyklopentanoperhydrofenantrenu). Ta vychází ze tří šesti-uhlíkatých a jednoho pěti-uhlíkatého cyklu. Na toto uhlíkové jádro jsou dále navázány jednotlivé atomy vodíku, hydroxy- a keto- skupiny, případně postranní řetězce jako např. u gonanů, cholesterolu v poloze C17 (Obr. 1). U vazby hydroxy- skupin rozlišujeme jejich polohu α , β .



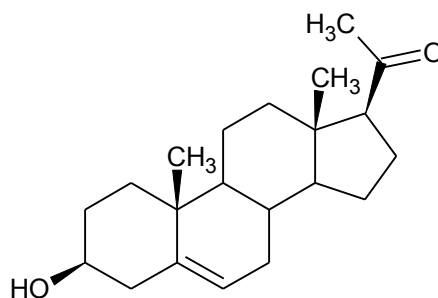
Obr. 1 Cyklopentanoperhydrofenantrenový skelet a cholesterol

Kromě steroidních hormonů, na které je zaměřena tato práce, je nutné zmínit i další časté steroidy jako cholesterol (Obr. 2), vitamin D, syntetické steroidy rostlinné fytosteroly a žlučové kyseliny.



Obr. 2 Cholesterol

Základem syntézy steroidních hormonů je odštěpení postranního řetězce cholesterolu na mitochondriální membráně dávající vznik pregnenolonu (Obr. 3) a isocaproaldehydu.



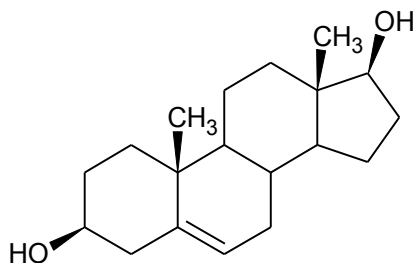
Obr. 3 pregnenolon

Ten je dále přeměňován na další steroidy v závislosti na přítomnosti a aktivitě jednotlivých enzymů. Velká část volných steroidních hormonů je sulfatována na více stabilní, polární konjugáty (např. pregnenolon sulfát, 17 β -hydroxypregnenolon sulfát, DHEA sulfát)

Vznikající steroidní hormony lze rozdělit podle počtu uhlíků na C21, C19, C18 steroidy.

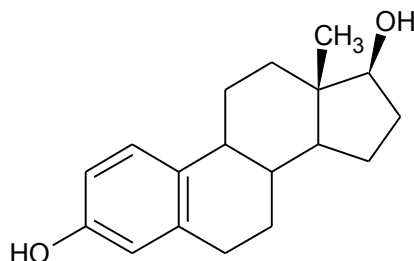
C21 steroidy (pregnany) mají na uhlíku C17 postranní dvouuhlíkatý řetězec a v poloze C10 a C13 methylové skupiny. Do této skupiny patří např. pregnenolon zmiňovaný výše (Obr. 3).

C19 steroidy (androstany) (Obr. 4) vznikají odštěpením postranního řetězce z C17 uhlíku C17, 20 lyázou. Tyto steroidy mají stejně jako C21 steroidy methylové skupiny v poloze C10, C13 a po oddělení postranního řetězce v poloze C17 navázanou keto- nebo hydroxy-skupinu.



Obr. 4 C19 steroidy (androstendiol)

C18 steroidy (estrogeny)(Obr. 5) jsou charakteristické aromatickým kruhem A (struktury steranu). Vznikají aromatizací kruhu A z androstanů a mají také v poloze C17 navázanou keto- nebo hydroxy-skupinu a v poloze C3 navázaný hydroxyl.



Obr. 5 C18 steroidy (estradiol)

5.2.4 Enzymy steroidogenezy

Většinu enzymů steroidogenezy lze rozdělit do dvou skupin: na obsahující cytochrom p450 (CYP) a hydroxysteroidní dehydrogenázy (HSD). Hydroxylace a rozštěpení vazeb mezi uhlíky katalyzované CYP jsou výhradně jednosměrné, zatímco u HSD dochází i k zpětným reakcím ($\text{-OH} \dots =\text{O}$ a naopak), často však katalyzovaným jiným enzymem či jinou izoformou enzymu (Agarwal A. K., Auchus R. J., 2005).

CYP lze rozdělit do dvou skupin, typ 1 a typ 2 (Miller W. L., 2005). Typ 1 se nacházejí v *mitochondriích* a jako zdroj elektronů využívají redukovaný NADPH, který dále předává elektrony cestou FAD a adrenodoxinu na CYP. K typu 1 patří enzym štěpící postranní řetězec cholesterolu (P450_{scc}), 2 izoenzymy 11 β -hydroxylázy (p450_{c11 β} , p450_{cAS}), enzymy 1 α - a 24- hydroxylující cholekalciferol (vitamin D) na aktivní metabolit kalcitriol.

Na druhé straně typ 2 CYP se nachází v *hladkém endoplasmatickém retikulu*. CYP typ 2 získává elektrony též z NADPH, ale cestou přes flavin adenin dinukleotid (FAD) -flavin adenin monukleotid (FMN) protein souhrnně zvaný p450 oxidoreduktáza (POR). CYP Typ 2 tvoří většinu CYP enzymů u lidí (p450_{c21}, p450_{c17}, p450_{aromataza}, cytochrom b5).

HSD využívají jako zdroj elektronů kofaktor nikotinamid a ve většině případů vedou k redukci hydroxy (OH^-) skupiny na keto ($\text{O}^=$) skupinu a naopak (Agarwal A. K., Auchus R. J., 2005). V případě 5 α -reduktáz typ 1 a 2, které ke skupině HSD též můžeme přiřadit, dochází k nasycení nenasycených dvojných vazeb do nasyceného

stavu. Ze strukturálního hlediska lze HSD rozdělit na dehydrogenázy, reduktázy krátkých řetězců (SDR) a aldo-keto reduktázy (AKR) (Miller W. L., 2005). Velká část HSD katalyzují oxidaci nebo redukci v závislosti na množství kofaktoru (NADH, NADPH) a pH a při nedostatku kofaktoru může docházet i k obratu v působení enzymu (oxidaci).

5.2.5 Stratifikace adrenální kůry s ohledem na steroidogenezu

Základem pro syntézu všech adrenálních steroidů je molekula cholesterolu. Další zpracování záleží na typu buňky, ve které se odehrává. V kůře nadledvin byly popsány 3 základní cesty steroidogeneze vycházející z lokalizace.

Produktem *zóna glomerulosa* je tvorba aldosteronu na podkladě stimulace přes receptory pro angiotensin II (AT II). Typická pro tuto zónu je exprese receptorů pro AT II, nepřítomnost 17-hydroxylázy a výlučná exprese aldosteron syntetázy (enzym z 93% geneticky blízký 11 β -hydroxyláze, schopný 11 β -hydroxylace a navíc následně 18-hydroxylace a 18-oxidace) (Mulatero P. et al., 1998).

Zóna fasciculata neexprimuje receptory pro AT II a aldosteron syntetázu. Je stimulována přes melanocortinový receptor typ 2 (MC 2) vazbou ACTH. Působením 17 α -hydroxylázy (která v nadledvině hlodavců chybí) konvertuje u člověka pregnenolon na 17 α -hydroxypregnenolon a progesteron na 17 α -hydroxyprogesteron. Nicméně cytochrom b5 je zde exprimován minimálně, což neumožňuje další konverzi 17-20lyázou tak, jak se děje v *zóna reticularis* od doby adrenarché (Suzuki T. et al., 2000). Je zde tedy produkován hlavně kortizol a malé množství kortikosteronu po stimulaci ACTH.

Zóna reticularis je též řízena přes MC 2 receptor. Na rozdíl od *zóna fasciculata* je zde nízká aktivita 21- a 11 β -hydroxylázy, a naopak vysoká exprese cytochromu b5, což ve výsledku vede k vysoké aktivitě 17-20lyasy a tvorbě DHEA. Je zde malé množství 3 β -hydroxysteroidní dehydrogenázy 2, což vede k částečné přeměně DHEA na androstendion a následně na testosteron (Suzuki T. et al., 2000).

5.3 Patofyziologie kůry nadledvin

5.3.1 Klinicky vyjádřený Cushingův syndrom

Cushingův syndrom (CS) byl pojmenován po Harvey Cushingovi, americkém chirurgovi, který jako první popsal asociaci symptomů obezity, hirsutismu, adrenální hyperplasie ve spojení s tumory hypofýzy (Cushing H. W., 1912). Kromě endogenních příčin je nutno zmínit též poměrně častý CS v širším slova smyslu vzniklý na podkladě exogenní kortikoterapie.

5.3.1.1 Definice, incidence, klinické projevy

CS je soubor symptomů vznikajících na podkladě chronického hyperkortizolizmu. Incidence endogenního CS je uváděna kolem 3 nových případů na 1 milion obyvatel za rok (Marek J., Hána V., 2017). Příznaků hyperkortizolizmu je mnoho: obezita, přibývání na hmotnosti, arteriální hypertenze, úbytek podkoží, pletora (zejm. v obličeji, na tvářích), měsícovitý obličej, fialové strie zejména nad 1 cm v průměru, hirsutismus, akné, bizoní šlje, změny menstruačního cyklu, cefalea, psychické změny, inzulinová rezistence a další. Nicméně s ohledem na nízkou specifitu těchto symptomů jsou jako klinicky přínosné zejména osteoporóza, zvýšená tvorba podkožních hematomů a proximální svalová slabost (chůze do schodů, zvedání se ze sedu, zvedání rukou nad hlavu) (Ross E. J., Linch D. C., 1982).

5.3.1.2 Rozdělení – typy

Podle etiologie dělíme endogenní CS na ACTH dependentní a ACTH independentní. ACTH dependentní CS tvoří asi 80 % endogenního CS. Nejčastěji, přibližně též v asi 80 %, bývá zapříčiněn adenomem hypofýzy produkujícím ACTH (Cushingova choroba), přičemž více jak 90% tvoří mikroadenomy (<1cm). Dále může být podmíněn ektopickou sekrecí ACTH (bronchiální a jiné karcinoid, malobuněčný karcinom plic, neuroendokrinní tumory pankreatu, medulární karcinom štítné žlázy, feochromocytom a další). Velmi vzácně je u těchto uvedených nádorů způsoben současně ektopickou sekrecí CRH a ACTH (Wajchenberg B. L. et al., 1994).

ACTH independentní CS je způsoben zvýšenou sekrecí kortizolu z nadledvin z jiných příčin, než je stimulace ACTH. Může být způsoben jednostrannou lézí

(adenom, karcinom) nebo onemocněním obou nadledvin (primary pigmented nodular adrenocortical disease, PPNAD; bilateral macronodular hyperplasia, BMAH; McCune-Albright syndrom). V případě adrenálních adenomů produkujících kortizol dochází z důvodu suprese ACTH k atrofii ostatní adrenální tkáně. To vede k nízkým hladinám ostatních steroidů např. DHEA, DHEAS.

5.3.1.3 Patogeneze

Patofyziologický proces vedoucí k vzniku adenomu hypofýzy produkujícímu ACTH (Cushingovy choroby) nebyl dosud plně objasněn. I přes intenzivní výzkum není jasné, zda vznikají primárně na podkladě změn buněk hypofýzy nebo zvýšenou stimulací z hypothalamu vedoucí k sekundární hyperplasii a adenomu hypofýzy. Nelze vyloučit ani souhru těchto dvou mechanismů. V buňkách ACTH produkujících adenomů byly popsány snížené hladiny proteinu p27, který reguluje buněčný cyklus. Příčina tohoto snížení zatím nebyla odhalena (Korbonits M. et al., 2002). Dále byly popsány chromozomální aberace v buňkách adenomů ve smyslu zisku 6p raménka chromozomu a ztráty chromozomu 2, 15q a 22 (Trautmann K. et al., 2001).

Stejně jako u Cushingovy choroby ani u primárně adrenálních lézí vedoucích k CS není plně objasněn jejich vznik. Monoklonální původ je u většiny adenomů a karcinomů, zatímco polyklonální etiologie podmiňuje adrenální hyperplasii (Beuschlein F. et al., 1994). Parentální isodisomie 11p15.5 se zvýšenou expresí inzulin-like faktoru 21 (IGF-2) při současném snížení exprese CDKN1C a tumor supresoru H19 v buňkách adrenálního karcinomu se jeví jako zásadní v tumorigenezi. U některých karcinomů je známa mutace p53 tumor supresoru a mutace β -cateninu (Sidhu S. et al., 2003). U adenomů byly prokázány mutace Ca podjednotky protein kinázy A (PRKACA), GNAS1, protein kinázy PRKAR1A podjednotky.

V případě vzácné „primary pigmented adrenocortical disease“ (PPNAD), kdy jsou obě nadledviny spíše malé, zvýšeně pigmentované, složené z malých nodulů mezi 2 a 3 mm byly asi u poloviny pacientů zjištěny mutace protein kinázy PRKAR1A podjednotky, dále mutace fosfodiesterazy (PDE) 11A, PDE 8B a PRKACA. PPNAD se většinou vyskytuje v rámci Carneyho komplexu (myxomy srdce, kůže, modré névy, uzly št. žlázy, akromegalie, adrenal rest tumory), přičemž je uváděn asi u 30 %

pacientů s tímto syndromem. Incidence bilaterální makronodulární hyperplazie (BMAH) je popisována kolem 10 % případů adrenálního CS. Velikost nodulů je >1 cm. U BMAH dochází mimo noduly k atrofii okolního kortexu. V případě naopak hyperplazie okolního kortexu mimo noduly je podle některých autorů léze označované jako AIMA. Z hlediska vzniku bývají u BMAH popisovány mutace ARMC5, MEN1, GNAS1, PDE11A, PRKACA, mutace receptorů spojených s G proteiny (receptor pro GIP, LH, hCG, β -adrenergní receptor, receptor pro angiotenzin, serotoninergní 5-HT receptor) (Lacroix A. et al., 2015; Marek J., Hána V., 2017; Stratakis C. A., Boikos S. A., 2007).

5.3.1.4 Diagnostika

Základem diagnózy CS je klinické podezření na podkladě symptomů uvedených výše. Protože jejich většina je pro CS nespecifická, je třeba vyslovené podezření potvrdit laboratorními testy. Ještě před vlastní laboratorní diagnostikou je vždy vhodné vyloučit užívání exogenních kortikoidů vedoucích často k CS, současně zvážit tzv. pseudo-Cushingův syndrom charakterizovaný „fyziologickým“ zvýšením metabolismu kortizolu ve smyslu zvýšeného set-pointu, ale obvykle zachovaného diurnálního rytmu při snížené odpovědi na dexametazon. S tím souvisí i popisované zvýšení volného močového kortizolu (Nieman L. K., 2015). Ovšem u alkoholiků byla též popsána porucha cirkadiálního rytmu (Newell-Price J. et al., 1998). Jedná se o pacienty těžce obézní, pacienty s těžkou depresivní epizodou, ve výrazném stresovém vypětí, s anorexií, těhotné ženy, pacienty s abusem alkoholu, dekompenzovaným diabetes mellitus, či vrcholové sportovce. U těchto skupin se laboratorní diagnostika doporučuje pouze v případě silného podezření na CS a přidružených symptomech s největší specificitou (snadná tvorba hematomů, proximální svalová slabost, osteoporóza).

Základními diagnostickými metodami dle platných doporučení jsou: dexametazonové supresní testy (1-mg, 2-mg 2 denní), opakované stanovení volného močového kortizolu/24 hodin, opakovaný půlnoční kortizol ve slinách či v séru (Nieman L. K., 2015; Nieman L. K. et al., 2008). V případě positivity alespoň dvou z těchto různých testů uvažujeme diagnózu CS za potvrzenou.

S ohledem na různé metody stanovení kortizolu v séru, slinách, moči je nutné zmínit určitá specifika jednotlivých metod. Nejčastěji používané imunoanalýzy založené na vazbě protilátky mohou podávat zkreslené výsledky při zkřížené reaktivitě metabolitů kortizolu a syntetických glukokortikoidů. Naopak metody založené na hmotnostně strukturální detekci jako HPLC, LC-MS/MS, GC-MS/MS toto zkreslení obvykle nevykazují, mají často nižší referenční rozmezí než imunoassay avšak příprava vzorků u těchto metod je náročnější (Lin C.-L. et al., 1997). Estrogeny zvyšují hladiny cortisol binding globulinu (CBG). To je významné v případě stanovení sérového kortizolu, kdy je nutné vyloučit užívání estrogení léčby např. kontraceptiv, která často vedou k mylné suspekci na hyperkortizolismus při normálních hodnotách volného kortizolu, ale zvýšení celkového kortizolu vlivem zvýšení vazebného CBG.

5.3.1.4.1 Dexametazonové testy

Principem dexametazonových testů je zpětnovazebná inhibice sekrece CRH, ACTH, kortizolu po podání exogenního kortikoidu. Pro základní diagnostiku CS je testem volby „overnight“ 1 mg dexametazonový test s nízkou dávkou dexametazonu. Praktické provedení spočívá v užití 1mg dexametazonu v 23h s následným odběrem kortizolémie v 8h ráno. Na některých pracovištích je preferován 2 mg 2 denní dexametazonový test. Provádí se užitím 0,5 mg dexametazonu po 6 hodinách v 6, 12, 18, 24h 2 dny po sobě s následným odběrem ranního kortizolu v 8h. Jeho výhoda spočívá např. ve větší jistotě užití a absorpci dexametazonu oproti jednorázovému užití v 1 mg testu.

Pro oba testy je hladina kortizolu vylučující CS (kromě vzácné cyklické formy) <50 nmol/l (<1.8 μ g/dL), naopak hladina >138 nmol/l diagnózu CS podporuje. S výhodou je současné stanovení hladin dexametazonu v séru (vyloučí non-compliance, lékovou interakci s metabolismem dexametazonu např. rifampicin, carbamazepin, zvýšené odbourávání při indukci jaterních enzymů u alkoholiků), které však není v naší podmínkách běžné dostupné (Meikle A. W., 1982). Zvýšené hladiny v 1mg dexametazonovém testu jsou popisovány až u 50% žen užívajících kontraceptiva (Nickelsen T. et al., 2009). V případě nutnosti provedení tohoto testu se doporučuje vysazení kontraceptiv min. 6 týdnů před testováním.

5.3.1.4.2 Půlnoční kortizol ve slinách a v séru

Stanovení hladiny půlnočního kortizolu vychází z fyziologického mechanismu diurnální variability jeho hladin. U zdravých jedinců začíná mezi 3. a 4. hodinou stoupat hladina kortizolu vrcholící maximem kolem 7-9. hodiny. U pacientů s CS k nočnímu poklesu nedochází. Odběr slin či krve se provádí obvykle mezi 23. hodinou a půlnocí. K vyloučení stresu z odběru je výhodnější odběr slinného kortizolu nebo zavedení kanyly během dne s provedením nočního odběru z kanyly.

Normy koncentrací kortizolu se liší v závislosti na pracovišti a způsobu stanovení ve slinách či séru. Diagnostická hladina pro CS získaná ze souboru 230 pacientů s CS a 23 s pseudo-Cushingovým syndromem v NIH je >207 nmol/l (7.5 μ g/dl) v séru (Papanicolaou D. A. et al., 2009). Jako nejpřesnější metoda stanovení slinného kortizolu je v USA uváděna ELISA a LC-MS/MS. Při použití těchto metod lze očekávat u zdravých osob kortizol mezi 23 a půlnocí pod 145 ng/dl (4 nmol/l) (Baid S. K. et al., 2007). Před odběrem slin je důležité nekouřit v den odběru a odběr provést před čištěním zubů. U pacientů s depresí a obezitou bývá obvykle zachována diurnální variabilita což umožňuje použití tohoto stanovení v diagnostice. Naopak u pacientů pracujících v noci, ve směnném provozu není tento test vhodný.

5.3.1.4.3 Volný močový kortizol/24 h (UFC)

Stanovení odpadů volného močového kortizolu za 24h odpovídá sekreci kortizolu během 24h. Měříme volný kortizol, tedy nezávislý na CBG, což vylučuje ovlivnění medikací měnící hladiny CBG. Oproti dříve používaným 17-hydroxykortikosteroidům vykazuje UFC vyšší senzitivitu a specifitu (Mengden T. et al., 1992). Při renální insuficienci středního a vyššího stupně (clearance kreatininu pod 1 ml/s.) může docházet k falešně negativním výsledkům vlivem snížené renální filtrace kortizolu (Chan K. C. A., 2004). U některých pacientů s nízkou aktivitou hyperkortizolizmu při CS může být hladina UFC falešně negativní a proto je vhodné použití jiných testů (Kidambi S. et al., 2007).

Při pití nad 3l tekutin se fyziologicky zvyšuje volný močový kortizol (Mericq M. V., Cutler G. B., 1998). Při nesprávném sběru moči může být hodnota močového kortizolu falešně zvýšená stejně jako v případě pseudo-Cushingova syndromu (viz

výše). Z těchto důvodů bývá některými autory pro diagnózu CS cestou měření UFC doporučován trojnásobek horního limitu normy. V případě subklinického Cushingova syndromu bývají sekrece a odpady kortizolu do moči pouze mírně zvýšené, a proto je vhodné použít jiných testů (půlnoční kortizol, dexametazonové testy).

5.3.1.4.4 Diferenciálně diagnostický postup při diagnóze CS

Při potvrzení diagnózy CS je dalším krokem diferenciální diagnostika původu hyperkortizolémie (Tabulka 1). Není-li však diagnóza CS spolehlivě provedena, je velmi zavádějící pokračovat v diferenciální diagnostice.

Tabulka 1. Příčiny hyperkortizolismu a jejich procentuální zastoupení (Isidori A. M. et al., 2006; Lacroix A. et al., 2015)

Diagnóza	Procentuální zastoupení
ACTH dependentní CS	80
Cushingova choroba	68
Ektopická sekrece ACTH	12
Ektopická sekrece CRH	<<1
ACTH independentní CS	20
Adenom nadledviny	10
Karcinom nadledviny	8
Mikronodulární hyperplazie nadledviny	<1
Makronodulární hyperplazie nadledviny	<1
Pseudo-Cushingův syndrom	1
Těžká depresivní fáze	1
Alkoholismus	<<1

K odlišení primárně adrenální příčiny CS od ACTH dependentní formy CS je rozhodující stanovení hladiny ACTH. ACTH kolísá během dne obdobně jako hladiny kortizolu. Maxima dosahuje v ranních hodinách a poté klesá. Norma ve VFN je 10 - 60ng/l (IRMA). Odběr provádíme obvykle v ranních hodinách, i když teoreticky ideální

by byl odběr kolem půlnoci, kdy jsou hladiny ACTH u zdravých nejnižší, ale u ACTH dependentního CS jsou trvale vysoké jako v ranních hodinách (Van Cauter E., Refetoff S., 1985). Hodnoty pod 5ng/l svědčí pro ACTH independentní CS, naopak nad 20ng/l pro ACTH dependentní formu CS. Při hodnotách mezi 5 a 20 ng/l lze odběr ACTH zopakovat, nebo provést CRH test, při kterém adrenální (a též ektopické) formy CS obvykle nereagují na podaný CRH ve 45. minutě.

V případě ACTH independentní formy CS obvykle přistupujeme k zobrazení nadledvin nejčastěji pomocí CT. V případě nálezu zvětšení – hyperplazie/tumor dále hodnotíme nativní denzitu. Hodnoty <10 Hounsfieldových jednotek při nativním scanu téměř vylučují maligní etiologii. V některých případech je možno k zobrazení nadledvin případně provést MR, nebo PET-CT. Blíže je diagnostický algoritmus adrenálních lézí popsán v sekci 5.3.5 incidentalomy nadledvin.

Při průkazu ACTH dependentní formy dále rozlišujeme hypofyzární a ektopický původ ACTH. V případě ektopické formy CS je sekrece ACTH obvykle vyšší, bývají vyšší odpady močového kortizolu, častější hypokalemie. Bylo též popsáno častější neúplné štěpení POMC na pro-ACTH a další produkty u ektopických forem ACTH (Oliver R. L. et al., 2003; Stewart P. M. et al., 1994). Nejčastěji se jedná o tumory plic v asi 50% (karcinoidy 30%, malobuněčný karcinom 20%), dále mimoplicní karcinoidy 20%, medulární karcinom 7,5%, feochromocytom 2,5% (Isidori A. M. et al., 2006). K odlišení častější Cushingovy choroby (5:1) od ektopické formy používáme dexametazonový supresní test s vysokou dávkou dexametazonu (HDDST). Využívá principu relativní, částečné odpovědi (pokles kortizolu) u Cushingovy choroby oproti téměř úplné rezistenci na dexametazon u ektopických forem CS (Liddle G. W., 1960). Jeho provedení spočívá v podání 2mg dexametazonu po 6 hodinách 2 dny po sobě, nebo jednorázově 8mg v 23 h (v závislosti na pracovišti) s odběrem krve na kortizol (příp. ACTH, hl. dexametazonu) v 8-9 h třetí den ráno. Hodnoty kortizolu <138 nmol/l (5 µg/dl) odpovídají obvykle Cushingově chorobě, nebo hodnocení poklesu pod 50% bazální hodnoty (2 denní podávání dexametazonu) s senzitivitou 60-80%, vysokou specificitou (Aron D. C. et al., 1997). Další možností je hodnocení (při jednorázovém podání 8mg dexametazonu v 23 h) % poklesu při odběru v 8,30h po dexametazonu/bazální kortizol v 8,30h ráno před podáním dexametazonu. Při cut-off 68% byla zjištěna 71%

senzitivita a 100% specificita (Dichek H. L. et al., 1994). Dalším testem k odlišení forem ACTH dep. CS je test s kortikoliberinem (CRH). Prováděn je buď samostatně, nebo v rámci katetrizace petrosních splavů.

V rámci diferenciální diagnostiky při pozitivní supresi v HDDST a jasném nález adenomu (>6 mm) na MR je možné provést neinvazivně CRH test a v případě positivity indikovat operaci hypofýzy. V případě nekonklusivních výsledků se doporučuje provedení katetrizace petrosních splavů. Falešně pozitivní reakce ektopických forem v HDDST a/nebo CRH testu je popisována u 3-14% případů (Isidori A. M. et al., 2006). Konkrétní postupy se též liší podle pracoviště. Provedení samostatného CRH testu spočívá v podání 100 µg CRH (ovčí dostupný v USA, rekombinantní lidský dostupný v Evropě). Odběry na ACTH a kortizol jsou provedeny v čase -15, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 min. s maximem ACTH obvykle po 30 minutách, kortizolu po 30-60 minutách (DeCherney G. S. et al., 1985). Hodnocení se liší v závislosti na použitém preparátu a pracovišti. Při použití lidského CRH (používaného v ČR) měl vzestup ACTH v 15.min (oproti bazální hodnotě v čase 0) $\geq 43\%$ senzitivitu 83% a specificitu 94% (Ritzel K. et al., 2015). Při srovnání průměrného vzestupu kortizolu v čase 15 a 30 minut (oproti průměru 0 a -15) po aplikaci humánního CRH, cut-off 14% byla senzitivita 85% a specificita 100%, zatímco nejvyšší vzestup ACTH s cut-off 105% prokázal pouze 70% senzitivitu při 100% specificitě (Newell-Price J. et al., 2002).

Katetrizace petrosních splavů (BIPSS) je tzv. zlatý standard v diferenciální diagnostice ACTH dependentního Cushingova syndromu. Provádí zavedením katetrů cestou a. femoralis, iliaca, v. cava inferior et superior do spodních petrosních splavů na obou stranách. Důležité je správné uložení konců katetrů, proto ještě v oblasti bulbus v jugularis je krev již značně naředěna. ACTH je odebráno z periferie i obou katetrů v čase 0; 2,5; 5;10 minut. Gradient sinus petrosus inf./periferie > 2 bazálně, nebo > 3 po stimulaci CRH svědčí pro hypofyzární zdroj ACTH. Při rešerši hlavních prací hodnotících BIPSS byla zjištěna senzitivita 96% a specificita 100% tohoto testu (Newell-Price J. et al., 1998). Jinými slovy pozitivní BIPSS svědčí výrazně pro Cushingovu chorobu. Naopak negativní BIPSS ji plně nevylučuje (Isidori A. M. et al., 2006).

5.3.1.4.5 Steroidní změny

Odlišnosti steroidní sekrece ACTH dependentních a independentních forem CS spočívají v rozdílné patofyziologii. Zatímco u ACTH dependentních forem je steroidní sekrece řízena především ACTH, u ACTH independentního (adrenálního) CS je aktivita jednotlivých enzymů steroidogeneze na ACTH převážně nezávislá. Většina prováděných studií zabývajících se steroidním metabolomem (spektrům steroidů) porovnávala hladiny močových steroidů a jejich metabolitů při sběru za 24 hodin. U Cushingovy choroby byly popsány zvýšené odpady (vedle kortizolu) deoxykortikosteronu, kortikosteronu (tedy prekursorů aldosteronu v mineralokortikoidní dráze), 17-hydroxypregnenolonu, a DHEA. U adrenální formy byl též zvýšený kortikosteron, mírně snížený DHEA (Schöneshöfer M. et al., 1986). Při porovnání adrenálních adenomů (smíšená skupina horm. aktivních i inaktivních rozlišená dle odpadů kortizolu/24 h, renin, aldosteron, DHEAS v séru) vůči zdravým kontrolám bylo zjištěno signifikantní snížení androgenních metabolitů (pouze u horm. inaktivní části pacientů): androsteron, etiocholanolon, dále zvýšení glukokortikoidních metabolitů (obě skupiny horm. aktivních i inaktivních adenomů), bez signif. změn mineralokortikoidních prekursorů i metabolitů (Arlt W. et al., 2011). U pacientů s Cushingovou chorobou bylo v moči pozorováno zvýšení androstanů – androsteron, etiocholanolon, DHEA, 16 α -hydroxy-DHEA, 5-pregnenetriol, pregnandiol a metabolitů kortizolu (6 β -hydroxykortizol, tetrahydrokortizol, 5 α -tetrahydrokortizol, 11 β -hydroxyandrosteron, 11 β -hydroxyetiocholanolon, β -kortol, kortizon, α -kortolon, β -kortolon, 11 oxo-etiocholanolon. Naproti tomu pacienti s CS při adenomu nadledviny měli androgeny snížené. Statisticky signifikantní rozdíl byl nalezen u etiocholanolonu, 11 β -hydroxyandrosteronu, α -kortolonu (Hines J. M. et al., 2017). Též v jiné práci byla u pacientů s CS při adenomech nadledviny zjištěna zvýšená exkrece 11-deoxykortizolu, kortizolu, 18-hydroxykortizolu, a metabolitů kortizonu (Kikuchi E. et al., 2000). Studie zaměřená na pacienty po adrenalektomii pro adrenální CS ukázala na pravděpodobný útlum C17-20 lyázy při opožděném obnovení hladin DHEA oproti kortizolu a jeho prekursorům (Nawata H. et al., 1985). Snížené adrenální androgeny potvrzuje i další publikace vycházející z měření hladin v plazmě, která zároveň zjistila snížení aldosteronu u ACTH dep. CS a současné nízký 18-oxo-kortizol u ektopické formy ACTH dep. CS (Eisenhofer G. et al., 2018).

Při porovnání pacientů s „ACTH independentní makronodulární hyperplazií“ (AIMAH) se subklinickým CS a plně vyjádřeným CS byly u plně vyjádřené formy CS zjištěny vyšší bazální hladiny kortizolu i 17-hydroxyprogesteronu, ale jejich menší vzestup po stimulaci ACTH. Hladiny kortizolu v 60. minutě po stimulaci byly u obou skupin srovnatelné. Všichni pacienti měli nízký DHEAS (Libé R. et al., 2010).

Shrnutí výše uvedených změn u různých forem CS: pacienti s Cushingovou chorobou mají zvýšené močové odpady prekurzorů aldosteronu, zatímco aldosteron byl v plazmě nižší. Stejně tak mají zvýšené odpady androstanů, kortizolu i metabolitů obou těchto skupin. Naproti tomu pacienti s ACTH independentním CS mají hladiny i odpady androstanů snižené, což však nebylo prokázáno ve všech zmiňovaných pracích (Arlt W. et al., 2011).

5.3.1.5 Léčba

Léčba ACTH dependentního CS vychází ze snahy o odstranění zdroje nadprodukce ACTH, tedy adenomu hypofýzy, nebo např. malobuněčného karcinomu, karcinoidu atd. při ektopické sekreci ACTH. V případě adenomu hypofýzy, při neúplném odstranění operačně dále zvažujeme ozáření nejčastěji Leksellovým gamma nožem (LGN), do nastoupení účinku LGN (0,5 - 2 roky) léčíme inhibitory steroidogeneze. Kromě těchto léků je možné použít pasireotid, který má ale zvýšené riziko vzniku diabetes mellitus. V případě, kdy se dlouhodobě nedaří ektopickou sekreci ACTH lokalizovat a zbavit pacienta účinků hyperkortizolizmu, zvažujeme bilaterální adrenalectomii. Při provedení bilaterální adrenalectomie u pacientů s Cushingovou chorobou hrozí odstraněním zpětné vazby (hladinou kortizolu) zvýšený růst adenomu hypofýzy označovaný jako Nelsonův syndrom.

V případě ACTH independentního CS při adenomu/karcinomu nadledviny je metodou volby jednostranná adrenalectomie. V případě bilaterálních lézí jako např. BMAH zvažujeme dle míry hyperkortizolizmu a dalších okolností bilaterální nebo unilaterální adrenalectomie, nebo v případě průkazu aberantních receptorů farmakologickou léčbu.

Ať už je léčba CS jakákoliv, vždy je nutné pomýšlet na relativní hypokortikalismus po odstranění zdroje hyperkortizolizmu u těchto pacientů a náležitě je substituovat glukokortikoidy.

5.3.2 Subklinický Cushingův syndrom

5.3.2.1 Definice

Subklinický CS je nejčastěji popisovaná hormonální porucha u incidentalomů nadledvin. Vyznačuje se mírně zvýšenou sekrecí kortizolu, ale bez zjevných klinických známek „plně vyjádřeného“ CS. Přejchod subklinického CS do klinicky plně vyjádřeného CS je velmi vzácný (Barzon L. et al., 2003; Fassnacht M. et al., 2016). V nových doporučeních pro diagnostiku adrenálních incidentalomů byl pro subklinický CS v závislosti na supresi v 1 mg dexametazonovém testu zaveden termín „možná autonomní sekrece kortizolu (kortizol 51-138 nmol/l) a „autonomní sekrece kortizolu“ (kortizol > 138nmol/l) (Fassnacht M. et al., 2016). Vzhledem k tomu, že sekreci kortizolu hodnotíme kvantitativně za 24 hodin, ale i z hlediska diurnální variability a suprese po dexametazonu není definice subklinického CS u většiny autorů stejná. Lze však konstatovat, že největší váhu má 1mg dexametazonový test, který je v definici používán buďto samostatně, nebo v kombinaci (např. 2 z 3) dexametazonový test, UFC, ACTH, cirkadiánní rytmus kortizolu (Chiodini I., 2011; Debono M., Newell-Price J., 2015; Terzolo M. et al., 2011; Young Jr W. jr, 2007).

5.3.2.2 Diagnostika

Diagnostika subklinického CS vychází ze zhodnocení sekrece kortizolu. U většiny pacientů lze diagnózu stanovit v ambulantním režimu. U menší skupiny s incidentalomy nadledvin nad 3-4 cm, bilaterálním postižením, u mladších pacientů, pacientů se suspektními klinickými symptomy volíme vyšetření za hospitalizace, které nám umožní komplexní posouzení sekrece kortizolu včetně správného odběru ACTH, plazmatických metanefrinů, vyšetření kostní denzity a v neposlední řadě také důkladné fyzikální vyšetření a anamnézu. V ambulantním režimu i při vyšetření za hospitalizace nejčastěji vycházíme z 1 mg dexametazonového testu (Fassnacht M. et al., 2016). Ten však při komplexu všech dále uvedených vyšetření většinou provádíme nakonec celého vyšetřování, aby nedošlo ke zkreslení ostatních bazálních odběrů.

5.3.2.2.1 ACTH

Ranní hladina ACTH <10ng/l svědčí pro subklinický CS (při vyloučení plně vyjádřeného CS), naopak hodnoty >20 ng/l nesevídčí pro adrenální autonomii – subklinický CS. Při nálezů těchto hodnot je nutno zmínit, že pokud ostatními metodami prokážeme zvýšenou sekreci kortizolu a ACTH je >20 ng/l je třeba zvažovat autonomii na úrovni sekrece ACTH oproti primárně adrenální příčině. U pacientů s CS na podkladě adenomu hypofýzy není vzácný nález unilaterálního či bilaterálního zvětšení nadledvin (Arnaldi G. et al., 2003).

5.3.2.2.2 Diurnální profil a půlnoční hladina kortizolu

Diurnální profil sekrece kortizolu je za fyziologických okolností zachován a při jeho vyrovnání může přispět k diagnóze subklinického CS. Stejně jako plně vyjádřeného CS je i zde důležitý půlnoční pokles hladin kortizolu. Ten hodnotíme v krvi, nebo v moči. Výhoda stanovení volného kortizolu ze slin je v ambulantním provedení, odpadá stres pacienta z nemocničního prostředí, lze provádět při léčbě (např. HAK) ovlivňující hladiny celkového kortizolu v séru. Nevýhodou je naopak nutnost detekce při nízkých hladinách kortizolu, zavedení metodiky, která zatím v ČR není dostatečně přesná. Vyšetření půlnočního kortizolu v séru proto provádíme výhradě u hospitalizovaných pacientů. Limitací tohoto postupu je zvýšený stress z hospitalizace, odběru krve, možný „falešně“ vysoký kortizol u pacientů zvyklých na noční bdění (směnný provoz), pacientů s depresí, obězních, a dalších s pseudo-CS, jak je blíže specifikováno výše. Jednoznačný cut-off si musí zpracovat každé pracoviště individuálně. Dle literárních údajů je pro půlnoční sérový kortizol doporučována hodnota např. 149 nmol/l (Terzolo M. et al., 2005).

5.3.2.2.3 Volný močový kortizol/24 h (UFC)

UFC nám dává obraz celkové sekrece kortizolu za 24 h. Neříká však příliš o cirkadiálním kolísání. U mírné nadprodukce kortizolu, např. vyrovnání diurnálního rytmu v úrovni ranních hodnot nemusí být UFC zvýšený (Duclos M. et al., 1999; Kidambi S. et al., 2007). Z těchto důvodů se doporučuje v případě UFC použití alespoň dvou stanovení a hodnocení v kombinaci s ostatními testy. Význam UFC je vzhledem nižší senzitivitě u pacientů se subklinickou formou CS oproti plně vyjádřenému CS menší a doporučuje se proto pouze v kombinaci s ostatními testy.

5.3.2.2.4 Dexametazonové testy

1-mg dexametazonový test vypovídá o autonomii sekrece kortizolu z nadledvin při současné inhibici stimulace nadledvin ACTH. Za spolehlivou hranici pro vyloučení i jen mírného hyperkortizolizmu je považován pokles sérového kortizolu pod 50 nmol/l. Ovšem cut-off pro pozitivitu pro subklinický CS se liší podle autorů. Nejnižší hodnota pro potvrzení diagnózy autonomní sekrece kortizolu 50 nmol/l vykazuje nejvíce falešně pozitivních pacientů (Nieman L. K. et al., 2008). Naopak „horní“ cut-off 138nmol/l navržený jinými autory některé pacienty nezachytí (Grumbach M. M. et al., 2003; Zeiger M. et al., 2009). Proto někteří autoři volí „zlatou střední cestu“ 83 nmol/l. Někteří autoři využili k zhodnocení adrenální autonomie unilaterální uptake při scintigrafii s norcholesterolem, což dobře korelovalo s dalšími symptomy hyperkortizolizmu a jako optimální cut-off kortizolu navrhli 60 nmol/l s senzitivitou 100 % a specificitou 85 % (Barzon L. et al., 2001). Obdobný cut-off na základě pooperačního hypokortikalizmu prokázala i další práce v kombinaci se supresí DHEAS nebo ACTH (Lee S. H. et al., 2017). V praxi však toto vyšetření není možné u většiny pacientů provádět. Zvýšení dávky dexametazonu na 8 mg nepřineslo významně jiné výsledky, což svědčí o skutečné autonomii nadledvinové sekrece kortizolu a zároveň z velké míry vylučuje eventuelní zhoršenou absorpci u části pacientů (Reimondo G. et al., 2011). Asi nejracionalnější se zdá být vícestupňová diagnostika s screeningovým cut-off 1-mg dexametazonového testu 50 nmol/l s doplněním dalších testů k vyloučení falešně pozitivních výsledků (Debono M., Newell-Price J., 2015).

5.3.2.2.5 Aberantní receptory a steroidní změny

V řadě případů subklinického CS při BMAH, ale i u unilaterálních incidentalomů byl popsán výskyt aberantních receptorů způsobujících subklinický nebo i plně vyjádřený CS (Libé R. et al., 2010; Reznik Y. et al., 2004). K zlepšení diagnostiky byly některými autory další metody jako 8 mg „overnight“ dexametazonový test, CRH test, další studie však přínos těchto modalit nepotvrdily (Arnaldi G. et al., 2003; Kasperlik-Zeluska A. A. et al., 1997; Midorikawa S. et al., 2001; Nieman L. K. et al., 2008; Tsagarakis S. et al., 2006).

Z hlediska změn jiných steroidů než kortizolu byla nejčastěji pozorována snížená hladina DHEAS v souvislosti s subklinickým CS (Dennedy M. C. et al., 2016; Inder W. J., 2016; Tsagarakis S. et al., 2006). Bylo též prokázáno signifikantní snížení DHEA a androstendionu u obou pohlaví a testosteronu u žen při subklinickém CS (Di Dalmazi G. et al., 2015a). Srovnáním adrenálních adenomů bez prokázané zjevné hormonální aktivity vůči zdravým kontrolám bylo prokázáno snížení androgenních metabolitů – androsteronu, etiocholanolonu, zvýšení glukokortikoidních metabolitů, bez signif. změn mineralokortikoidních prekurzorů i metabolitů v sbírané moči za 24 hodin (Arlt W. et al., 2011).

5.3.2.2.6 Pooperační hypokortizolismus jako projev adrenální autonomie

Patofyziologickým projevem adrenální autonomie (adenomu) je suprese ostatní adrenokortikální tkáně. V případě provedené adrenaektomie vede k přechodné snížené adrenální sekreci. Tento princip je využíván v některých pracích jako diagnostické kritérium subklinického hyperkortizolizmu. Nelze ho však využít u většiny pacientů, kde není adrenaektomie indikována (Eller-Vainicher C. et al., 2010; Lee S. H. et al., 2017). Má však význam při definování subklinického hyperkortizolizmu ve studiích. To bylo využito v metaanalýze pacientů s subklinickým CS po adrenaektomii, kde bylo ukázáno, že čím více patologických výsledků (dexametazonový test + ACTH, UFC, půlnoční kortizol, diurnální rytmus, DHEAS) pacient má, tím větší je riziko pooperačního hypokortikalizmu (Di Dalmazi G. et al., 2014a).

5.3.2.2.7 Oboustranné zvětšení nadledvin

V případě bilaterálních expanzí a subklinického CS jsou diagnostické algoritmy hormonální sekrece obdobné jako u unilaterálních lézí. Navíc vyšetřujeme 17-hydroxyprogesteron k vyloučení kongenitální adrenální hyperplazie (Fassnacht M. et al., 2016; Jaresch S. et al., 1992). U bilaterálních lézí byl prokázán častější výskyt subklinického CS, což však může být způsobeno selekční chybou, nebo prostým zvýšením množství adrenálních adenomů/hyperplazie při oboustranném výskytu (Vassiliadi D. A. et al., 2011).

5.3.2.3 Komplikace subklinického CS

V řadě studií byla prokázána souvislost mezi nedostatečnou supresí v 1-mg dexametazonovém testu a diabetes mellitus 2. typu (DM2), arteriální hypertenzí s průkazem zhoršování těchto symptomů v čase (Di Dalmazi G. et al., 2014b; Di Dalmazi G. et al., 2012). Některé studie též ukázaly na možnou souvislost subklinického CS a zvýšené kardiovaskulární mortality (Di Dalmazi G. et al., 2014b; Fassnacht M. et al., 2016). To může souviset s popisovaným zhoršením lipidového profilu, zvýšením obvodu v pase, hladiny fibrinogenu, tloušťky intimomediální vrstvy cévní stěny karotických arterií (Tauchmanová L. et al., 2002). Zvýšené riziko osteoporózy, osteoporotických fraktur a subklinického CS bylo výstupem dalších studií. Subklinický hyperkortizolismus byl prokázán v průřezové studii u 5 % pacientů s osteoporózou (T score > 2,5 SD) a u 10 % pacientů s osteoporózou a obratlovými zlomeninami (Chiodini I. et al., 2007). Prospektivní studie též prokázaly zhoršení kvality kostní mikroarchitektury v čase u pacientů s subklinickým CS (Morelli V. et al., 2011).

U pacientů s incidentalomy nadledvin a současně minimální nadprodukcí kortizolu – cut-off < 30 nmol/l v 2mg 2 denním dexametazonovém testu oproti kontrolám bez incidentalomu byla prokázána statisticky signifikantně větší tloušťka intimy, medie, HOMA index, AUC kortizolu v synacthenovém testu s 250µg 1-24 ACTH, nižším průtokem způsobené vasodilatace (flow mediated vasodilation) (Androulakis I. I. et al., 2014).

5.3.2.4 Léčba

Pro léčbu subklinického CS nejsou jednotná doporučení a postup u jednotlivých pacientů vychází spíše ze zkušenosti zkušenosti endokrinologických škol a názoru jednotlivých endokrinologů. Komorbidity asociované se subklinickým hyperkortizolismem jsou nespecifické, mají v populaci vysokou prevalenci a nelze proto při náhodném zjištění incidentalomu jednoznačně prokázat kauzální souvislost incidentalomu s komorbiditami. Asociované komorbidity mohou kromě hladiny kortizolu záviset i na polymorfismech glukokortikoidních receptorů (Morelli V. et al., 2010). Rozhodování o léčbě z výše uvedených důvodů není jednoduché. Množství studií hodnotících léčbu incidentalomů nadledvin je malé. Jediná randomizovaná studie prokázala zlepšení Diabetes mellitus 2. typu, arteriální hypertenze, hyperlipidemie, obezity v chirurgické léčbě incidentalomů nadledvin oproti prostému

sledování (Toniato A. et al., 2009). Obdobné výstupy ukázaly i další retrospektivní studie (Akaza I. et al., 2011; Chiodini I. et al., 2010; Iacobone M. et al., 2012). Při 4-týdenním podávání mifepristonu (antagonista receptoru pro glukokortikoidy, progesteron) bylo zjištěno zlepšení inzulínové rezistence hodnocené HOMA, Matsuda indexem, množství užívaného inzulínu (Debono M. et al., 2013). Z důvodu rizika pooperačního hypokortikalizmu (stejně jako u plně vyjádřeného CS) je v případě chirurgické léčby nutná pooperační substituce glukokortikoidy s následným otestováním sekrece kortizolu.

5.3.3 Primární (hyper)aldosteronismus

Primární hyperaldosteronismus (PH), nazývaný někdy též primární aldosteronismus, je nečastější příčinou endokrinně podmíněné arteriální hypertenze.

5.3.3.1 Prevalence a rozdělení

Nalézáme ho u 5-14 % neselektovaných pacientů s arteriální hypertenzí. Vzniká na základě adenomu (30 %) nebo bilaterální/unilaterální hyperplazie (70 %) kůry nadledviny. Dále existují vzácné familiární formy hyperaldosteronismu a velmi vzácně karcinomy produkující aldosteron (Marek J., Hána V., 2017).

5.3.3.2 Patogeneze

PH se vyznačuje autonomní sekrecí aldosteronu, která je jen z části závislá, nebo nezávislá na fyziologických regulačních mechanismech zpětnovazebné inhibice kam patří zejména renin, kalemie. Na sekreci aldosteronu má též částečně vliv hladina ACTH. Zvýšení aldosteronu působí na receptory v distálních tubulech ledvin a na dalších místech, což vede k zvýšení reabsorpce sodíku v ledvinách, zvýšení vylučování kaliumu do moči a posléze k zvětšení intravaskulárního objemu. Tento zvýšený volum, pokud není korigován zvýšením natriuretických peptidů, vede k arteriální hypertenzi. Současně působí aldosteron cestou oxidačního stresu remodelaci kolagenu na orgány přímo a vede k fibróze myokardu, cévních stěn a ledvin.

5.3.3.3 Projevy

Nejčastějším projevem PH je arteriální hypertenze. Často jde o středně těžkou až těžkou formu. Současně u 50 % pacientů bývá přítomna hypokalemie, u ostatních

pacientů je kalemie většinou v spodním pásmu normy. Hypokalemie se může projevit extrasystolami, fibrilací síní, prodloužením intervalu QT až k rozvoji komorové tachykardie typu torsade de pointes. Popisována je též mírná metabolická alkalóza. Zvýšené hladiny aldosteronu jsou spojené s zvýšeným rizikem kardiovaskulární morbidity, hypertrofie levé komory, fibrilace síní, infarktu i cévní mozkové příhody (Funder J. W. et al., 2016; Marek J., Hána V., 2017).

5.3.3.4 Diagnostika a terapie

Základem diagnostiky PH je screening. Je doporučován u pacientů:

- se současnou arteriální hypertenzí a hypokalemií
- se středně těžkou až těžkou, rezistentní arteriální hypertenzí
- u mladých osob s arteriální hypertenzí
- u současné arteriální hypertenze a incidentalomu nadledviny
- s rodinným výskytem primárního aldosteronismu
- s výskytem CMP do 50 let

Screeningové vyšetření spočívá v stanovení poměru sérových hladin aldosteronu ku reninu, případně plazmatické reninové aktivitě. Odběr provádíme obvykle v ambulantním režimu v ranních hodinách, u pacientů s normokalemií. K přesnému stanovení je důležité převedení hypertoniků na antihypertenziva neinterferující se stanovením. Blokátory mineralokortikoidních receptorů vysazujeme obvykle 4 týdny před vyšetřením a ostatní antihypertenziva (beta-blokátory, diuretika, ACE inhibitory, AT₁ blokátory, centrální antihypertenziva) 2 týdny. Pacienty převádíme obvykle na verapamil a doxazosin. Pro správné hodnocení výsledného poměru, hladiny aldosteronu a reninu je nutné stanovení vlastních norem pro každou laboratoř.

Při pozitivním screeningovém testu je indikován konfirmační test k potvrzení autonomie sekrece aldosteronu. V zahraničí se můžeme setkat s captoprilovým testem, testem s podáním soli, ale nejen v ČR je nejvíce používaný test s fyziologickým roztokem. Spočívá v podání 2 litrů fyziologického roztoku (FR) během 4 hodin. Test považujeme pozitivní při hladinách aldosteronu po podání FR > 100 ng/l. Hodnoty 50 – 100 ng/l považujeme za šedou zónu. Suprese <50 ng/l při současné supresi reninu svědčí pro tzv. nízkoreninovou arteriální hypertenzi. Při

potvrzení aldosteronismu zvažujeme další postup po domluvě s pacientem. U starších pacientů a tam, kde by nebyla indikována operace přistupujeme obvykle k farmakoterapii. V případě zvažování operace doplňujeme zobrazení nadledvin nejčastěji pomocí CT (ev. MR) a často i katetrizaci adrenálních žil k zhodnocení lateralizace aldosteronismu. Při potvrzení lateralizace indikujeme jednostrannou adrenalektomii, jinak nasazujeme farmakoterapii. Ve farmakoterapii obvykle zahajujeme léčbu spironolaktonem, který v případě nežádoucích účinků (antiandrogenní efekt, dyspepsie, cefalea), nebo intolerance měníme na eplerenon. Jeho nevýhodou je kratší poločas účinku, vyšší cena, menší účinnost.

5.3.4 Hyperandrogenní stavy při onemocnění nadledvin

Společným jmenovatelem hyperandrogenemie je zvýšení hladin androgenů s klinickými projevy se kterými se setkáváme zejména u žen, u nichž jsou fyziologicky hladiny androgenů nízké.

Jednou z nejčastějších příčin hyperandrogenemie u žen je syndrom polycystických ovarií (PCOS) charakteristický hyperandrogenemií, oligo-anovulací, polycystickými změnami ovarií (celkem 25 a více folikulů, nebo celkový objem nad 10 ml). Vzhledem k primárně ovariální příčině tohoto stavu se však PCOS nebudeme dále zabývat.

Kůra nadledvin, *zóna reticularis* a *fasciculata* produkují fyziologicky u obou pohlaví malé množství androgenů. Kvantitativně měřeno se jedná především o slabé androgeny DHEA, 11 β -hydroxyandrostendion, androstendion (Rege J. et al., 2013). Steroidy se silným androgenním účinkem jako např. testosteron jsou produkovány pouze v malé míře. Zvýšení testosteronu u žen > 7 nmol/l, DHEAS > 18 umol/l je považováno za suspektní z androgeny produkujícího tumoru (Marek J., Hána V., 2017).

5.3.4.1 Karcinomy nadledvin

Karcinomy nadledvin (ACC) jsou vzácné. Incidence je udávána kolem 1:1 000 000 obyvatel, zastoupení mezi incidentalomy nadledvin v specializovaných centrech je uváděno kolem 5% (Arlt W. et al., 2011; Barzon L. et al., 2003). Výskyt má dva vrcholy – v dětství do 10 let věku a v dospělosti v 5. decenniu. Postiženy jsou častěji ženy v poměru 2:1 (Mansmann G. et al., 2004).

U dětí se mohou projevit předčasnou pubertou isosexuální, nebo heterosexuální. U dospělých virilizací, hirsutismem, poruchami menstruačního cyklu, obtížemi z lokálního růstu. V léčbě je zásadní časné kompletní chirurgické odstranění karcinomu. V případě metastatického postižení je pětileté přežití téměř nulové (Icard P. et al., 2001).

V adjuvantní léčbě je používán mitotan (Lysodren, o,p'-DDD) s doporučením kontroly sérových hladin. Použití cytotoxického chemoterapeutika (např. cis-platina, etoposid, doxorubicin, streptozocin) je sporné. U pacientů po kompletní resekci je některými autory doporučována monitorace DHEAS, androstendionu, testosteronu, estradiolu, případně aldosteronu v závislosti na hormonech původně produkovaných karcinomem (Libè R. et al., 2007). Zvýšená hormonální sekrece je u ACC popisována v 26-94% (Arlt W. et al., 2011; Mansmann G. et al., 2004). U ACC oproti adenomům byly prokázány (kromě glukokortikoidní a mineralokortikoidní sekrece) zvýšené močové odpady prekurzorů androgenů: pregnendiolu, pregnentriolu, DHEA, 16 α -hydroxy-DHEA; metabolitů androgenů: androsteron a etiocholanolon, což svědčí o nezralé steroidogeneze u ACC (Arlt W. et al., 2011).

5.3.4.2 Adenomy způsobující hyperandrogenemii

Adenomy nadledvin způsobující zjevnou laboratorní nebo klinickou hyperandrogenemii jsou velmi vzácné (Tetsi Nomigni M. et al., 2015). Mírná sekrece androgenů však byla popsána jak u pacientů s klinicky zřejmým CS, tak u pacientů s subklinickým hyperkortizolismem (Kamenicky P. et al., 2007). Laboratorně však k hyperandrogenemii nedochází nejspíše proto, že vlivem subklinického hyperkortizolizmu způsobeného adenomem dochází k atrofii a útlumu sekrece okolní adrenální kůry včetně syntézy a sekrece androgenů.

5.3.4.3 Kongenitální adrenální hyperplazie

Kongenitální adrenální hyperplazie (CAH) je autozomálně recesivně dědičné onemocnění způsobené sníženou funkcí enzymů steroidogeneze. Při snížené funkci enzymu dochází k akumulaci steroidních substrátů enzymu, a naopak nedostatku steroidních produktů enzymu.

Nejčastěji, přibližně v 95 % případů, se jedná o deficit 21-hydroxylázy. V ČR se vyskytuje u 1:13 000 obyvatel. Dochází k nedostatečné sekreci kortizolu, což vede

k zpětnovazebnému zvýšení ACTH a zvýšené tvorbě nadledvinových androgenů. Podle míry postižení enzymu rozlišujeme formu neklasickou a klasickou, která může být ještě spojena se solnou poruchou (nedostatkem aldosteronu) a bez solné poruchy, tzv. prostá virilizující (simple virilizing) forma.

Klasická forma se solnou poruchou (aktivita 21-hydroxylázy do 2% výskytu) je kromě virilizace u novorozenců charakterizována rizikem časně postnatální adrenální insuficience s iontovým rozvratem během několika týdnů po porodu. Klasická forma bez solné poruchy (aktivita 21-hydroxylázy 1-10% výskytu) je charakteristická virilizací zevního genitálu u dívek patrnou ihned po porodu či vyvinuvší se později, u chlapců předčasnou isosexuální pseudopubertou (pokročilé sekundární pohlavní znaky při dětském objemu testes).

U neklasické formy (aktivita 21-hydroxylázy 20-60 %) bývá nástup symptomů obvykle pozdní až v období dospívání, či později, projevuje se poruchami menstruačního cyklu, akné, hirsutismem. U mužů často zůstává klinicky nerozpoznána. U neklasické formy se může též jednat o složené heterozygoty (klasická mutace+variantní alela), nebo 2 variantní alely. Dokonce i u pouhých přenašečů – heterozygotů byly popsány nespecifické změny v steroidogeneze tak i ve fenotypu (Charmandari E. et al., 2004).

Z důvodu rizik u tohoto onemocnění byl zaveden v ČR novorozenecký screening z kapky krve 3. den po porodu. Spočívá v stanovení 17-hydroxyprogesteronu (17-OHP). Při hodnocení výsledků je důležité vědět, že hodnoty 17-OHP jsou časně po porodu vysoké z důvodu přetrvávající zvýšené aktivity nadledvin novorozenců. U nedonošených novorozenců bývají hladiny 17-hydroxyprogesteronu též vyšší než u novorozenců donošených. Vzhledem k nastavení hodnot cut-off u tohoto screeningu může dojít k nezachycení pacientů s neklasickou formou a části pacientů s formou klasickou bez solné poruchy (prostou virilizující). Současně vzhledem k principu stanovení 17-OHP screening nepokryje pacienty s méně častými formami CAH.

Deficit 17 α -hydroxylázy vede pouze k tvorbě mineralokortikoidů, které jsou příčinou k hypokalemie, arteriální hypertenze. U chlapců vlivem chybějících androgenů může docházet k porušenému vývoji zevního genitálu s retencí testes v dutině břišní. U chlapců i u dívek nedochází k pubertálnímu vývoji (Kater C. E.,

Biglieri E. G., 1994). Hypokortikální krize vznikají u této poruchy pravděpodobně vlivem zvýšených hladin kortikosteronu (který má též glukokortikoidní aktivitu) vzácně (Moreira A. C. et al., 1990).

Deficit 3β -hydroxysteroidní dehydrogenázy typu 2 vede k hromadění prekurzorů: 17-hydroxypregnenolonu, DHEA. K poruše syntézy dochází jak nadledvinách, tak v gonádách. V závislosti na míře defektu může vzniknout též metabolický rozvrat při deficitu mineralo- a glukokortikoidů, u dívek můžeme pozorovat virilizaci (extraadrenální konverzí HSD3B1- DHEA na androstendion, testosteron), u chlapců naopak může být virilizace genitálu nedostatečná (Lachance Y. et al., 1990). U obou pohlaví při významnějším enzymatickém defektu dochází k poruchám pubertálního vývoje (Simard J. et al., 1995).

Deficit 11β -hydroxylázy způsobuje hromadění 11-deoxykortikosteronu a 11-deoxykortizolu. Současně jsou zvýšeny androgeny vedoucí k virilizaci genitálu u dívek, a u chlapců pak k isosexuální předčasné pseudopubertě. Vzhledem k zvýšené koncentraci mineralokortikoidních prekurzorů pozorujeme hypokalemii a arteriální hypertenzi. I přes to je známo zvýšené riziko hypotenzní krize. Adrenarché praecox se může projevit až opožděně (Zachmann M. et al., 1983).

Lipoidní CAH je podmíněn poruchou funkce StAR proteinu, který reguluje úvodní krok steroidogeneze přenosem molekuly cholesterolu přes mitochondriální membránu. To vede k hromadění esterů cholesterolu v nadledvinách. U chlapců je porušená virilizace genitálu. Postnatálně dochází k rozvoji závažné adrenální nedostatečnosti. U chlapců nacházíme ženský genitál, naopak u dívek nemusí být změny pohlavních znaků zřejmé (Fujieda K. et al., 1997; Lin D. et al., 1995).

Základem léčby všech těchto defektů je správná diagnóza pomocí steroidního metabolomu a genetické analýzy. Léčba spočívá v substituci glukokortikoidů, mineralokortikoidů, androgenů v závislosti na pohlaví a typu defektu. V závislosti na fenotypu je někdy indikována současná chirurgická léčba pohlavních změn.

5.3.5 Incidentalomy nadledvin

Současně s rozvojem zobrazovacích metod narůstá množství náhodně zachycených expanzí nadledvin – incidentalomů. Jejich klinické posouzení závisí na stanovení sekrece základních nejvíce aktivních steroidů a odlišení tak spolu s radiologickým

zobrazením benigních hormonálně afunkčních nádorů od maligních (Vassiliadi D. a, Tsagarakis S., 2011). Zejména u karcinomů nadledvin je popisována nezralá steroidogeneze se zvýšenou produkcí steroidních prekurzorů na podkladě inkompletní enzymatické výbavy (Arlt W. et al., 2011).

Incidentalomy nadledvin jsou náhodně, při vyšetření zobrazovacími metodami, zachycené tumory nadledvin. Jejich výskyt je poměrně častý, kolem 1- 8,9 % při autoptickém posouzení, 0,2-4,4 % při vyšetření zobrazovacími metodami v celé populaci. Oboustranné léze nadledvin jsou popisovány u 10-15 % incidentalomů. Incidence stoupá s věkem, s hodnotou krevního tlaku, tělesnou hmotností (Kaltsas G. et al., 2012; Kloos R. T. et al., 1995; Zeiger M. a et al., 2011). Z klinického pohledu je zásadní posouzení jejich hormonální sekrece a případné malignity nádoru.

Asi 71 % incidentalomů nadledvin je hormonálně afunkčních, subklinický Cushingův syndrom tvoří asi 8 %, aldosteron produkuje 1,2 % a katecholaminy produkuje asi 5,6 %. Asi ve 4,4 % jde o primární karcinomy nadledvin. Metastatická etiologie incidentalomů se prokazuje asi ve 2%, zároveň u pacientů s jinou malignitou se nachází 50-75% incidentalomů (Barzon L. et al., 2003).

Kromě hormonální sekrece incidentalomů je z klinického hlediska důležité posouzení jejich maligního potenciálu. Pro praktické použití se jeví zobrazení pomocí CT s kontrastem – posouzení struktury, invaze, velikosti, denzity tumoru nativně a vyplavení kontrastu s odstupem od podání kontrastní látky.

Velikost nad 4 cm byla opakovaně uváděna jako optimální cut-off k odlišení adenomů od ostatních lézí vč. maligních ovšem s nízkou specificitou (Terzolo M. et al., 2011; Young Jr W. jr, 2007).

Dalším důležitým kritériem je posouzení denzity tkáně, která je nepřímo závislá na množství obsaženého tuku, jehož množství je větší u adenomů než karcinomů. Velikost tumoru koreluje s jeho potenciální malignitou, nicméně jako přesnější se ukázalo posouzení denzity bez podání kontrastní látky. Riziko malignity je u homogenní léze s denzitou pod 10 HU blízke 0% (Hamrahian A. H. et al., 2005). Při vyšší denzitě a nejistotě i při použití ostatních parametrů je na místě porovnání denzity tumoru po aplikaci kontrastní látky 1 minutu a 10 minut po podání kontrastu. Je založeno na principu rychlejšího poklesu denzity (odplavení kontrastní látky,

washout) u adenomů oproti maligním lézím. Existují dva vzorce k porovnání washoutu, relativní procentuální washout a absolutní procentuální washout, který při 60% hranici má senzitivitu 86-100% a specificitu 83-92%) oproti relativnímu, který při 40% hranici má senzitivitu 82-97% a specificitu 92-100% (Caoili E. M. et al., 2002; Terzolo M. et al., 2011).

Vyšetření MR prokázalo podobnou, možná o trochu lepší senzitivitu a specificitu zejména v případě na lipidy chudých lézí, při suspekci na feochromocytom, či jiný původ nádoru. Ještě výhodnější z hlediska senzitivity a specificity je 18-FDG PET, která však není plošně dostupná, a proto ji nelze použít pro rutinní diagnostiku incidentalomů. U nejasných lézí na CT s kontrastem, vykazuje FDG PET v detekci maligních lézí 93-100% senzitivitu (Nunes M. L. et al., 2010; Tenenbaum F. et al., 2004). Nehodí se ovšem pro léze pod 1 cm, kde mohou metastázy vykazovat menší akumulaci oproti zdravé jaterní tkáni.

Z hlediska hormonální sekrece se doporučuje u všech incidentalomů vyšetření volných metanefrinů alespoň v moči, při určitém výsledku vyšetření pak sérových metanefrinů (Lenders J. W. M. et al., 2002). Riziko feochromocytomu je při nativní denzitě na CT < 10 HU sice velmi malé, ale vzhledem k nedostatku studií je vyšetření metanefrinů/katecholaminů zatím spíše doporučeno u všech (i normotenzních) pacientů (Fassnacht M. et al., 2016). Při hypertenzi nebo hypokalemii se doporučuje vyšetření k průkazu event. hyperaldosteronismu (Terzolo M. et al., 2011). Při podezření na hyperkortizolizmus sestává vyšetření z diurnální variability kortizolu, volného močového kortizolu, ACTH a jako nejcitlivější skriningová metoda se jeví 1 mg dexametazonový test (Young Jr W. jr, 2007). Při nejasném výsledku a komplexním posouzení všech ukazatelů je vhodný nízkodávkový dexametazonový testu (LDDST), nebo kontrolní vyšetření za 3-6 měsíců (Kaltsas G. et al., 2012).

U pacientů s incidentalomy nadledvin má stanovení steroidní sekrece význam pro řadu dalších zdánlivě nesouvisejících onemocnění. V případě subklinického Cushingova syndromu (SCCS) je popisován zvýšený výskyt arteriální hypertenze, obezity, poruchy glukozové tolerance, diabetes mellitus, osteoporózy, atd. (Di Dalmazi G. et al., 2012; De Leo M. et al., 2012).

Riziko vzniku Cushingova syndromu de novo, či přechodem z SCCS je dle meta analýzy mezi 0-11 %. Nově vzniklá nadprodukce katecholaminů nebo aldosteronu jsou extrémně vzácné (Barzon L. et al., 2003).

Při srovnání množství 19 hlavních steroidů z steroidního spektra v moči pacientů s incidentalomy nadledvin oproti zdravým kontrolám bylo identifikováno 5 potenciálních biomarkerů patologické funkce nadledvin (α -cortol, tetrahydrokortikosteron, tetrahydrokortizol, allo-tetrahydrokortizol and etiocholanolon) svědčících pro možnou autonomní hypersekreci (Kotłowska A. et al., 2011).

Zásadní roli v hodnocení incidentalomů nadledvin hraje odlišení adenomů od karcinomů. Laboratorně potvrzená hormonální nadprodukce je popisována u 60 - 70% karcinomů nadledvin, což však v řadě případů nemusí být klinicky zřejmé. Lze to vysvětlit neúplnou steroidogenezí s produkcí steroidních prekurzorů při dediferenciaci a neúplné produkci steroidogenních enzymů (Arlt W. et al., 2011; Doerr H. G. et al., 1987; Gröndal S. et al., 1990; Małunowicz E. M. et al., 1995). U karcinomů byl zvažován zvýšený poměr DHEA/DHEAS (Babińska A. et al., 2012).

Při analýze vzorků sbírané moči od 45 pacientů s karcinomy nadledvin, 102 pacientů s adenomy ve srovnání se zdravými kontrolami bylo sledováno 32 steroidů z nichž byly vypočítány nejvhodnější k diferenciaci adenomů od karcinomů. Jako nejvhodnější se ukázaly androgenní prekurzory – pregnendiol, pregnentriol, DHEA, androgenní metabolity – androsteron, etiocholanolon, metabolity mineralokortikoidů tetrahydro-11-deoxycorticosterone (THDOC) a 5α -THDOC, glukokortikoidní metabolity pregnendiol, pregnentriol, 17-hydroxyprogesteron a tetrahydro-11-deoxykortizol (THS), volný kortizol, 6β -hydroxykortizol, tetrahydrokortizol a α -kortol, které byly signifikantně zvýšené u karcinomů oproti adenomům. Zvýšené močové vylučování alespoň jednoho steroidu bylo prokázáno u 82 % karcinomů, 29% adenomů a 16% kontrol. Nejčastější u karcinomů byla současná sekrece androgenních a glukokortikoidních prekurzorů (36%), androgenních a mineralokortikoidních prekurzorů u 33 %. Analýzou získaných dat nejlépe odlišovaly karcinom od adenomu THS, pregnendiol a pregnentriol (Arlt W. et al., 2011).

5.4 Diagnostika funkce nadledvin

5.4.1 Klinické hodnocení centrální regulace sekrece glukokortikoidů u pacientů po operaci hypofýzy pomocí stimulačních testů

U pacientů po operaci nádorů tureckého sedla, adenomů hypofýzy, kraniofaryngomů a jiných sellárních expanzí vzniká riziko porušení adrenokortikotropní funkce hypofýzy – centrálního hypokortikalismu. Je proto zvykem zajistit pacienty pooperačně substituční léčbou glukokortikoidy až do zhodnocení adrenokortikotropní osy. Opakovaně bylo ve studiích prokázáno, že hodnoty bazálního kortizolu několik dní po operaci pod 100 nmol/l značí s vysokou pravděpodobností nutnost dlouhodobé glukokortikoidní substituce při centrálním hypokortikalismu. Naopak hodnoty bazálního kortizolu nad 500 nmol/l (400-500 nmol/l dle různých autorů) s vysokou pravděpodobností ukazují na zachovalou adrenokortikotropní funkci a lze zvážit vysazení glukokortikoidní substituce (Courtney C. H. et al., 2000; Jayasena C. N. et al., 2009; Klose M. et al., 2005). Zbývající skupina s pooperačními hodnotami bazálního kortizolu mezi 100 a 400-500 nmol/l musí být zhodnocena pomocí dynamických testů.

K hodnocení adrenokortikotropní osy je možno použít celou řadu testů. Za zlatý standard je považován Insulinový toleranční test (ITT). Z praktických důvodů postupně získal širší využití zkrácený test s ACTH, který se rozšířil pro svou jednoduchost, méně kontraindikací a cenu (v zemích s vysokou cenou práce zdravotnického personálu). Výpovědní hodnota ACTH testu ukázala dobrou korelaci s ITT (Stewart P. M. et al., 1988). Další testy jako test s metyraponem či glukagonem jsou používány méně, ale v určitých situacích mají také své výhody (Inder W. J., Hunt P. J., 2002). Byly též navrženy další metody zhodnocení osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny jako poměr před a pooperačního bazálního kortizolu, či hodnocení hodnot DHEA a DHEAS po nízkodávkovém ACTH testu (Sayyed Kassem L. et al., 2012; Zada G. et al., 2012).

Vhodná doba k provedení ACTH testu se ukazuje nejdříve 1-3 měsíce pooperačně (Inder W. J., Hunt P. J., 2002; Klose M. et al., 2005). Do té doby lze

provést ITT, test s glukagonem, metyraponem. U některých pacientů může časné dynamické testování vést k podhodnocení hypokortikalizmu (Inder W. J., Hunt P. J., 2002).

5.4.1.1 Inzulinový toleranční test

Při ITT aplikujeme pacientovi iv. 0,1-0,25 j/kg rychle působícího insulinu. V čase 0 a každých dalších 15 minut je pacientovi stanovena glykemie a krev k pozdějšímu stanovení hladiny kortizolu. Za dostatečnou hypoglykemií k požadované stimulaci adrenokortikotropní osy je považován pokles glykemie <2,2 mmol/l. Při dosažení požadované hypoglykemie hladovění ukončujeme a pacient pije sladký čaj, nebo mu podáme iv. glukózu. K hypoglykemií obvykle dochází za 30-45 minut po aplikaci insulinu. Maximální odpovědi kortizolu je dosaženo obvykle za 60-90 minut, kdežto vzestupu ACTH přibližně již za 45 minut (Melmed S., 2011).

5.4.1.2 Synacthenový test

Synacthenový (1-24 ACTH) test vychází z principu přímé stimulace nadledvin exogenní molekulou 1-24 ACTH. V praxi jsou užívány dávky 1, 10, 250 µg 1-24 ACTH se srovnatelným efektem na maximální stimulovanou hladinu kortizolu (Abdu T. A. M. et al., 1999; Agha A. et al., 2006; Tordjman K. et al., 2000). K maximálnímu vzestupu kortizolu dochází obvykle za 20-30 minut po aplikaci. Na našem pracovišti stanovujeme hladiny kortizolu v čase 0, 30, 60 minut od podání Synacthenu. Výhodou tohoto testu je jednoduché praktické provedení. Naopak nevýhodou může být přímý efekt stimulace na nadledvinu s vynecháním hypotalamo-hypofyzární části osy potenciálně vedoucí k falešně negativnímu výsledku poruchy při recentně vzniklé hypotalamo-hypofyzární poruše.

5.4.1.3 Ostatní testy centrálního hypokortikalizmu

Test s metopironem spočívá v bloku 11β-hydroxylázy vedoucí snížené sekreci kortizolu s následnou zpětnovazebnou stimulací ACTH po podání metopironu. Limitací tohoto testu je nutnost stanovení 11-deoxykortizolu v séru, což není běžně dostupné. Tento test se z proto běžně v ČR neprovádí.

Test s glukagonem vychází z principu stimulace sekrece ACTH po aplikaci glukagonu. S výhodou je jeho současný stimulační efekt na růstový hormon, což

umožňuje současné otestování stejně jako u ITT. Avšak některými autory je jeho efekt u dospělých pacientů zpochybňován (Berg C. et al., 2010).

CRH test může posloužit k odlišení deficitu CRH od ostatních úrovní poruchy sekrece osy hypotalamus, hypofýza, nadledviny. K běžné diagnostice hypokortikalismu ho nepoužíváme.

5.4.2 Laboratorní stanovení steroidních hormonů

Základem diagnostiky a léčby onemocnění nadledvin je vyšetření hladin steroidních hormonů produkovaných v nadledvinách. Odběr provádíme obvykle v ranních hodinách, u žen ideálně ve folikulární fázi menstruačního cyklu (začátkem cyklu), při vysazení interferující medikace jako např. hormonální antikoncepce, pokud je to možné.

5.4.2.1 Imunoanalytické metody

Základem rutinních metod je stanovení pomocí imunoanalýzy. Principem je vazba protilátky na měřený antigen (např. protilátka proti kortizolu). V případě radioimunoanalýzy (RIA) vstupně neznámé množství měřeného antigenu (např. kortizolu) kompetuje v roztoku se známým množstvím isotopem značeného antigenu (^{125}I značený kortizol) ve vazbě na protilátku. Množství sledovaného antigenu je nepřímě úměrné navázaného isotopem značeného antigenu, jehož množství je stanoveno pomocí gamma detektoru.

V případě chemiluminiscenční imunoanalýzy (CLIA) je sledovaný analyt (antigen) navázán na fixovanou protilátku. Následně je na analyt navázána další protilátka, která je dále označena a následkem chemické reakce dochází k luminiscenci, která je detekována. Množství sledovaného analytu je přímo úměrné měřené luminiscenci.

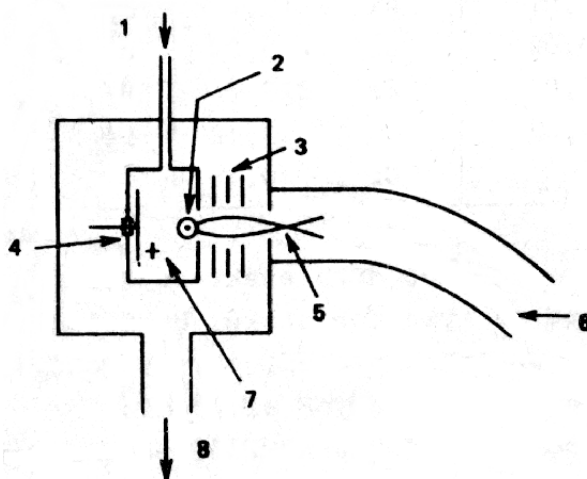
5.4.2.2 Hmotnostní spektrometrie

Kromě imunoanalýzy jsou pro přesné stanovení, detekci steroidů důležité metody založené na struktuře, hmotnosti a náboji jednotlivých steroidů. K těm patří např. hmotnostní spektrometrie (MS). Ještě před vlastní detekcí jednotlivých složek analytu je nutné rozdělení směsi pomocí chromatografie.

Při plynové chromatografii dochází k oddělení jednotlivých steroidů podle jejich bodu varu a polaritý průchodem „mobilní fáze“ (směs steroidů) přes „stacionární fázi“ (např. mikrofilm na pevném nosiči uvnitř kolony). V závislosti na různé rychlosti průchodu částí směsi (analytů) kolonou dochází k separaci jednotlivých frakcí. Podle skupenství mobilní fáze rozlišujeme kapalinovou chromatografii (LC), fluidní chromatografii, plynovou chromatografii (GC) a plazmovou chromatografii.

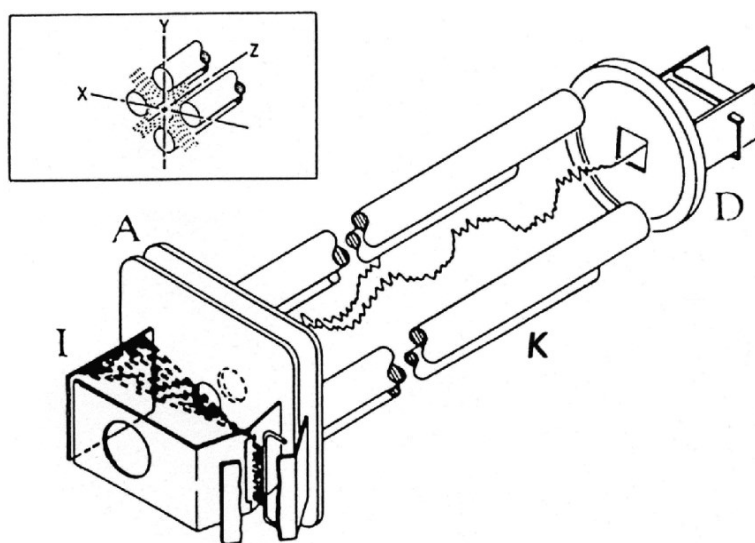
Principem GC je rychlé odpaření analyzovaného vzorku do plynného skupenství. Vzniklý plyn je promíchán s nosným plynem (např. dusík, helium, vodík, argon) a pod tlakem prochází kolonou. Na základě rozdílné rozpustnosti jednotlivých látek v pevné fázi dochází k rozdílnému času průchodu kolonou. Více rozpustné látky procházejí kolonou déle a naopak.

Po průchodu kolonou dochází k ionizaci složek iontovým zdrojem např. elektronovým paprskem (electron impact, EI) (Obr. 6), nebo chemickou ionizací. Tím je např. tenké wolframové vlákno pod stejnosměrným napětím. Reakcí emitovaných iontů (elektronů) s částmi analytu dochází k změnám analyzovaných látek, např. jejich excitaci a rozštěpení s vznikem pozitivně nabitých fragmentů. Součet molekulových hmotností těchto fragmentů odpovídá molekulové hmotnosti původní molekuly.

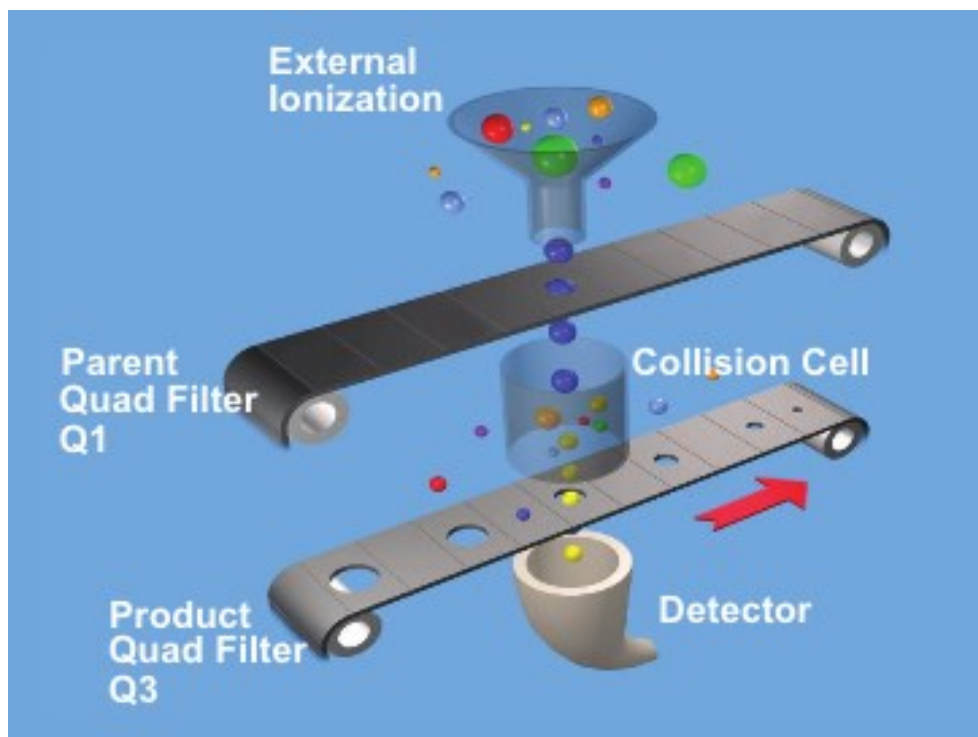


Obr. 6 Ionizační komora pro ionizaci elektronovým paprskem. 1 - přívod vzorku; 2 - elektronový paprsek kolmý k rovině obrázku; 3 - urychlovací a zaostřovací elektrody; 4 - repelentní elektroda; 5 - iontový paprsek; 6 - analyzátor; 7 - vlastní iontový zdroj; 8 - k vývěvám

Dále jsou jednotlivé fragmenty podle poměru hmotnosti/náboji (m/z) ve vakuu odděleny a usměrněny elektromagnetickým polem na detektor. Toto pole může být tvořeno např. klasickým magnetickým, nebo tzv. dynamickým analyzátozem, kam řadíme kvadrupolový analyzátor (single / triple quadrupole analyzer, nebo time of flight, TOF, ion trap, IT analyzátoři) (Obr. 7, Obr. 8). Ten je tvořen čtyřmi kovovými tyčemi – elektrodami, které při průchodu proudem tvoří hyperbolické radiofrekvenční pole. Působením tohoto pole dochází k rozkmitání procházejících iontů tak, že se oddělí ionty se stabilní dráhou. Rozlišujeme tzv. Selected ion monitoring (SIM) mode, v případě trojitého kvadrupolu Multiple reaction monitoring (MRM) a Scan mode. Při SIM mode dochází k průchodu pouze určitého úzkého spektra fragmentů definovaných dle m/z a je proto lepší k kvantifikaci, zatímco při Scan modu je postupně detekováno celé spektrum podle poměru m/z , což lépe charakterizuje složení např. vzorku neznámého složení (Agilent Technologies, 2016). V případě trojitého kvadrupolu tvoří druhý kvadrupol kolizní cela, kde dochází k další fragmentaci pomocí proudu dusíku a ve třetím kvadrupolu jsou tyto menší fragmenty dále rozděleny dle m/z .



Obr. 7 Hmotnostní spektrometr s kvadrupolovým analyzátozem. I – iontový zdroj; A – akcelerační sekce; K – kvadrupolový analyzátor; D – detektor



Obr. 8 Trojitý quadrupol s kolizní celou reprezentující druhý quadrupol (zdroj: Agilent technologies)

Dále přicházejí jednotlivé ionizované fragmenty na detektor. Ten je obvykle konstruován jako elektronový násobič se zesílením původního signálu. Důležité je též odstínění detektoru od elektromagnetického pole. Výstupem je záznam jednotlivých částí analytu rozdělených podle hmotnosti, hmotnostní spektrum.

V případě kapalinové chromatografie (LC) je mobilní fáze tekutá. K ionizaci je používán electrospray, chemická ionizace, multimodální ionizace, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI). Polarita analytu má vliv na používanou ionizační metodu. Následný analyzátor a detektor bývá obdobný jako u GC (single/triple quadrupole, time of flight, ion trap analyzátor).

Při každé chromatografii spojené s MS je zásadní preanalytická příprava vzorků. V případě steroidů se skládá z extrakce a derivatizace. Extrakci např. dietyléterem dochází k oddělení volných polárních steroidů do etheru, zatímco ve vodné frakci zůstávají konjugáty (sulfáty, glukuronidy). V případě GC (oproti LC) je dále nutné odparky po extrakci derivatizovat derivatizačními činidly (Keevil B. G., 2016). To vede k snížení polaritě steroidů a často i k zvýšení jejich chemické stability.

6 Cíle práce

Cílem mé doktorské práce bylo zkoumání steroidního metabolomu ve fyziologii a patofyziologii člověka. Většina steroidů je lidském organismu produkována nadledvinami, a právě studium jejich sekrece bylo cílem této práce. I při zaměření se na pouhou oblast adrenálních steroidů zůstává velmi široká škála poruch steroidního spektra, kterou nelze v této práci celou obsáhnout. Zaměřili jsme se proto, v návaznosti na dosud známé znalosti, zejména na glukokortikoidní a androgenní sekreci. Cíle jsme s ohledem na mírně odlišný charakter obou částí práce rozdělili do dvou částí.

6.1 Cíle 1. části práce – změny steroidního metabolomu u pacientů s incidentalomy nadledvin a u pacientů s Cushingovým syndromem

V této části jsme se zabývali změnami steroidního metabolomu (spektra steroidů) u pacientů s incidentalomy nadledvin (náhodně zjištěným zvětšením nadledviny). S rozvojem zobrazovacích metod, zvláště počítačové tomografie (CT) dochází v posledních desetiletích k častému náhodnému nálezu zvětšení (hyperplazií, tumorů) nadledvin. V řadě minulých studií bylo zjištěno, že i pacienti bez klinicky zjevné hormonální aktivity těchto tumorů vykazují hormonální změny, které i bez přímých klinických projevů pravděpodobně vedou ke komplikacím (Di Dalmazi G. et al., 2015b; Debono M., Newell-Price J., 2015; Morelli V. et al., 2011). Ty následně způsobují zhoršení kvality a délky života pacientů (Di Dalmazi G. et al., 2014b). Diagnostika těchto mírných hormonálních změn nebývá vždy jednoduchá a k přesnému zhodnocení je často třeba provedení více vyšetření, odběrů krve, moči (Arlt W. et al., 2011; Brossaud J. et al., 2016; Di Dalmazi G. et al., 2015a). V souvislosti s mírně zvýšenou sekrecí kortizolu byly popsány změny některých dalších steroidů jako např. DHEAS, DHEA, které mohou pomoci v diagnostickém rozhodování (Vassiliadi D. a, Tsagarakis S., 2011). Popis změn většího množství dalších steroidů u pacientů se subklinickým CS dosud nebyl publikován.

Kromě pacientů bez klinických symptomů hyperkortizolizmu (subklinického CS) jsme se zaměřili i na pacienty s klinicky plně symptomatickým CS. Diferenciální

diagnostika CS může být v některých případech (např. odlišení ACTH dependentních forem) obtížná. Steroidní změny u různých typů CS byly již částečně popsány (Arlt W. et al., 2011; Eisenhofer G. et al., 2018; Hines J. M. et al., 2017). Oproti naší nově použité metodě GC-MS/MS však bylo spektrum steroidů menší. Nebylo provedeno stanovení steroidního spektra u bilaterálních adrenálních expanzí způsobujících CS. Většina prací vychází ze stanovení steroidů z moči a nikoliv ze séra, což by pro klinickou diagnostiku bylo jednodušší (Di Dalmazi G. et al., 2015a; Hines J. M. et al., 2017). Odlišení ACTH dependentních forem CS pomocí steroidního metabolomu dosud popsáno nebylo.

Cíli práce bylo:

- vyvinout novou metodu stanovení steroidního metabolomu pomocí GC-MS/MS stanovující několik desítek steroidů v séru
- posoudit, zda zhodnocení steroidního metabolomu (spektra 83 steroidů) u pacientů s incidentalomy nadledvin může zpřesnit diagnostiku subklinického hyperkortizolismu
- popsat složení pacientů s incidentalomy nadledvin s SH v naší kohortě z hlediska věku, pohlaví, hormonálního profilu, komorbidit a dalších ukazatelů
- popsat a dle možností vysvětlit změny steroidního metabolomu u pacientů s různými typy CS
- zhodnotit, zda může stanovení steroidního metabolomu u pacientů pomoci v diferenciální diagnostice CS

6.2 Cíle 2. části práce – posouzení prediktivní hodnoty bazálního kortizolu u pacientů po operaci tumorů hypofýzy

Druhou částí bylo posouzení laboratorních ukazatelů centrálního hypokortizolismu u pacientů po operaci tumorů hypofýzy. U všech pacientů po operaci hypofyzárních expanzí, tumorů peri a pooperačně substituujeme glukokortikoidy, protože nevíme, u kterých pacientů dojde během operace k poškození funkce kortikotropní osy. Při poškození, nebo odstranění hypofýzy během operace dochází následně

k dlouhodobému snížení sekrece ACTH kortikotropními buňkami hypofýzy, což dále vede během několika měsíců k atrofii a snížení sekrečních schopností buněk *zona fasciculata* v kůře nadledvin produkujících kortizol (Inder W. J., Hunt P. J., 2002; Kloze M. et al., 2005). K definitivnímu zhodnocení funkce kortikotropní obvykle přistupujeme po 2 a více měsících od operace a při nízkých hodnotách ranního kortizolu provádíme synacthenový test k zhodnocení adrenální rezervy (Klose M. et al., 2005; Watts N. B., Tindall G. T., 1988). V případě časnějšího testování, kdy ještě není plně vyvinuta atrofie nadledvin lze použít inzulínový toleranční test, který vyvolanou hypoglykemií působí přes hypotalamus, hypofýzu, a odhalí teoreticky i časnou centrální lézi (Courtney C. H. et al., 2000; Karaca Z. et al., 2010).

Toto testování několik měsíců po operaci je z praktického hlediska relativně náročné, a proto byly hledány způsoby eventuální časně detekce centrálního hypokortizolizmu. Nejvýznamnějším z nich je stanovení bazálního ranního kortizolu 1-2 týdny po operaci. Řada studií porovnávala pooperační hladiny kortizolu s výsledky stimulačních testů s odstupem a ukázaly, že lze na základě bazálních hladin předpovědět riziko následného hypokortizolizmu (Jayasena C. N. et al., 2009; Karaca Z. et al., 2010; Kloze M. et al., 2005; Watts N. B., Tindall G. T., 1988).

Cílem práce bylo:

- potvrdit, nebo vyvrátit hypotézu, že lze na základě bazálních pooperačních hladin kortizolu předvídat výsledky definitivního stanovení v stimulačních testech s odstupem v našich podmínkách
- definovat rozmezí hodnot bazálního kortizolu a tomu odpovídající riziko hypokortizolizmu
- zhodnotit, zda lze na základě těchto výsledků zkrátit pooperační substituční léčbu glukokortikoidy u části pacientů

7 Metody

7.1 Metody stanovení hladin kortizolu a dalších steroidů u pacientů s incidentalomy nadledvin a Cushingovým syndromem

7.1.1 Stanovení kortizolu pomocí RIA

Stanovení kortizolu bylo kromě hmotnostní spektrometrie provedeno i radioimunoanalýzou. Byl použit Beckman Coulter Cortisol RIA kit (intra-esej variační koeficient ≤ 5.8 % pro sérum, inter-esej variační koeficient ≤ 9.2 % pro sérum). Každý vzorek byl měřen 2x v každé sérii a výsledná hodnota stanovena jako průměr těchto dvou měření.

7.1.2 Stanovení steroidů pomocí GC-MS/MS

K stanovení steroidů byla použita plynová chromatografie s detekcí hmotnostním spektrometrem s trojitým kvadrupólem. Odebrané vzorky krve byly odstředěny a získané sérum bylo zmrazeno do dalšího zpracování při teplotě -20 °C.

Příprava vzorků

Příprava vnitřního standardu:

Základní roztoky jsou v koncentraci 1mg/1ml. Vnitřní standard obsahuje 10 μ l 5-androsten-3 β -ol-17-on -2,2,3,4,4,6-d₆, 10 μ l 4,6-androstadien-17 β -ol-3-on, 100 μ l 4-pregnen-11 β ,17,21-triol-3,20-dion-9,11,12,12-d₄ a 5 μ l 4-pregnen-17,21-diol-3,11,20-trion-2,2,4,6,6,12,12-d₇. Směsný roztok se odpaří ve vakuové odparce při 55 °C a rozpustí v 1ml metanolu.

Příprava kalibrační řady.

Základní roztoky steroidů jsou v koncentraci 1mg/1ml. Z každého roztoku se odpipetuje 10 μ l. Směsný roztok se odpaří ve vakuové odparce při 55 °C a rozpustí v 1ml metanolu. Ředěním metanolem vytvoříme kalibrační řadu. (1.bod: 1:1, 2.bod 1:9, ostatní body ředíme z 2.bodu geometrickou řadou 1:3). Ze získaných zásobních

roztoků dáváme do zkumavky 100 μ l, ty odpaříme a přidáme 1 ml odsteroidněného séra. Dále zpracováváme jako vzorky.

K 1 ml vzorku séra i do bodů kalibrační řady bylo přidáno 15 μ l vnitřního standardu.

Stanovení nekonjugovaných steroidů:

Nekonjugované steroidy byly vyextrahovány pomocí 3ml diethyléteru. Extrakce byla prováděna 1,5 min. Vymražením došlo k oddělení vodné fáze, která se použila pro stanovení konjugátů. Slitá éterová fáze (stanovení nekonjugovaných steroidů) byla odpařena při 37 °C. Lipidy byly odděleny extrakcí 1 ml 80% metanolu a 1ml pentanu. Pentanová nepolární fáze byla oddělena a polární fáze byla vysušena ve vakuové odparce při 60 °C. Odparek byl rozpuštěn ve 100 μ l acetonitrilu a převeden do 1 ml konické vialky. Roztok byl odpařen. Následně byla provedena derivatizace.

Stanovení konjugátů:

K vodné fázi (po rozmrznutí o odpaření zbytku éteru) bylo přidáno 15 μ l vnitřního standardu. Kvůli vysrážení bílkovin byl přidán 1ml metanolu a směs byla promíchána. Po centrifugaci 20 minut při 3000 rpm byla horní vrstva převedena do silnostěnné zkumavky a odpařena ve vakuové odparce při 40 °C. Odparek byl chemicky hydrolyzován dle Dehennina (Dehennin L., Pérès G., 1996). K odparku byl přidán 1 ml 1 molárního trimethylchlorosilanu. Po promíchání pokračovala hydrolyza 1 hodinu při 55 °C. Poté bylo přidáno 100mg uhličitanu sodného a po promíchání byly hydrolyzované vzorky opět vysušeny ve vakuové odparce při 40 °C. Odparek byl rekonstituován 500 μ l destilované vody a dále zpracován stejně jako je popsáno výše u nekonjugovaných steroidů.

Derivatizace:

K odparku bylo přidáno 50 μ l 2% roztoku methoxyaminhydrochloridu v pyridinu. Po promíchání se inkubovalo při 60 °C 1 hodinu. Při této reakci dochází k přeměně oxo-skupin na methoximové deriváty. Po této první derivatizaci byla směs vysušena proudem dusíku.

K odparku bylo přidáno 50 μ l roztoku Sylon BTZ (směs N,O-bis(trimethylsilyl)acetamidu (BSA) + trimethylchlorosilanu (TMCS) + N-trimethylsilylimidazolu (TMSI) (3:2:3)). Po promíchání se inkubovalo při 90 °C

24 hodin. Při této reakci se tvoří trimethylsilyl deriváty na hydroxylových skupinách (TMS-MOX deriváty). Směs byla odpařována proudem dusíku 2 minuty. Potom bylo přidáno 100 µl isooktanu, 1mg amonium bikarbonátu a 50 µl N,N-dimethylformamidu. Obsah vialek byl následně důkladně promíchán (1 minutu) a potom odstředěn 20 minut při 3000 rpm. Spodní polární vrstva byla odsáta a horní nepolární vrstva byla ponechána ve vialce k GC-MS/MS analýze. K analýze GC-MS/MS byly použity 2µl tohoto roztoku.

Podmínky měření GC-MS/MS

K měření byl použit přístroj GCMS-TQ 8040 výrobce Shimadzu (Kyoto, Japonsko), složený z plynového chromatografu s automatickou detekcí průtoku AOC-20 s autosamplerm a detektoru s trojitým kvadrupólem s nastavitelným napětím 10-195 V. Analýza byla provedena v multiple monitoring (MRM) modu. Byla použita kapilární kolona RESTEK Rtx-50 (průměr 0,25 mm, délka 15 m, tloušťka filmu 0,1 µm). Elektron impact (EI) ionizace byla nastavena na napětí 60 V a emisní proud 151 µA. Teploty při vstřiku vzorku, v zdroji iontů a na rozhraní byly 220, 300, 310 °C. Analýzy byly provedeny při konstantní rychlosti nosného plynu – He 60 cm/s. Vzorky byly vstřikovány při tlaku 200 kPa 1 minutu. Napětí detektoru bylo nastaveno na 2,2 kV. Nárůst teploty byl přerušen 1 minutu při 80 °C, dále nárůst teploty 40 °C/min. na 190 °C, další nárůst 6 °C/min. na 210 °C, dále 20 °C/min. na 300 °C, 40 °C/min. na 320 °C, 4minutová pauza na 320 °C, úvodní tlak 34 kPa, teplota vstřiku 220 °C, doba analýzy 16,08 minut.

Bližší je tato metodika popsána v příloženém článku publikovaném v *Physiological Research*. Kompletní anglické znění článku je přiloženo – Příloha I.

7.1.3 Stanovení ostatních analytů

Odběry na ACTH byly provedeny ráno v 8 hodin. Krev byla odebrána do zkumavek K2EDTA, transportována na ledu, následně oddělena plazma. Ta byla dále dočasně zmrazena na - 20 °C a po rozmrazení ihned analyzována kitem Thermo Scientific BRAHMS ACTH RIA kit (intra-esej variační koeficient 3,5 %, inter-esej variační koeficient 4,7 %).

Plasmatické metanefriny byly měřeny z vzorku plazmy za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED)

s použitím fyziologických mezí pro normetanefrin 0,13 – 0,79 nmol/l a metanefrin 0,14 – 0,54 nmol/l.

Volný močový kortizol je stanoven z vzorku sbírané moči za 24 hodin. Dle množství moči je vynásobena koncentrace v stanoveném vzorku. K měření byl použit Beckman Coulter Cortisol RIA kit (intra-esej variační koeficient $\leq 8,9$ % pro moč, inter-esej variační koeficient $\leq 13,3$ % pro moč).

7.1.4 Statistické metody

S ohledem na nerovnoměrnou distribuci a nekonstantní rozptyl většiny závislých proměnných byly tyto proměnné transformovány za účelem dosažení symetrie a homoscedasticity dat před dalším zpracováním. Homogenita a distribuce transformovaných dat byla posouzena analýzou reziduí. Rozdíly mezi kontrolami a skupinami nemocných byly testovány pomocí jedno- a vícerozměrné analýzy rozptylu (ANOVA) se zohledněním dalších faktorů jako je pohlaví, suprese v dexametazonu, a dalších. Následně byla provedena Bonferroniho korekce na multiplicitu. K analýze byl použit statistický software Statgraphics Centurion, verze XV od firmy Statpoint Inc. (Herndon, Virginie, USA). K určení cut-off hodnot pro jednotlivé ukazatele byla použita receiver operating characteristics (ROC) analýza. Optimální hodnoty byly definovány maximálním Youdenovým indexem pro hodnocení diagnostických testů. Byl použit software od Number Cruncher Statistical Systems (Kaysville, Utah, USA).

7.2 Metody stanovení adrenální funkce u pacientů po operaci expanzí hypofýzy

7.2.1 Synacthenový test

Synacthenový (1-24 ACTH) test byl prováděn mezi 8. a 9. hodinou. Po minimálně osmi hodinovém lačnění (neužití ranního hydrocortisonu) byla pacientům zavedena periferní žilní kanyla alespoň 30 minut před zahájením testu. Z ní byla pacientovi odebrána krev k stanovení kortizolu a ACTH v čase 0. Po odběru bylo do kanyly aplikováno 250 μg tetracosactidu (β_{1-24} ACTH, Synacthen, Novartis, Basilej, Švýcarsko). Další odběr krve na kortizol následoval v 30. a 60. minutě. Maximální

hodnota kortizolu z hodnot v čase 0, 30, 60 minut >500 nmol/l (pokud je test prováděn v odstupu alespoň 2–3 měsíců od operace) je považována za dostatečnou.

7.2.2 Inzulinový toleranční test

Inzulinový test provádíme u pacientů po minimálně 8-hodinovém lačnění se současným vynecháním ranního hydrocortizonu. Pacientům je zavedena periferní žilní kanyla, ze které je odebrána krev na kortizol a ACTH, glykemii. Následně je do kanyly aplikováno 0,1 – 0,2 j/kg rychle působícího inzulinu. Dále je krev odebírána po 15 minutách k stanovení hladin glykemie, kortizolu a ev. GH (v případě suspekce na současný deficit GH). Při dosažení požadované hypoglykemie pod 2,2 mmol/l lačnění ukončujeme a pacient se nají. Za dostatečnou stimulaci považujeme maximální hladinu kortizolu >500nmol/l. V případě GH je limit těžkého deficitu GH (definovaný jako indikace k substituci) <3μg/l (9 mIU/l). Dostatečná stimulace je nad 10μg/l.

7.2.3 Stanovení bazálního kortizolu

K stanovení bazálních hladin kortizolu bylo použito ADVIA Centaur Cortisol assay – kompetitivní imunoesej využívající přímé chemiluminiscence. Interesej variabilita = 3.07 %, intraesej variabilita = 2.89 %. Analytická senzitivita = 27.6 nmol/l.

Detailní popis metod, sledovaných skupin pacientů, statistického zpracování a další metodologické podrobnosti jsou blíže specifikovány v následující kapitole a připojených publikacích.

8 Vlastní výsledky výzkumné práce

8.1 Změny steroidního metabolomu u pacientů

s incidentalomy nadledvin

Hypotéza: Zobrazovacími metodami náhodně zjištěná zvětšení nadledvin často vykazují známky mírné hormonální nadprodukce, zejména ve skupině glukokortikoidů. I tato mírná nadprodukce, zejména kortizolu, vede k nežádoucím klinickým projevům. Současně se zvýšenou sekrecí kortizolu dochází naopak k poklesu DHEAS a několika dalších steroidů. Dosud publikované práce hodnotící větší množství steroidů jsou omezené a plně nevysvětlují pozorované změny. Stanovení velkého množství steroidů by mohlo detailně popsat patofyziologické

změny steroidní sekrece spojené s mírným hyperkortizolismem a potenciálně zjednodušit diagnostiku subklinického CS s využitím těchto steroidních změn.

Soubor pacientů: 52 pacientů s incidentalomy nadledvin (unilaterální n=29 a bilaterální n=23) a 26 kontrol přiřazených v poměru 2:1 bylo vyšetřeno za účelem stanovení sekrece kortizolu, ACTH, aldosteronu a plazmatických metanefrinů. Vyloučení byli pacienti s komorbiditami, medikací interferujícími se steroidní sekrecí, pacienti se známou malignitou, pacienti laboratorními i klinickými známkami plně vyjádřeného hyperkortizolizmu (tvorba hematomů, svalová atrofie, měsícovitý obličej, změny distribuce tuku). Také nebyli zařazeni pacienti s pseudo-Cushingovým syndromem.

Metodika: U všech pacientů i kontrol byly provedeny odběry na stanovení steroidního metabolomu bazálně v 7 hodin ráno, poté v 23 h byl podán 1mg dexametazonu a následující den v 8 h ráno byl proveden druhý odběr. U kontrol byl dále stanoven ACTH. UFC a měření diurnálního rytmu kortizolu nebylo z praktických důvodů u kontrol provedeno.

U pacientů s incidentalomy byl vyloučen aldosteronismus stanovením aldosteronu, reninu, aldosteron renin ratio (nabíráno ve vzpřímené poloze), feochromocytom stanovením plazmatických metanefrinů. U pacientů s bilaterálním zvětšením nadledvin byl stanoven 17-OHP k vyloučení kongenitální adrenální hyperplazie. Za krátké hospitalizace byl stanoven diurnální rytmus kortizolu stanovením hladin v 7, 13, 19, 24 a 7 h následující den ráno (norma pro půlnoční hladinu <5,4 µg/dL (149 nmol/l), sběr moči na UFC (norma 13,8 – 75,4 µg/d (38,0 – 208,0 nmol/d), ACTH (norma 10–60 ng/l). Diagnóza subklinického CS byla stanovena na základě provedeného 1-mg dexametazonového testu s cut-off 50 nmol/l.

Výsledky: Z 52 pacientů s incidentalomy nadledvin suprimovalo kortizol v 1-mg dexametazonovém testu pod 50 nmol/l 11 pacientů. Zbývajících 41 mělo hodnoty kortizolu mezi 51 a 381 nmol/l. Obecné charakteristiky a výsledky základních steroidů s rozdíly a jejich statistickou významností jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2 Základní charakteristika pacientů, hodnoty změřených steroidů u jednotlivých skupin

	Controls (a)	NF (b)	SH (c)	p value	MC
Total, n	26	11	41	0,0001	ab, bc
General characteristics					
Females, n, %	13 (50)	5 (45)	29 (71)	0.125 ^a	
Bilateral, n, %	-----	5 (45)	20 (49)	0.078 ^a	
Age, y	56.3 (53.3 - 59.2)	55.3 (50.5 - 59.7)	65.5 (63.5 - 67.5)	<0.001	ac
Height, cm	171 (169 - 174)	173 (170 - 177)	166 (165 - 168)	0,022	ac
BMI, kg/m ²	28.1 (26.8 - 29.6)	29.6 (27.4 - 32)	29.7 (28.6 - 30.9)	0,449	
Tumor size, mm	-----	18.8 (15.4 - 22.7)	30.3 (27.6 - 33.2)	0,002	bc
Clinical features					
Arterial hypertension, n	14 (53)	6 (54)	33(80)	0.091 ^a	
Dyslipidemia, n	13 (50)	7 (64)	28 (68)	0.324 ^a	
Type 2 DM, n	5	1	12	0.137 ^a	
Hormonal evaluation					
Cortisol post 1 mg DXM [μg/dL]	1.4 (1.24 - 1.57)	1.3 (1.04 - 1.53)	3.7 (3.25 - 4.17)	<0.001	ac, bc
ACTH [ng/l]	30.8 (27.4 - 34.4)	34.7 (28.8 - 41.1)	17.1 (14.9 - 19.3)	<0.001	ac, bc
UFC [μg/d]	-----	69.6 (55.4 - 87.7)	56.6 (51.1 - 63.0)	0,231	
Midnight serum cortisol [μg/dL]	-----	2.4 (1.88 - 3.07)	6.52 (5.87 - 7.21)	<0.001	bc
GC-MS/MS measured steroids [nmol/l]					
Dehydroepiandrosterone	6.63 (5.31 - 8.34)	6.42 (4.59 - 9.15)	2.52 (2.14 - 2.97)	<0.001	ac, bc
DHEA sulfate	2110 (1710 - 2590)	2820 (2040 - 3920)	661 (565 - 772)	<0.001	ac, bc
DHEA7α	0.737 (0.602 - 0.906)	0.838 (0.613 - 1.16)	0.337 (0.288 - 0.394)	<0.001	ac, bc
DHEA7o	0.102 (0.071 - 0.147)	0.243 (0.135 - 0.454)	0.053 (0.04 - 0.070)	0,003	bc
DHEA7β	0.143 (0.108 - 0.189)	0.128 (0.083 - 0.196)	0.046 (0.036 - 0.058)	<0.001	ac, bc
Androstenediol	1.06 (0.859 - 1.31)	1.15 (0.837 - 1.61)	0.426 (0.364 - 0.5)	<0.001	ac, bc
Androstenediol sulfate	1050 (832 - 1350)	1160 (806 - 1740)	454 (386 - 537)	<0.001	ac, bc
AT7α	0.217 (0.182 - 0.258)	0.257 (0.197 - 0.331)	0.118 (0.101 - 0.138)	<0.001	ac, bc
AT7β	0.071 (0.056 - 0.087)	0.082 (0.058 - 0.112)	0.026 (0.02 - 0.032)	<0.001	ac, bc
THA3α5α	0.339 (0.287 - 0.398)	0.317 (0.245 - 0.407)	0.197 (0.171 - 0.226)	0,001	ac, bc
THA3α5αC	908 (740 - 1110)	1070 (785 - 1430)	284 (229 - 347)	<0.001	ac, bc
THA3β5α	0.921 (0.735 - 1.17)	0.802 (0.567 - 1.17)	0.348 (0.3 - 0.406)	<0.001	ac, bc
THA3β5αC	426 (353 - 511)	503 (379 - 660)	129 (106 - 154)	<0.001	ac, bc
THA3α5β	47.5 (40.1 - 56)	44.8 (34.2 - 57.7)	30.5 (26.1 - 35.4)	0,018	ac, bc
THA3α5βC	25.1 (19.5 - 32.2)	22.8 (15.5 - 33.6)	11.9 (9.68 - 14.7)	0,004	ac
AD3α5α17β	0.086 (0.068 - 0.109)	0.108 (0.075 - 0.158)	0.047 (0.039 - 0.055)	0,002	ac
AD3α5α17βC	42.3 (31.5 - 57.6)	53 (33.4 - 87.9)	13.9 (11.2 - 17.2)	<0.001	ac
AD3β5α17β	0.014 (0.013 - 0.017)	0.015 (0.012 - 0.018)	0.011 (0.01 - 0.012)	0,037	ac
AD3β5α17βC	76.3 (57 - 103)	97 (61.4 - 158)	26.1 (20.9 - 32.5)	<0.001	ac
AD3α5β17βC	8.72 (6.93 - 11.1)	8.24 (5.83 - 12)	4.34 (3.68 - 5.15)	0,002	ac
AD3α5β17β	0.008 (0.006 - 0.01)	0.017 (0.011 - 0.025)	0.012 (0.01 - 0.014)	0,049	ac
PregC	113 (98.5 - 131)	106 (86.1 - 132)	71.1 (64.7 - 78.4)	<0.001	ac, bc
Preg17	1.32 (1.01 - 1.73)	1.3 (0.867 - 1.98)	0.52 (0.427 - 0.634)	<0.001	ac
Preg17C	3.09 (2.53 - 3.78)	3.08 (2.27 - 4.19)	2 (1.7 - 2.34)	0,033	ac
Preg16α	0.196 (0.154 - 0.25)	0.232 (0.161 - 0.336)	0.078 (0.064 - 0.094)	<0.001	ac, bc
DHPreg20α	0.874 (0.701 - 1.1)	0.942 (0.672 - 1.35)	0.553 (0.467 - 0.656)	0,031	ac, bc
DHPreg20αC	743 (616 - 907)	785 (588 - 1080)	428 (375 - 491)	0,001	ac, bc
DHP5α	0.025 (0.019 - 0.032)	0.052 (0.036 - 0.072)	0.025 (0.020 - 0.031)	0,043	
THP3α5αC	4.31 (3.45 - 5.44)	3.82 (2.73 - 5.43)	1.78 (1.51 - 2.1)	<0.001	ac, bc
THP3β5αC	10.4 (8.88 - 12.4)	9.5 (7.48 - 12.3)	5.96 (5.34 - 6.67)	<0.001	ac, bc
THP3β5βC	1.83 (1.51 - 2.22)	1.47 (1.1 - 1.96)	0.928 (0.799 - 1.08)	<0.001	ac, bc
PD3α5αC	9.52 (7.5 - 12.3)	9.82 (6.82 - 14.8)	4.93 (4.18 - 5.85)	0,003	ac
PD3β5αC	361 (295 - 449)	300 (227 - 410)	214 (187 - 247)	0,011	ac, bc
PD3β5βC	17.5 (14.4 - 21.8)	11.6 (9.21 - 15.1)	10.1 (8.98 - 11.4)	0,004	ac, bc
PD3α5α17C	1.43 (1.04 - 1.96)	1.23 (0.754 - 2.01)	0.611 (0.473 - 0.789)	0,011	ac
PT3β5α17α20α	0.104 (0.07 - 0.152)	0.052 (0.030 - 0.087)	0.027 (0.019 - 0.037)	0,003	ac

Data vyjádřena jako retransformovaný průměr s spodním a horním 95% konfidenčním intervalem

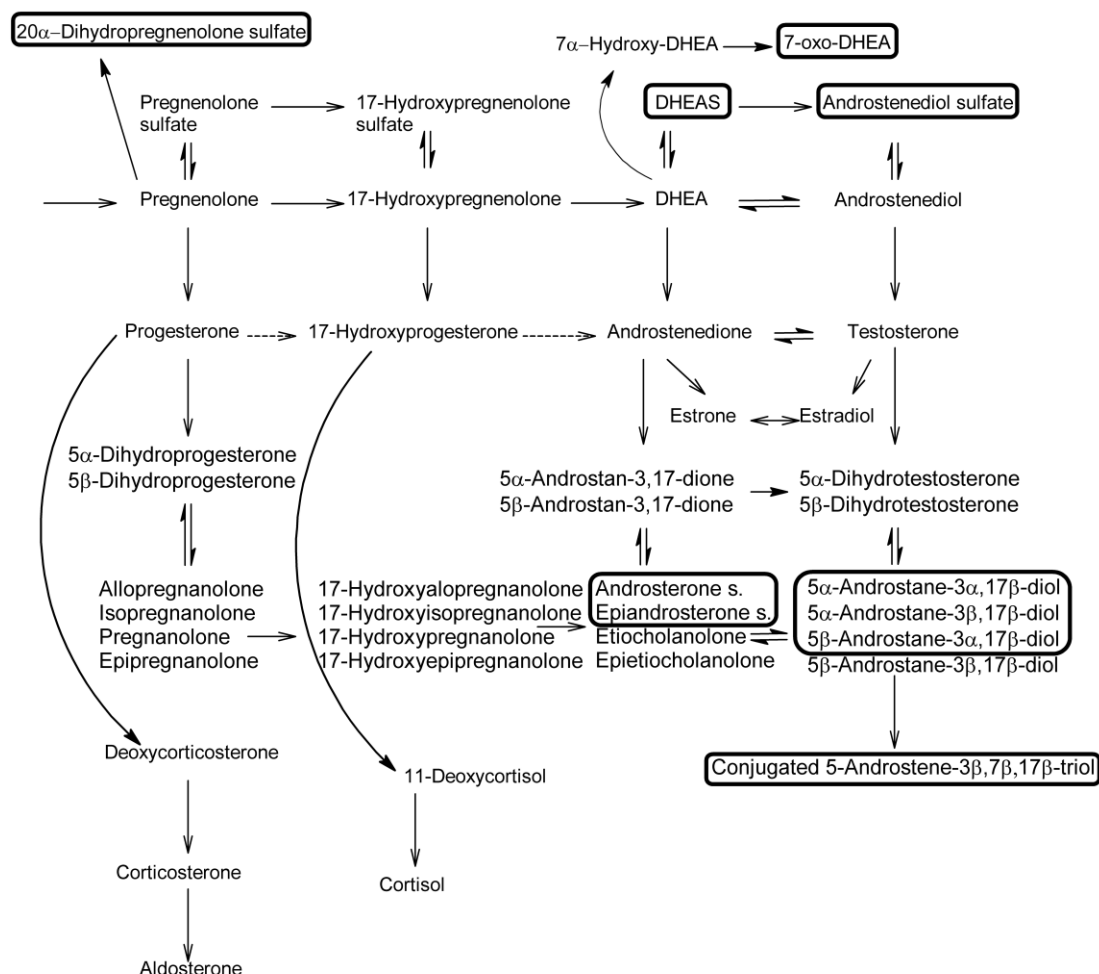
Signifikantní rozdíly mezi skupinami vyjádřeny pomocí multiple comparisons (MC) s Bonferroniho korekcí (p<0.05)

* u bilaterálních incidentalomů je použita velikost největší expanze

^aFrequenční analýza (log-linear modely)

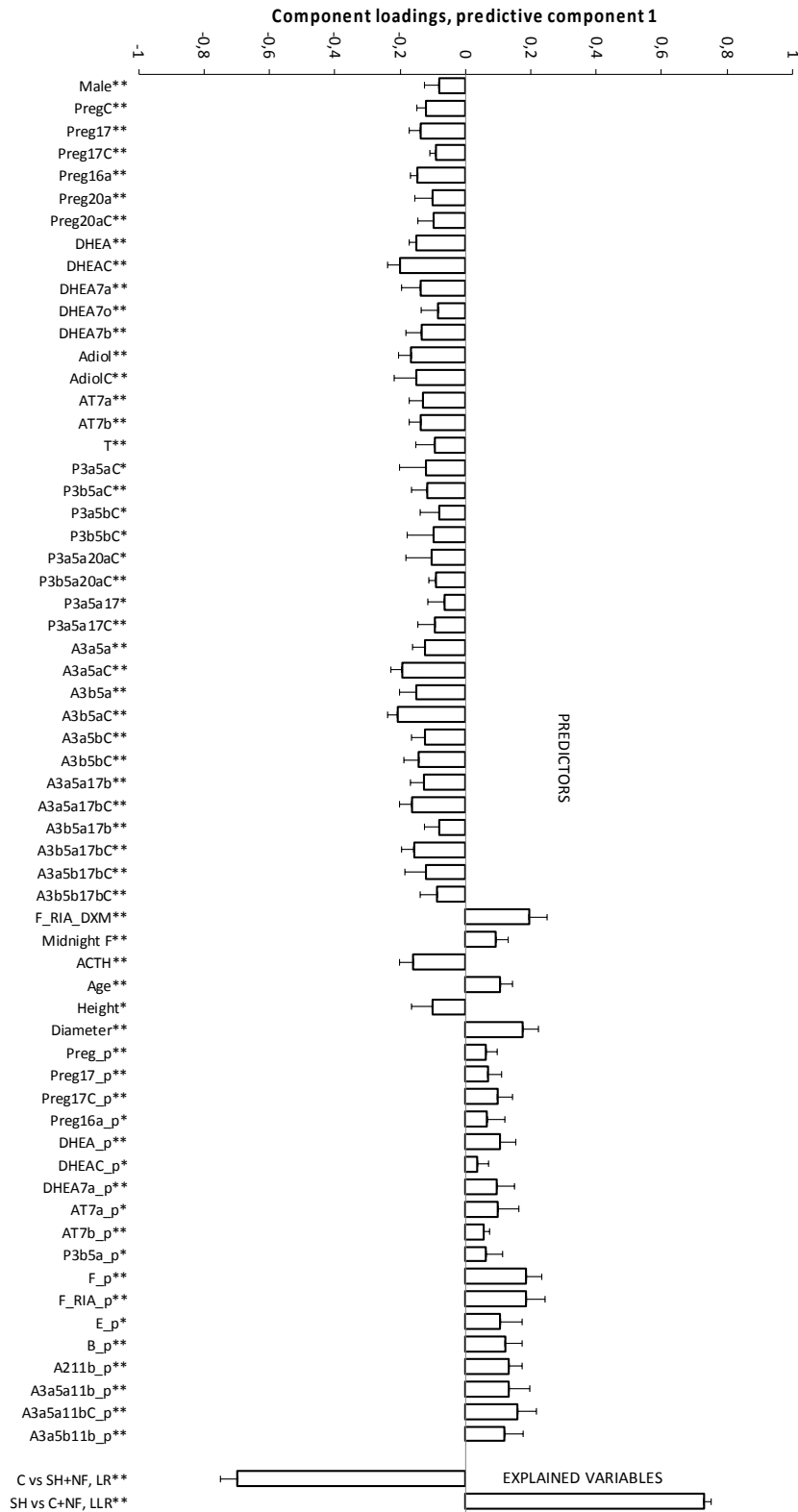
Hladiny ACTH byly signifikantně sniženy ve skupině subklinického CS oproti ostatním horm. afunkčním incidentalomům a kontrolám. Porovnání UFC neprokázalo statisticky významné rozdíly mezi skupinami. V hladinách kortizolu v 1-mg dexametazonovém testu jsme neprokázali statisticky významné rozdíly.

Při porovnání bazálních hladin steroidů měřených GC-MS/MS jsme prokázali signifikantní snížení u pacientů se subklinickým CS oproti hormonálně afunkčním incidentalomům u 10 z 83 měřených steroidů (Obr. 9).



Obr. 9 Steroidy signifikantně statisticky odlišné ve skupině subklinického CS oproti skupině hormonálně afunkčních incidentalomů

Žádný z měřených steroidů nebyl u pacientů se subklinickým CS signifikantně vyšší. Stejně tak žádný z měřených steroidů nevykazoval signifikantní změny ve skupině bilaterálních incidentalomů oproti unilaterálním ve skupině subklinického CS. Při supresi dexametazonem jsme u části steroidů změny nepozorovali, u části došlo k poklesu. Žádný ze sledovaných steroidů nestoupl (Tabulka 2). K posouzení jednotlivých faktorů predikujících subklinický CS bylo použito metodiky Orthogonal Projections to Latent Structure (OPLS). Výška sloupců odpovídá vlivu jednotlivých faktorů na zařazení do skupiny subklinického CS (Obr. 10).



Obr. 10. Zastoupení jednotlivých faktorů a jejich vztahu k dg. Subklinického CS

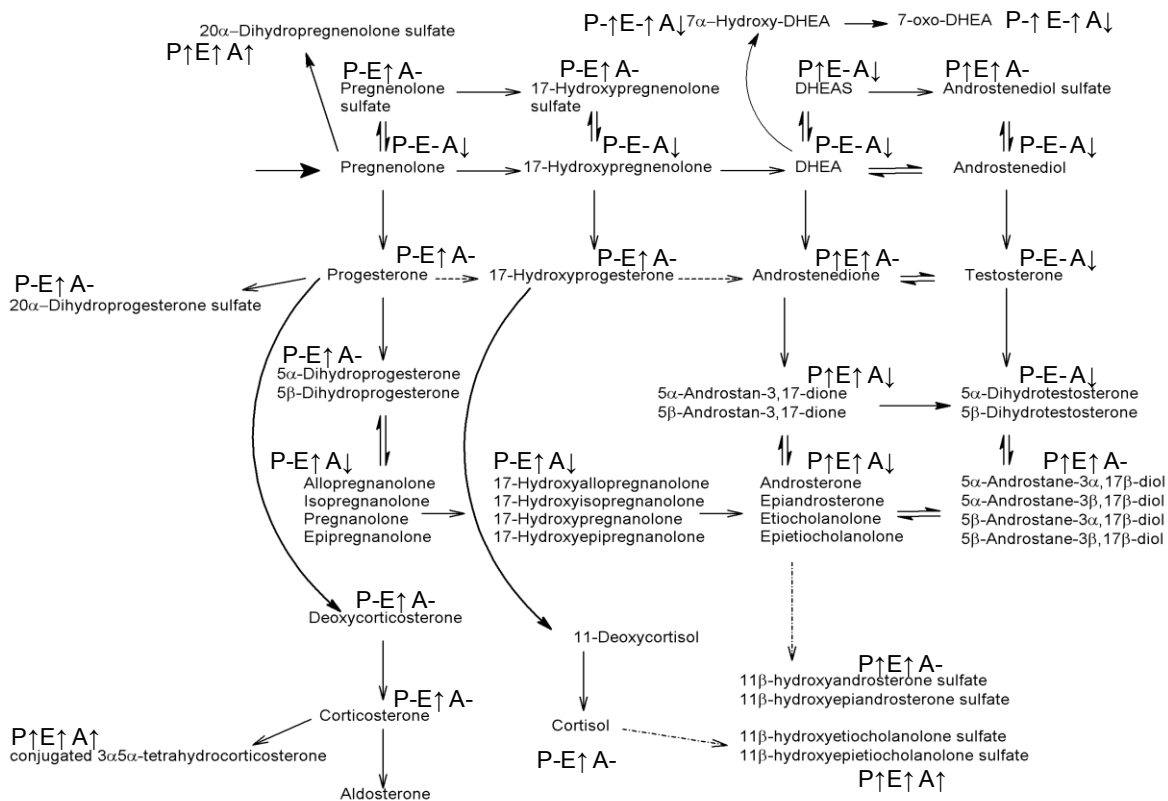
Článek byl publikován v časopise Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. Kompletní anglické znění článku je přiloženo – Příloha II.

8.2 Změny steroidního metabolomu u pacientů s Cushingovým syndromem

Soubor pacientů: U 80 pacientů s CS (51 Cushingova chorobou, 6 ektopická sekrece ACTH, 16 adenom kůry nadledviny, 7 bilaterální makronodulární hyperplazie (BMAH)) a 23 kontrol jsme odebrali vzorky séra v 7 h ráno. Vzorky byly odebrány mezi červnem 2006 a lednem 2018. Diagnóza CS byla provedena na základě symptomů a kombinace laboratorních znaků CS (půlnoční kortizol, UFC/24 h, dexametazonový supresní test). Další rozdělení do jednotlivých skupin bylo provedeno na základě hladin ACTH (<10 ng/l onemocnění nadledvin, >20 ng/l ACTH dependentní forma). U adrenálních forem bylo k rozlišení bilaterálního postižení použito CT, případně scintigrafie s cholesterolem, nebo katetrizace adrenálních žil. Do studie nebyli zařazeni pacienti léčení medikací interferující s hladinami steroidů. Stejně tak nebyli zařazeni pacienti s karcinomy nadledvin ani pacienti s feochromocytomem.

Výsledky: U všech skupin pacientů s CS jsme pozorovali nedostatečnou supresi kortizolu v 1mg dexametazonovém testu. Nejvyšší hodnoty kortizolu, ale i ACTH měli pacienti s ektopickou formou CS. UFC byl též v této skupině nejvyšší, ale oproti pacientům s Cushingovou chorobou rozdíl nedosáhl statistické signifikance. UFC byl signifikantně vyšší ve skupině Cushingovy choroby oproti CS při adenomech nadledvin, zatímco hladiny půlnočního kortizolu byly u těchto skupin srovnatelné.

Statisticky signifikantní rozdíly mezi různými typy CS jsou znázorněny na Obr. 11.



Obr. 11 Zobrazení steroidního metabolomu a jeho signifikantní změny ($p < 0,05$) oproti kontrolám. Cushingova choroba (P); Ektopický CS (E); Adrenální CS (A)

U ACTH-dependentních forem CS jsme pozorovali zvýšené hladiny většiny androgenních metabolitů, jmenovitě DHEAS, 7α- and 7oxo-hydroxy DHEA, androstendiol sulfát, androstendion, 5α-androstan-3,17-dion, androsteron, etiocholanolon sulfát, epietiocholanolon sulfát, 11β-hydroxyandrosteron sulfát, 11β-hydroxyepiandrosteron sulfát, 11β-hydroxyetiocholanolon, 11β-hydroxyetiocholanolon sulfát, konjugovaný 5β-androstan-3α,17β-diol, konjugovaný 5β-androstan-3β,17β-diol. Ve skupině ektopického CS jsme v mineralokortikoidní dráze dávající za vznik aldosteronu pozorovali signifikantní zvýšení progesteronu, konjugovaného 20α-dihydroprogesteronu, deoxykortikosteronu, kortikosteronu, konjugovaného 3α,5α-tetrahydrokortikosteronu. Ve skupině Cushingovy choroby byly též zvýšené mineralokortikoidní prekuzory, ale k signifikantnímu rozdílu oproti kontrolám došlo pouze v případě konjugovaného 3α,5α-tetrahydrokortikosteronu.

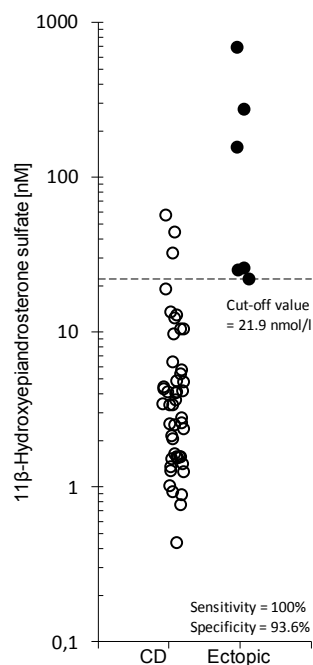
Naopak u ACTH independentní formy CS byly snížené hladiny většiny androgenů a jejich metabolitů: DHEA, DHEAS, 7α- and 7oxo-hydroxy DHEA,

androstenediol, 5 α -androstan-3,17-dion, androsteron, epiandrosteron, testosteron a 5 α -dihydrotestosteron, 5 α -androstan-3 α ,17 β -diol, 5 α -androstan-3 β ,17 β -diol. Hladiny mineralokortikoidních prekurzorů se v této skupině statisticky nelišily od kontrol.

V takzvané „zadní cestě“ (back-door pathway) od progesteronu k adrenálním androgenům jsme pozorovali zvýšení u pacientů s ektopickým CS u 5 α -dihydroprogesteronu, isopregnanolon sulfátu, konjugovaného pregnanolonu, konjugovaného epipregnanolonu, 17-hydroxyallopregnanolonu, konjugovaného i volného 17-hydroxypregnanolonu.

5 β -hydroxylované androstany, volný i konjugovaný 11 β -hydroxyetiocholanolon byly signifikantně zvýšené u všech skupin CS oproti kontrolám. 5 α -hydroxylované androstany, 11 β -hydroxyandrosteron sulfát, 11 β -hydroxyepiandrosteron sulfát byly signifikantně zvýšené pouze u ACTH-dependentních forem CS.

Pomocí ROC analýzy jsme hledali steroidy nejvíce rozlišující Cushingovu chorobu od ektopické sekrece ACTH. Nevyšší senzitivitu 100% a specificitu 93,6% při cut-off 21,9 nmol/l jsme našli u 11 β -hydroxyepiandrosteron sulfátu, Obr. 12.



Obr. 12 Rozlišení Cushingovy choroby (CD), n=51, od Ektopického CS (n=6). Pro lepší zobrazení bylo použito logaritmické měřítko osy x.

Mezi skupinami unilaterálních adrenálních adenomů a skupiny BMAH jsme neprokázali signifikantní rozdíl.

8.3 Prediktivní hodnota bazálního kortizolu při hodnocení kortikotropní osy u pacientů po operaci hypofyzárních tumorů

Hypotéza: U pacientů po operaci hypofýzy obvykle substituujeme glukokortikoidní funkci během minimálně 2-3 měsíců po operaci do doby, než můžeme provést synacthenový (ACTH) test stimulace nadledvin k posouzení funkce adrenokortikotropní osy. V pracích jiných autorů bylo ukázáno, že lze měřením bazálního ranního kortizolu s určitou pravděpodobností předpovědět výsledek tohoto stimulačního testu s odstupem a eventuálně vysadit glukokortikoidní substituci dříve. Cílem naší práce bylo potvrzení této hypotézy a určení skupin pacientů, u kterých má pooperační bazální hladina kortizolu největší prediktivní hodnotu ve vztahu k další terapii.

Soubor pacientů: U pacientů s tumory hypofýzy, operovanými mezi 1.1.2009 a 31.12. 2012 na Neurochirurgii UVN, 1.LF UK a léčenými na 3.interní klinice VFN a 1.LF UK jsme retrospektivně analyzovali data 94 pacientů. Z nich bylo 61 pacientů s hormonálně afunkčními adenomy, 29 produkujících GH, 4 prolaktinomy (Tabulka 3).

Tabulka 3 Charakteristika skupin.

	Celkem	NF	GH	PRL
n	94	61	29	4
Věk (roky)	53.3±30.2	57.7±28.8	46.2±26.8	36.2±10.6
Muži/Ženy	49/45	31/30	16/13	2/2
Pooperační adrenální insuficience	13	12	0	1

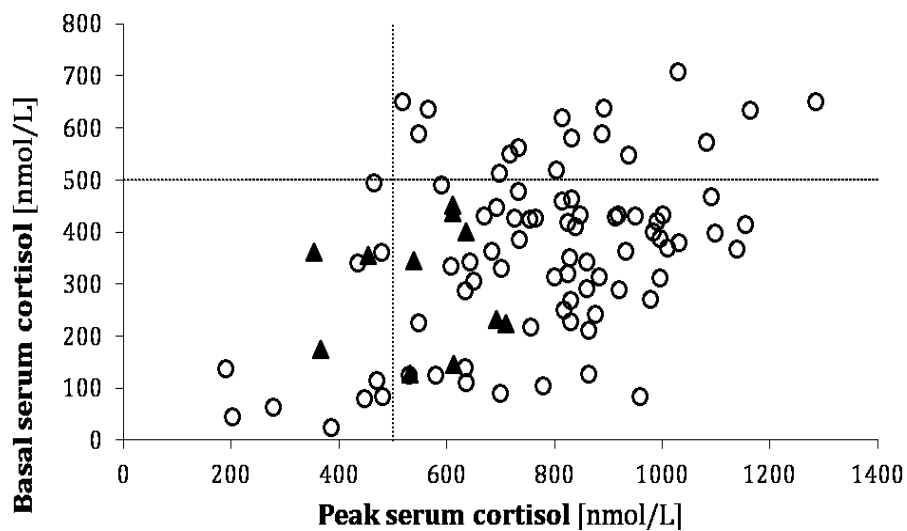
NF - hormonálně afunkční adenom, GH - růstový hormon produkující adenom, PRL - prolaktinom; věk vyjádřen jako průměr ±2SD

Žádný z nich neměl Cushingovu chorobu ani nebyl reoperován. Pacienti, u kterých nebyl stimulační test proveden (část pacientů s bazálním kortizolem pod 100 nmol/l a naopak nad 500 nmol/l), nebyli do hodnocení zařazeni. U 9 pacientů byla glukokortikoidní substituce zahájena již předoperačně, 22 pacientů mělo předoperačně zjištěnou centrální hypotyreózu, 31 centrální hypogonadismus. Žádný z pacientů neužíval kontraceptiva ani hormonální substituční léčbu.

Metodologie: Všichni pacienti byli peri- a pooperačně léčeni standartní substituční léčbou hydrocortisonem. Odběr bazálního kortizolu byl proveden bez užití ranní dávky hydrocortisonu medián 7. den (kvartily 6., 8.den). U pacientů s hladinou kortizolu nad 500 nmol/l byla substituce hydrocortisonem vynechána. U ostatních byla ponechána v dávce 15–20 mg/den se zvyšováním při zátěžových stavech až do provedení stimulačních testů s odstupem medián 3,6 měsíců (64, 220 dní, kvartily) od operace. K zhodnocení sekrece kortizolu byl použit u 11 pacientů inzulinový toleranční test (ITT), u 83 synacthenový test s použitím 250 µg 1-24 ACTH. Provedení těchto testů je popsáno výše v metodické sekci.

Výsledky: Všech 16 pacientů s hodnotami bazálního pooperačního kortizolu >500 nmol/l prokázalo dobrou odpověď v stimulačních testech. 78 z 94 pacientů mělo hladiny kortizolu <500 nmol/l. Z těchto 78 pacientů mělo pouze 13 (17 %) pacientů nedostatečnou odpověď (<500 nmol/l) v stimulačních testech.

Ve skupině pacientů s bazálním kortizolem <100 nmol/l měli pouze 2 z 7 pacientů dostatečnou odpověď v stimulačních testech. Ve skupině pacientů s bazálním kortizolem 100–200 nmol/l byla stimulovaná sekrece dostatečná u 8 z 11 (73 %) pacientů. Ve skupině pacientů s bazálním kortizolem 200–370 nmol/l mělo 28 z 32 (88 %) pacientů dostatečnou odpověď v stimulačních testech. Pacienti s bazálním kortizolem 370–500 nmol/l měli v 27 z 28 případů dostatečnou odpověď v stimulačním testu. Jeden pacient měl bazální kortizol 494 nmol/l a stimulovanou maximální hodnotu 465 nmol/l. Z devíti pacientů substituovaných hydrocortisonem před operací byla prokázána adrenokortikální insuficience pooperačně u dvou z nich. Při porovnání maximálních hladin kortizolu v stimulačních testech byly prokázány statisticky významně vyšší hodnoty v synacthenovém testu oproti testu s inzulinem. Výsledky zobrazeny v Obr. 13.



Obr. 13 Vztah hodnot bazálního kortizolu časně po operaci (osa y) a stimulačních testů s odstupem několika měsíců (osa x), Δ – ITT; \circ – synacthenový test

Článek byl publikován v časopise *Physiological Research*. Kompletní anglické znění článku je přiloženo – Příloha III.

9 Diskuze

9.1 Subklinický hyperkortizolismus u pacientů s incidentalomou nadledvin

Řada studií poukázala na změny zejména androgenů spojené se subklinickým hyperkortizolismem. Cílem této práce bylo stanovit změny velkého množství steroidů a zhodnotit jejich asociaci s rutinně používanými parametry subklinického CS.

Mírný chronický hyperkortizolismus při adenomu nadledviny vede k supresi ACTH způsobující atrofii a sníženou steroidogenezi v kontralaterální nadledvině i přilehlé reziduální adrenální tkáni (Morio H. et al., 1996; Nawata H. et al., 1985). Po adrenalectomii s odstraněním adenomu dochází k poklesu hladin androgenů, což podporuje teorii mírné androgenní produkce v adenomech nadledvin s subklinickým CS (Kamenický P. et al., 2007). Tato relativně malá androgenní sekrece může být vysvětlena sníženou expresí cytochromu b5 a NADPH-cytochrom P450 reduktázy, což vede k snížené aktivitě 17, 20-lyázy (Sakai Y. et al., 1994). Nízký DHEAS u pacientů s subklinickým CS byl popsán již v mnoha studiích (Nawata H. et al., 1985; Yamaji T., Ibayashi H., 1969). Také nízký volný DHEA and androstendion byl popsán (Di Dalmazi G. et al., 2015a; Ozgen A. G. et al., 2001). Naše výsledky tyto poznatky potvrzují. Je nutné brát v potaz změny těchto hormonů v různých věkových skupinách, neboť např. DHEAS klesá s narůstajícím věkem (Dušková M. et al., 2018).

Bylo popsáno zvýšení 17-hydroxyprogesteronu and 11-deoxykortizolu po stimulaci ACTH, ale studie používající přesné stanovení pomocí LC-MS/MS tyto změny nepotvrdila (Di Dalmazi G. et al., 2015a; Reincke M. et al., 1997; Seppel T., Schlaghecke R., 1994).

V souladu s výše popsanými známými změnami naše výsledky potvrzují zásadní roli nízkého DHEAS u obou pohlaví a unilaterálních i bilaterálních incidentalomů se subklinickým CS. Kromě toho poukazujeme na další dosud nepopsané změny steroidního metabolismu spojené se subklinickým CS. Androsteron vzniká z DHEA klasickou cestou (Bloem L. et al., 2013; Masuda M., 1957). Byla však popsána i tzv. „back-door“ cesta k DHT vedoucí z progesteronu

přes androsteron (Auchus R. J., 2004; Van L. T., 2013). U pacientů s plně vyjádřeným CS (jiná studie) jsme též pozorovali obdobné, ale více vyjádřené změny. Na základě těchto znalostí usuzujeme, že nízké hladiny epiandrosteron sulfátu, androsteron sulfátu, androstenediol sulfátu, konjugovaného 5 α -androstan-3 β ,17 β -diolu, konjugovaného 5 α -androstan-3 α ,17 β -diolu, a konjugovaného 5 β -androstan-3 α ,17 β -diolu vycházejí pravděpodobně z nízkého DHEAS. Nelze však vyloučit ani příspěvek „back-door“ cesty.

Hladiny epiandrosteron sulfátu, androsteron sulfátu, a konjugovaného 5 α -androstan-3 β ,17 β -diolu pozitivně korelovaly s kostní denzitou (Moayyeri A. et al., 2018). Snížená kostní denzita může být vysvětlena buď mírným hyperkortizolismem, který vede přímo k snížení denzity, nebo sníženým osteoanabolickým efektem snížených hladin androgenu u subklinického CS.

7 α -hydroxy-DHEA vzniká 7 α -hydroxylací DHEA katalyzovanou CYP7B1. 7 α -hydroxy-DHEA je pak konvertován na 7-oxo-DHEA a dále až na 7 β -hydroxy-DHEA 11 β -hydroxysteroid dehydrogenázou typu I, která rovněž katalyzuje konverzi neaktivního kortizonu na aktivní kortizol. Konverze 7 α -hydroxy-DHEA na výše zmíněné produkty tedy kompetuje s aktivací kortizonu. U 7 α -hydroxy-DHEA byly prokázány antiglukokortikoidní, neuroprotektivní, a antioxidační účinky (Fukushima D. K. et al., 1954; Kolatorova Sosvorova L. et al., 2016; Muller C. et al., 2006).

Snížení exkrece 20 α -dihydropregnenolon sulfátu v moči (pregnendiol-d5 sulfát), bylo popsáno současně s pregnentriolem a tetrahydro-11-deoxykortizolem jako nejvíce diskriminující při rozlišení adrenálního karcinomu od adenomu (Arlt W. et al., 2011). To ukazuje na potenciální roli 20 α -dihydropregnenolon sulfátu, jako markeru pro odlišení benigních adrenálních incidentalomů od maligních.

Vliv dexametazonu na steroidní metabolom zatím popsán nebyl. Naše data ukázala největší rozdíly v poklesu u kortizolu, DHEA, 11 β -hydroxylovaných katabolitů androstendionu, androsteronu a etiocholanolonu. To ukazuje na sníženou aktivitu 11 β -hydroxylázy vyvolanou dexametazonem u adrenálních incidentalomů u pacientů s subklinickým CS, což již bylo popsáno ve studiích se stimulací Synacthenem (Di Dalmazi G. et al., 2015a).

Pomocí receiver operating characteristics (ROC) křivek jsme prokázali největší souvislost se subklinickým hyperkortizolismem u DHEAS (cut-off 1830 nmol/l), půlnoční kortizol (cut-off 126 nmol/l), epiandrosteron sulfát (279 nmol/l), androsteron sulfát (759 nmol/l), ACTH (cut-off 20 ng/L) a dalších steroidů. To potvrzuje správnost naší klinické praxe využívající hladin půlnočního kortizolu, suprese ACTH a snížení uvedených steroidů, a to s obdobnou senzitivitou a specificitou. UFC nekoreloval se supresí kortizolu v dexametazonovém testu. To může být vysvětleno odlišným mechanismem zvýšení UFC oproti supresi ACTH po dexametazonu.

OPLS model ukázal na vliv jednotlivých faktorů na zařazení do skupin dle odpovědi na dexametazon. Nižší pokles řady steroidů je spojen se subklinickým hyperkortizolismem. Rozměr incidentalomů, půlnoční sérový kortizol i věk pozitivně korelovaly s subklinickým CS v tomto modelu (Di Dalmazi G. et al., 2015a).

Na závěr lze říci, že nová metoda GC-MS/MS nám umožnila stanovení velkého množství steroidů u pacientů se subklinickým CS. Potvrdili jsme u nich nízké hladiny DHEAS a popsali další, dosud nepopsané změny steroidního metabolomu. Změny těchto steroidů odpovídají subklinickému CS s obdobnou senzitivitou a specificitou jako běžné používané klinické metody. Přesnější zhodnocení těchto steroidních změn musí být dále zhodnoceno ve studiích porovnávající klinické dopady a komorbidity.

9.2 Změny steroidního metabolomu u pacientů s Cushingovým syndromem

Tato práce popisuje změny steroidního spektra u různých forem CS. Většina dřívějších studií se věnovala stanovení steroidů ze sbírané moči. Bylo popsáno snížení DHEA u adrenálních adenomů, ale zvýšení u ACTH dependentních forem CS (Schöneshöfer M. et al., 1986). Snížení močových hladin androstentriolu, androsteronu a etiocholanolonu u adenomů nadledvin s CS potvrdil další autor (Kikuchi E. et al., 2000). Naše data potvrzují zvýšení androgenů u ACTH dependentních forem CS a jejich snížení u adrenálního CS. Dále jsme pozorovali snížení DOC a kortikosteronu u ektopické formy CS, ale ne u Cushingovy choroby.

To může být vysvětlenou sníženou aktivitou aldosteron syntetázy s následnou akumulací těchto prekurzorů.

K rozlišení ektopického zdroje ACTH od Cushingovy choroby je „zlatým standardem“ katetrizace petrózních splavů. Stejně tak vysokodávkový dexametazonový supresní test a test s CRH mají v tomto rozlišení vysokou výpovědní hodnotu (Isidori A. M. et al., 2006). Také vysoké hladiny ACTH > 200ng/l byly v dřívějších pracích považovány za podezřelé z ektopické sekrece. Pozdější práce však ukázaly že méně metabolicky aktivní tumory mohou mít hladiny ACTH podobné jako vídáme u Cushingovy choroby (Howlett T. A. et al., 1986). Při výběru steroidů k odlišení těchto dvou forem CS se jako nejpřesnější jeví 11 β -hydroxyepiandrosteron sulfát s 100 % senzitivitou a 93.6 % specificitou. Tento fenomén může být vysvětlen celkově vyšší hladinou ACTH v naší relativně malé skupině pacientů s ektopickou sekrecí ACTH s následným zvýšením androgenních metabolitů včetně 11 β -hydroxyepiandrosteron sulfátu.

Při rozlišení adrenálních adenomů s CS od BMAH jsme nepozorovali signifikantní rozdíly, což už bylo dříve publikováno (Hsiao H. P. et al., 2009).

Je třeba zmínit určité limitace této práce vycházející z relativně malého počtu pacientů s ektopickým CS a BMAH, což však vzhledem k nízkému výskytu v populaci lze často pozorovat i v ostatních pracích. Řešením by bylo provedení multicentrické studie se zapojením většího množství center.

9.3 Prediktivní hodnota bazálního kortizolu při hodnocení kortikotropní osy u pacientů po operaci hypofyzárních tumorů

Druhým tématem této práce bylo zhodnocení výpovědní hodnoty bazálního kortizolu u pacientů po operacích tumorů hypofýzy ve srovnání s definitivním zhodnocením stimulačními testy s odstupem. V pooperačním období hraje zhodnocení hypofyzárních os důležitou roli. Zhodnocení adrenokortikální osy časně pooperačně je obvykle možné pouze pomocí ranního bazálního kortizolu. Není příliš senzitivní ani specifické pro všechny pacienty, ale větší prediktivní hodnotu má u okrajových skupin s nízkou nebo naopak vysokou hladinou bazálního kortizolu.

Opakovaně bylo poukázáno na to, že pooperační bazální hladiny kortizolu <80-111 nmol/l jsou velmi suspektní z adrenální insuficience (Courtney C. H. et al., 2000; Inder W. J., Hunt P. J., 2002; Jayasena C. N. et al., 2009; Karaca Z. et al., 2010; Watts N. B., Tindall G. T., 1988). Na druhou stranu dostatečně vysoké hladiny bazálního kortizolu pooperačně vykazovaly v publikacích větší rozptyl, 450 nmol/l (Courtney C. H. et al., 2000; Inder W. J., Hunt P. J., 2002), 400 nmol/l (Klose M. et al., 2005), 392 nmol/l (Jayasena C. N. et al., 2009). V naší práci je hladina kortizolu vykazující 100% specificitu pro detekci pouze hypokortikálních pacientů 82 nmol/l a naopak 100% specificita pro vyloučení adrenální insuficience vyšla 495 nmol/l. Tato vyšší hodnota oproti ostatním pracím může být zkreslena jediným pacientem, který měl bazální kortizol 494 nmol/l a maximální stimulovaný 465 nmol/l. Bez tohoto pacienta s parciální adrenokortikální insuficiencí by statisticky významnější cut-off bazálního kortizolu bylo 370 nmol/l, které více odpovídá ostatním pracím a pod kterým jsou všichni ostatní pacienti s adrenální insuficiencí. U těchto dvou skupin s velmi pravděpodobnou adrenální insuficiencí, a naopak dobrou funkcí kortikotropní osy, by teoreticky nebyly nutné další stimulační testy. Prakticky však byly vzácně popsány případy opožděné adrenální insuficience (Gleeson H. K. et al., 2003).

Zbývající skupina pacientů s nevyhraněnými hladinami bazálního kortizolu dále vyžaduje provedení stimulačního testu. Někteří autoři rozlišují skupinu pacientů, kde stačí substituce pouze v zátěžových stavech a skupinu, kde je nutná permanentní substituce až do definitivního zhodnocení osy ve stimulačním testu (Courtney C. H. et al., 2000; Khan M. et al., 2011). Navrhují bezpečnou hranici pro vysazení permanentní substituce při hladině bazálního kortizolu pooperačně nad 250, nebo 276 nmol/l (Courtney C. H. et al., 2000; Khan M. et al., 2011). To však dle naší praxe může, i když ojediněle, vézt k hypokortikalismu při zátěžových stavech, a proto u všech těchto pacientů s nejistou hladinou bazálního kortizolu ponecháváme alespoň minimální substituční terapii až do finálního zhodnocení stimulačními testy. Z naší zkušenosti dávky 15-20mg hydrocortisonu denně, které byly potvrzeny i v jiných studiích, nemají žádné nežádoucí účinky (Mah P. M. et al., 2004).

Synacthenový test prokázal dobrou korelaci s ITT (Stewart P. M. et al., 1988). V pooperačním období po operaci hypofýzy však může podhodnotit adrenální insuficienci z důvodu zatím zachované citlivosti adrenální kůry na ACTH krátce po

poškození hypofyzární sekrece. Z toho důvodu se doporučuje použití synacthenového testu k definitivnímu zhodnocení adrenokortikální osy 1-3 měsíce pooperačně (Inder W. J., Hunt P. J., 2002; Kloze M. et al., 2005). V naší práci byl u menší části pacientů použit ITT, u většiny synacthenový test s použitím 250 µg 1-24 ACTH, což je obecně doporučovaná dávka použitá v mnoha studiích (Abdu T. A. M. et al., 1999; Agha A. et al., 2006; Tordjman K. et al., 2000). To vylučuje riziko nepřesného naředění při použití 1 µg ACTH kritizované některými autory. K průkazu dostatečné maximální odpovědi jsme použili cut-off 500 nmol/l, což je ve shodě s ostatními publikacemi na toto téma a dle naší zkušenosti odpovídá klinickým obtížím pacientů. Statisticky vyšší hodnoty kortizolu při stimulaci synacthenem oproti ITT mohou být způsobeny nenáhodným výběrem pacientů k stimulačnímu testu, kde má ITT více kontraindikací než synacthenový test.

Závěrem lze konstatovat, že časné pooperační hodnoty bazálního kortizolu spolehlivě predikují zachovanou funkci kortikotropní osy při hladinách kortizolu nad 500 nmol/l, což umožňuje vysazení pooperační substituce hydrocortisonem. U pacientů s hladinami kortizolu mezi 370 a 500 nmol/l je velmi vysoká pravděpodobnost zachované kortikotropní osy. V této skupině lze potenciálně na základě individuálního posouzení substituci ponechat pouze pro zátěžové stavy ovšem s nutností definitivního zhodnocení v stimulačních testech s odstupem. U pacientů s bazálním kortizolem pod 370 nmol/l je substituční terapie nutná u všech pacientů až do definitivního otestování. Ve skupině mající bazální kortizol pod 100 nmol/l pooperačně je vysoká pravděpodobnost adrenokortikální insuficience, ale i přes to může časem dojít k restituci adrenokortikální funkce.

10 Závěry

10.1 První část práce

Na stanovené cíle a vyslovené hypotézy vycházející z části naší práce hodnotící steroidní metabolom u pacientů s incidentalomy nadledvin a různými typy CS lze odpovědět následovně:

1. Lze vyvinout novou metodu stanovení steroidního metabolomu pomocí GC-MS/MS stanovující několik desítek steroidů v séru?

Vyvinuli jsme nový postup přípravy vzorků séra a jejich následného změření pomocí GC-MS/MS. Validace byla provedena na různých typech pacientů – muži, ženy netěhotné i těhotné, fetální krev z pupečníku novorozenců. V těchto vzorcích jsme stanovili 100 různých steroidů a jejich konjugátů. Tuto metodu jsme následně použili i při stanovení steroidů u pacientů s incidentalomy nadledvin a různými typy CS.

2. Může zhodnocení steroidního metabolomu u pacientů s incidentalomy nadledvin zpřesnit diagnostiku subklinického hyperkortizolizmu?

Stanovení steroidního metabolomu u pacientů s incidentalomy nadledvin pravděpodobně nenahradí současně používané metody stanovení steroidní sekrece. Může však v budoucnu, při potvrzení našich výsledků pomoci při diferenciaci adenomů od karcinomů, zjednodušení diagnostiky mírného hyperkortizolizmu. Naše výsledky potvrzují možnost stanovení DHEAS, případně dalších steroidů, které bývají při subklinickém hyperkortizolizmu snižené.

3. Jaké je složení pacientů s incidentalomy nadledvin s SH v naší kohortě z hlediska věku, pohlaví, hormonálního profilu, komorbidit a dalších ukazatelů?

Oproti hormonálně afunkčním incidentalomům jsme neprokázali ve skupině SH signifikantní převahu ani jednoho pohlaví. Pacienti ve skupině SH (průměr 65,5 let) byli mírně starší oproti pacientům v hormonálně afunkční skupině (průměr 55,3 let), rozdíl však nedosáhl statistické významnosti. Stejně tak bylo ve skupině SH více pacientů s bilaterálními expanzemi, ovšem v naší kohortě rozdíl nedosáhl statistické významnosti $p < 0,05$. Statisticky významný však vyšel vyšší průměr incidentalomu u pacientů s SH (průměr 30,3 x 18,8mm), což je ve shodě

s ostatními pracemi na toto téma. Z hlediska komorbidit jsme neprokázali statisticky významné rozdíly mezi skupinami, což může být způsobeno relativně malým počtem pacientů.

4. Jaké a čím jsou způsobené změny steroidního metabolomu u pacientů s různými typy CS?

U pacientů s ACTH independentním CS dochází k poklesu androgenů a jejich metabolitů. Naopak u ACTH dependentních forem CS jsou androgeny spíše zvýšené a současně u ektopických forem CS jsme prokázaly zvýšení mineralokortikoidních prekurzorů ve srovnání se zdravými kontrolami. Jako hlavní příčina těchto rozdílů se jeví stimulace ACTH, ale nelze vyloučit ani jiné, dosud neodhalené hormony.

5. Může stanovení steroidního metabolomu u pacientů pomoci v diferenciální diagnostice CS?

Na základě našich výsledků a ostatních prací na toto téma můžeme říci, že znalost steroidního metabolomu je již rutinně používána při diagnostice CS. U adrenálních lézí je vyšetření androgenů jedním z důležitých vyšetření při suspekci na karcinom nadledviny. Stanovení dalších, dosud rutinně neužívaných steroidů může v budoucnu tuto diagnostiku zpřesnit. Ektopické formy CS oproti centrální formě CS (Cushingova choroba) vykazují kromě ACTH změny v steroidním metabolomu, které by potenciálně mohly v budoucnu pomoci v diferenciální diagnostice CS.

10.2 Druhá část práce

Na stanovené cíle a vyslovené hypotézy vycházející z části naší práce hodnotící pooperační hladiny bazálního kortizolu ve vztahu k pooperačnímu hypokortizolizmu lze odpovědět následovně:

1. Lze na základě bazálních pooperačních hladin kortizolu předvídat výsledky definitivního stanovení v stimulačních testech s odstupem v našich podmínkách?

Na základě výsledků analýzy našich dat u pacientů s velmi nízkým, a naopak vysokým bazálním kortizolem pooperačně s vysokou pravděpodobností lze předpovědět funkci osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny. Naopak u pacientů

s hodnotami bazálního kortizolu pooperačně ve středním pásmu je provedení stimulačního testu s odstupem často nutné, i když riziko hypokortizolizmu je menší než pravděpodobnost dobré kortikotropní funkce. U pacientů s bazálním kortizolem >500 nmol/l je riziko hypokortizolizmu minimální a teoreticky je možné pooperační glukokortikoidní substituci vysadit.

2. Jaké je rozmezí hodnot bazálního kortizolu a tomu odpovídající riziko hypokortizolizmu?

U pacientů s bazálním kortizolem <100 nmol/l byla v naší skupině zachovaná kortikotropní funkce u 29 % pacientů, ve skupině s bazálním kortizolem 100-200 nmol/l 73 %, 200-370 nmol/l 88 % a ve skupině s bazálním kortizolem 370-500 nmol/l byla zachovaná kortikotropní funkce u 96 % pacientů. U všech pacientů s bazálním kortizolem nad 500 nmol/l byla dostatečná odpověď v stimulačních testech čili u žádného nebyl prokázán hypokortizolismus.

3. Lze na základě těchto výsledků zkrátit pooperační substituční léčbu glukokortikoidy u části pacientů?

Teoreticky lze u všech pacientů s bazálním kortizolem nad 500 nmol/l nepokračovat pooperační substituční terapii glukokortikoidy. Je však nutno zmínit, že v jiných studiích byla vzácně prokázána glukokortikoidní insuficience rozvinutá i s delším odstupem od operace.

11 Summary

According to the stated hypotheses we developed a novel GC-MS/MS method to quantify many steroids in human serum samples. Using this technique, we measured steroid metabolome in patients with adrenal incidentalomas causing subclinical hypercortisolism and in patients with various forms of Cushing's syndrome. Our results have confirmed results from other authors, but we also add new findings in the steroid metabolism. If confirmed by other works these results could, in future, simplify clinical approaches in adrenal disease.

In the second part of our work we compared the predictive value of basal cortisol levels with final stimulation testing of corticotroph function in patients after pituitary surgery. Our results confirm previous studies on this topic and show cut-off levels adjusted to our conditions. These outcomes bring additional value to our everyday clinical practice and improve treatment management.

12 Vlastní publikace autora

Publikace s IF, které jsou podkladem disertační práce

Václav Hána jr., Jana Ježková, Mikuláš Kosák, Michal Kršek, Václav Hána, Martin Hill. Novel GC-MS/MS technique reveals a complex steroid fingerprint of subclinical hypercortisolism in adrenal incidentalomas *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2019, Impact f. 5,789

Martin Hill, **Václav Hána jr.**, Marta Velíková, Antonín Pařízek, Lucie Kolátorová, Jana Vítků, Tereza Škodová, Markéta Šimková, Patrik Šimják, Radmila Kancheva, Michal Koucký, Zuzana Kokrdová, Karolína Adamcová, Andrej Černý, Zdeněk Hájek, Michaela Dušková, Josef Bulant, Luboslav Stárka. A method for determination of one hundred endogenous steroids in human serum by gas chromatography-tandem mass spectrometry *Physiol. Res.* 68: Issue 2, 2019, Impact f. 1,324.

Václav Hána jr., Jana Ježková, Mikuláš Kosák, Michal Kršek, Josef Marek, David Netuka, Martin Hill, Václav Hána. Prediction of adrenocortical insufficiency after pituitary adenoma surgery using postoperative basal cortisol levels. *Physiol. Res.* 64: Issue 3, 2015, Impact f. 1,487.

Václav Hána jr., Jana Ježková, Mikuláš Kosák, Michal Kršek, Václav Hána, Martin Hill. Serum steroid profiling in Cushing's syndrome patients. Článek v recenzním řízení.

Aktivní účast na odborných akcích – mezinárodní

13th ESE Postgraduate Course in Clinical Endocrinology 30.5. - 1.6.2013

MUSIC-Pit (Marseille University Specialized International Course on Pituitary disorders) Preceptorship 16.1. - 17.1.2014, kazuistika – ústní

ECE – 17th European congress of endocrinology, Dublin 16.-20.5.2015, poster

ECE – 18th European congress of endocrinology, Mnichov 28.-31.5.2016, poster

ECE – 19th European congress of endocrinology, Lisabon 20.-23.5.2017, poster

ECE – 20th European congress of endocrinology, Barcelona 19.-22.5.2018, poster, guided poster chair

Adrenal cortex conference, Munich, 25-27.6.2018, poster

Aktivní účast na odborných akcích – Česká republika

XXXVI. Endokrinologické dny Plzeň 10.10. - 12.10.2013, poster

6. hradecký postgraduální kurz v endokrinologii 15.-17.5.2014, ústní prezentace

XXXVIII. Endokrinologické dny, Špindlerův Mlýn 15.10. - 17.10.2015, poster

7. hradecký postgraduální kurz v endokrinologii 12.-14.5.2016, ústní prezentace

40. Endokrinologické dny s mezinárodní účastí, Praha 19.10. - 21.10.2017, ústní prezentace

13 Použitá literatura

Abdu T.A.M., Elhadd T.A., Neary R., Clayton R.N. Comparison of the Low Dose Short Synacthen Test (1 µg), the Conventional Dose Short Synacthen Test (250 µg), and the Insulin Tolerance Test for Assessment of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis in Patients with Pituitary Disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1999, 84: 838–843.

Agarwal A.K., Auchus R.J. Minireview: Cellular Redox State Regulates Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity and Intracellular Hormone Potency. *Endocrinology*, 2005, 146: 2531–2538.

Agha A., Tomlinson J.W., Clark P.M., Holder G., Stewart P.M. The Long-Term Predictive Accuracy of the Short Synacthen (Corticotropin) Stimulation Test for Assessment of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2006, 91: 43–47.

Agilent Technologies Mass Spectrometry Fundamentals - Theory. *Acad. institutional Res.*, 2016, 1–53.

Akaza I., Yoshimoto T., Iwashima F., Nakayama C., Doi M., Izumiyama H., Hirata Y. Clinical outcome of subclinical Cushing's syndrome after surgical and conservative treatment. *Hypertens. Res.*, 2011, 34: 1111–1115.

Androulakis I.I., Kaltsas G.A., Kollias G.E., Markou A.C., Gouli A.K., Thomas D.A., Alexandraki K.I., Papamichael C.M., Hadjidakis D.J., Piaditis G.P. Patients with apparently nonfunctioning adrenal incidentalomas may be at increased cardiovascular risk due to excessive cortisol secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2014, 99: 2754–2762.

Arlt W., Biehl M., Taylor A.E., Hahner S., Libé R., Hughes B.A., Schneider P., Smith D.J., Stiekema H., Krone N., Porfiri E., Opocher G., Bertherat J., Mantero F., Allolio B., Terzolo M., Nightingale P., Shackleton C.H.L., Bertagna X., Fassnacht M., Stewart P.M. Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting malignancy in adrenal tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2011, 96: 3775–84.

Arnaldi G., Angeli A., Atkinson A.B., Bertagna X., Cavagnini F., Chrousos G.P., Fava G.A., Findling J.W., Gaillard R.C., Grossman A.B., Kola B., Lacroix A., Mancini T., Mantero F., Newell-Price J., Nieman L.K., Sonino N., Vance M.L., Giustina A., Boscaro M. Diagnosis and Complications of Cushing's Syndrome: A Consensus Statement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2003, 88: 5593–5602.

Aron D.C., Raff H., Findling J.W. Effectiveness *Versus* Efficacy: The Limited Value in Clinical Practice of High Dose Dexamethasone Suppression Testing in the Differential Diagnosis of Adrenocorticotropin-Dependent Cushing's Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1997, 82: 1780–1785.

Auchus R.J. The backdoor pathway to dihydrotestosterone. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2004, 15: 432–8.

Babińska A., Siekierska-Hellmann M., Błaut K., Lewczuk A., Wiśniewski P., Gnacińska M., Obołończyk L., Świątkowska-Stodulska R., Sworczak K. Hormonal activity in clinically silent adrenal incidentalomas. *Arch. Med. Sci.*, 2012, 8: 97–103.

Baid S.K., Sinaii N., Wade M., Rubino D., Nieman L.K. Radioimmunoassay and Tandem Mass Spectrometry Measurement of Bedtime Salivary Cortisol Levels: A Comparison of Assays to Establish Hypercortisolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2007, 92: 3102–3107.

Baker B.Y., Epand R.F., Epand R.M., Miller W.L. Cholesterol Binding Does Not Predict Activity of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein, StAR. *J. Biol. Chem.*, 2007, 282: 10223–10232.

Barzon L., Fallo F., Sonino N., Boscaro M. Overnight dexamethasone suppression of cortisol is associated with radiocholesterol uptake patterns in adrenal incidentalomas. *Eur. J. Endocrinol.*, 2001, 145: 223–224.

Barzon L., Sonino N., Fallo F., Palu G., Boscaro M. Prevalence and natural history of adrenal incidentalomas. *Eur. J. Endocrinol.*, 2003, 149: 273–85.

Berg C., Meinel T., Lahner H., Yucec A., Mann K., Petersenn S. Diagnostic utility of the glucagon

stimulation test in comparison to the insulin tolerance test in patients following pituitary surgery. *Eur. J. Endocrinol.*, 2010, 162: 477–482.

Beuschlein F., Reincke M., Karl M., Travis W.D., Jaursch-Hancke C., Abdelhamid S., Chrousos G.P., Allolio B. Clonal composition of human adrenocortical neoplasms. *Cancer Res.*, 1994, 54: 4927–32.

Bloem L., Storbeck K.-H., Schloms L., Swart A. 11 β -Hydroxyandrostenedione Returns to the Steroid Arena: Biosynthesis, Metabolism and Function. *Molecules*, 2013, 18: 13228–13244.

Brossaud J., Ducint D., Corcuff J.-B. Urinary glucocorticoid metabolites: biomarkers to classify adrenal incidentalomas? *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 2016, 84: 236–243.

Caoili E.M., Korobkin M., Francis I.R., Cohan R.H., Platt J.F., Dunnick N.R., Raghupathi K.I. Adrenal masses: characterization with combined unenhanced and delayed enhanced CT. *Radiology*, 2002, 222: 629–33.

Van Cauter E., Refetoff S. Evidence for Two Subtypes of Cushing's Disease Based on the Analysis of Episodic Cortisol Secretion. *N. Engl. J. Med.*, 1985, 312: 1343–1349.

Chan K.C.A. Diminished Urinary Free Cortisol Excretion in Patients with Moderate and Severe Renal Impairment. *Clin. Chem.*, 2004, 50: 757–759.

Charmandari E., Merke D.P., Negro P.J., Keil M.F., Martinez P.E., Haim A., Gold P.W., Chrousos G.P. Endocrinologic and Psychologic Evaluation of 21-Hydroxylase Deficiency Carriers and Matched Normal Subjects: Evidence for Physical and/or Psychologic Vulnerability to Stress. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2004, 89: 2228–2236.

Chiodini I. Diagnosis and treatment of subclinical hypercortisolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2011, 96: 1223–1236.

Chiodini I., Mascia M.L., Muscarella S., Battista C., Minisola S., Arosio M., Santini S.A., Guglielmi G., Carnevale V., Scillitani A. Subclinical hypercortisolism among outpatients referred for osteoporosis. *Ann. Intern. Med.*, 2007, 147: 541–548.

Chiodini I., Morelli V., Salcuni A.S., Eller-Vainicher C., Torlontano M., Coletti F., Iorio L., Cuttitta A., Ambrosio A., Vicentini L., Pellegrini F., Copetti M., Beck-Peccoz P., Arosio M., Ambrosi B., Trischitta V., Scillitani A. Beneficial Metabolic Effects of Prompt Surgical Treatment in Patients with an Adrenal Incidentaloma Causing Biochemical Hypercortisolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2010, 95: 2736–2745.

Coulter C.L., Read L.C., Carr B.R., Tarantal A.F., Barry S., Styne D.M. A role for epidermal growth factor in the morphological and functional maturation of the adrenal gland in the fetal rhesus monkey in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1996, 81: 1254–60.

Courtney C.H., McAllister a S., McCance D.R., Bell P.M., Hadden D.R., Leslie H., Sheridan B., Atkinson a B. Comparison of one week 0900 h serum cortisol, low and standard dose synacthen tests with a 4 to 6 week insulin hypoglycaemia test after pituitary surgery in assessing HPA axis. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 2000, 53: 431–6.

Cushing H.W. *The Pituitary Body and its Disorders.* Philadelphia: J.B. Lippincott Co. J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1912.

Daidoh H., Morita H., Mune T., Murayama M., Hanafusa J., NI H., Shibata H., Yasuda K. Responses of plasma adrenocortical steroids to low dose ACTH in normal subjects. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 1995, 43: 311–315.

Dallman M.F., Akana S.F., Cascio C.S., Darlington D.N., Jacobson L., Levin N. Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. *Recent Prog. Horm. Res.*, 1987, 43: 113–73.

Di Dalmazi G., Berr C.M., Fassnacht M., Beuschlein F., Reincke M. Adrenal Function After Adrenalectomy for Subclinical Hypercortisolism and Cushing's Syndrome: A Systematic Review of the Literature. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2014a, 99: 2637–2645.

Di Dalmazi G., Fanelli F., Mezzullo M., Casadio E., Rinaldi E., Garelli S., Giampalma E., Mosconi C., Golfieri R., Vicennati V., Pagotto U., Pasquali R. Steroid Profiling by LC-MS/MS in Nonsecreting and Subclinical Cortisol-Secreting Adrenocortical Adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2015a, 100:

3529–3538.

Di Dalmazi G., Pasquali R., Beuschlein F., Reincke M. Subclinical hypercortisolism: a state, a syndrome, or a disease? *Eur. J. Endocrinol.*, 2015b, 173: M61-71.

Di Dalmazi G., Vicennati V., Garelli S., Casadio E., Rinaldi E., Giampalma E., Mosconi C., Golfieri R., Paccapelo A., Pagotto U., Pasquali R. Cardiovascular events and mortality in patients with adrenal incidentalomas that are either non-secreting or associated with intermediate phenotype or subclinical Cushing's syndrome: A 15-year retrospective study. *Lancet Diabetes Endocrinol.*, 2014b, 2: 396–405.

Di Dalmazi G., Vicennati V., Rinaldi E., Morselli-Labate A.M., Giampalma E., Mosconi C., Pagotto U., Pasquali R. Progressively increased patterns of subclinical cortisol hypersecretion in adrenal incidentalomas differently predict major metabolic and cardiovascular outcomes: a large cross-sectional study. *Eur. J. Endocrinol.*, 2012, 166: 669–77.

Debono M., Chadarevian R., Eastell R., Ross R.J., Newell-Price J. Mifepristone Reduces Insulin Resistance in Patient Volunteers with Adrenal Incidentalomas That Secrete Low Levels of Cortisol: A Pilot Study. *PLoS One*, 2013, 8: e60984.

Debono M., Newell-Price J. Subclinical hypercortisolism in adrenal incidentaloma. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.*, 2015, 22: 185–192.

DeCherney G.S., DeBold C.R., Jackson R. V., Sheldon W.R., Island D.P., Orth D.N. Diurnal variation in the response of plasma adrenocorticotropin and cortisol to intravenous ovine corticotropin-releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1985, 61: 273–9.

Dehennin L., Pérès G. Plasma and Urinary Markers of Oral Testosterone Misuse by Healthy Men in Presence of Masking Epitestosterone Administration. *Int. J. Sports Med.*, 1996, 17: 315–319.

Dennedy M.C., Annamalai A.K., Prankerd Smith O., Freeman N., Vengopal K., Graggaber J., Koulouri O., Powlson A.S., Shaw A., Halsall D.J., Gurnell M. Low DHEAS: A Sensitive and Specific Test for Detection of Subclinical Hypercortisolism in Adrenal Incidentalomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2016, 102: jc.2016-2718.

Dichek H.L., Nieman L.K., Oldfield E.H., Pass H.I., Malley J.D., Cutler G.B. A comparison of the standard high dose dexamethasone suppression test and the overnight 8-mg dexamethasone suppression test for the differential diagnosis of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1994, 78: 418–22.

Doerr H.G., Sippell W.G., Drop S.L., Bidlingmaier F., Knorr D. Evidence of 11 beta-hydroxylase deficiency in childhood adrenocortical tumors. The plasma corticosterone/11-deoxycorticosterone ratio as a possible marker for malignancy. *Cancer*, 1987, 60: 1625–9.

Duclos M., Corcuff J.-B., Etcheverry N., Rashedi M., Tabarin A., Roger P. Abdominal obesity increases overnight cortisol excretion. *J. Endocrinol. Invest.*, 1999, 22: 465–471.

Dušková M., Kolátorová L., Stárka L. Androgens in women - critical evaluation of the methods for their determination in diagnostics of endocrine disorders. *Physiol. Res.*, 2018, 67: S379–S390.

Eisenhofer G., Masjkur J., Peitzsch M., Di Dalmazi G., Bidlingmaier M., Grüber M., Fazel J., Osswald A., Beuschlein F., Reincke M. Plasma Steroid Metabolome Profiling for Diagnosis and Subtyping Patients with Cushing Syndrome. *Clin. Chem.*, 2018, 64: 586–596.

Eller-Vainicher C., Morelli V., Salcuni A.S., Battista C., Torlontano M., Coletti F., Iorio L., Cairoli E., Beck-Peccoz P., Arosio M., Ambrosi B., Scillitani A., Chiodini I. Accuracy of several parameters of hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity in predicting before surgery the metabolic effects of the removal of an adrenal incidentaloma. *Eur. J. Endocrinol.*, 2010, 163: 925–935.

Fassnacht M., Arlt W., Bancos I., Dralle H., Newell-Price J., Sahdev A., Tabarin A., Terzolo M., Tsagarakis S., Dekkers O.M. Management of adrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur. J. Endocrinol.*, 2016, 175: G1–G34.

Fujieda K., Tajima T., Nakae J., Sageshima S., Tachibana K., Suwa S., Sugawara T., Strauss J.F. Spontaneous puberty in 46,XX subjects with congenital lipid adrenal hyperplasia. *Ovarian*

steroidogenesis is spared to some extent despite inactivating mutations in the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *J. Clin. Invest.*, 1997, 99: 1265–71.

Fukushima D.K., Kemp A.D., Schneider R., Stokem M.B., Gallagher T.F. Studies in steroid metabolism. XXV. Isolation and characterization of new urinary steroids. *J. Biol. Chem.*, 1954, 210: 129–137.

Funder J.W., Carey R.M., Mantero F., Murad M.H., Reincke M., Shibata H., Stowasser M., Young W.F. The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2016, 101: 1889–916.

El Ghorayeb N., Bourdeau I., Lacroix A. Role of ACTH and Other Hormones in the Regulation of Aldosterone Production in Primary Aldosteronism. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2016, 7:.

Gleeson H.K., Walker B.R., Seckl J.R., Padfield P.L. Ten years on: Safety of short synacthen tests in assessing adrenocorticotropin deficiency in clinical practice. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2003, 88: 2106–11.

Gröndal S., Eriksson B., Hagenäs L., Werner S., Curstedt T. Steroid profile in urine: a useful tool in the diagnosis and follow up of adrenocortical carcinoma. *Acta Endocrinol. (Copenh)*, 1990, 122: 656–63.

Grumbach M.M., Biller B.M.K., Braunstein G.D., Campbell K.K., Carney J.A., Godley P.A., Harris E.L., Lee J.K.T., Oertel Y.C., Posner M.C., Schlechte J.A., Wieand H.S. Management of the clinically inapparent adrenal mass (“incidentaloma”). *Ann. Intern. Med.*, 2003, 138: 424–9.

Hamrahian A.H., Ioachimescu A.G., Remer E.M., Motta-Ramirez G., Bogabathina H., Levin H.S., Reddy S., Gill I.S., Siperstein A., Bravo E.L. Clinical utility of noncontrast computed tomography attenuation value (hounsfield units) to differentiate adrenal adenomas/hyperplasias from nonadenomas: Cleveland Clinic experience. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2005, 90: 871–7.

Hench P.S., Kendall E.C., Slocumb C.H., Polley H.F. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone: compound E) and of pituitary adrenocortical hormone in arthritis: preliminary report. *Ann. Rheum. Dis.*, 1949, 8: 97–104.

de Herder W.W. Heroes in endocrinology: Nobel Prizes. *Endocr. Connect.*, 2014, 3: R94–R104.

Hines J.M., Bancos I., Bancos C., Singh R.D., Avula A. V., Young W.F., Grebe S.K., Singh R.J. High-resolution, accurate-mass (HRAM) mass spectrometry urine steroid profiling in the diagnosis of adrenal disorders. *Clin. Chem.*, 2017, 63: 1824–1835.

Howlett T.A., Drury P.L., Perry L., Doniach I., Rees L.H., Besser G.M. Diagnosis and Management of ACTH Dependent Cushing’s Syndrome: Comparison of the Features in Ectopic and Pituitary ACTH Production. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 1986, 24: 699–713.

Hsiao H.P., Kirschner L.S., Bourdeau I., Keil M.F., Boikos S.A., Verma S., Robinson-White A.J., Nesterova M., Lacroix A., Stratakis C.A. Clinical and genetic heterogeneity, overlap with other tumor syndromes, and atypical glucocorticoid hormone secretion in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia compared with other adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2009, 94: 2930–2937.

Iacobone M., Citton M., Viel G., Boetto R., Bonadio I., Mondì I., Tropea S., Nitti D., Favia G. Adrenalectomy may improve cardiovascular and metabolic impairment and ameliorate quality of life in patients with adrenal incidentalomas and subclinical Cushing’s syndrome. *Surgery*, 2012, 152: 991–997.

Icard P., Goudet P., Charpenay C., Andreassian B., Carnaille B., Chapuis Y., Cougard P., Henry J.F., Proye C. Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. *World J. Surg.*, 2001, 25: 891–7.

Inder W.J. Towards a universally accepted definition of subclinical Cushing’s syndrome - subclinical autonomous hypercortisolism. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 2016, 7–9.

Inder W.J., Hunt P.J. Glucocorticoid replacement in pituitary surgery: guidelines for perioperative assessment and management. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002, 87: 2745–50.

Isidori A.M., Kaltsas G.A., Grossman A.B. Ectopic ACTH Syndrome. *Pituitary Today: Molecular,*

Physiological and Clinical Aspects. pp. 143–156. KARGER, Basel (2006).

Jaresch S., Kornely E., Kley H.K., Schlaghecke R. Adrenal incidentaloma and patients with homozygous or heterozygous congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1992, 74: 685–689.

Jayasena C.N., Gadhvi K. a, Gohel B., Martin N.M., Mendoza N., Meeran K., Dhillon W.S. Day 5 morning serum cortisol predicts hypothalamic-pituitary-adrenal function after transsphenoidal surgery for pituitary tumors. *Clin. Chem.*, 2009, 55: 972–7.

Kaltsas G., Chrisoulidou A., Piaditis G., Kassi E., Chrousos G. Current status and controversies in adrenal incidentalomas. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2012, 23: 602–9.

Kamenicky P., Houdoin L., Ferlicot S., Salenave S., Brailly S., Droupy S., Meduri G., Sasano H., Suzuki T., Young J., Chanson P. Benign cortisol-secreting adrenocortical adenomas produce small amounts of androgens. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 2007, 66: 778–788.

Karaca Z., Tanriverdi F., Atmaca H., Gokce C., Elbuken G., Selcuklu a, Unluhizarci K., Kelestimur F. Can basal cortisol measurement be an alternative to the insulin tolerance test in the assessment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis before and after pituitary surgery? *Eur. J. Endocrinol.*, 2010, 163: 377–82.

Kasperlik-Zeluska A.A., Rosłowska E., Słowinska-Szrednicka J., Migdalska B., Jeske W., Makowska A., Snochowska H. Incidentally discovered adrenal mass (incidentaloma): investigation and management of 208 patients. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 1997, 46: 29–37.

Kater C.E., Biglieri E.G. Disorders of steroid 17 alpha-hydroxylase deficiency. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 1994, 23: 341–57.

Keevil B.G. LC–MS/MS analysis of steroids in the clinical laboratory. *Clin. Biochem.*, 2016, 49: 989–997.

Khan M., Habra M., McCutcheon I., Noguera-González G., Devin J., Busaidy N., Levine N., Lindstrom W., Kagan D., Jimenez C., Waguespack S. Random Postoperative Day-3 Cortisol Concentration as a Predictor of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Integrity after Transsphenoidal Surgery. *Endocr. Pract.*, 2011, 17: 717–726.

Kidambi S., Raff H., Findling J.W. Limitations of nocturnal salivary cortisol and urine free cortisol in the diagnosis of mild Cushing's syndrome. *Eur. J. Endocrinol.*, 2007, 157: 725–731.

Kikuchi E., Yanaihara H., Nakashima J., Homma K., Ohigashi T., Asakura H., Tachibana M., Shibata H., Saruta T., Murai M. Urinary steroid profile in adrenocortical tumors. *Biomed. Pharmacother.*, 2000, 54: 194s–197s.

Kloos R.T., Gross M.D., Francis I.R., Korobkin M., Shapiro B. Incidentally discovered adrenal masses. *Endocr. Rev.*, 1995, 16: 460–84.

Klose M., Lange M., Kosteljanetz M., Poulsgaard L., Feldt-Rasmussen U. Adrenocortical insufficiency after pituitary surgery: an audit of the reliability of the conventional short synacthen test. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 2005, 63: 499–505.

Kolatorova Sosvorova L., Sarek J., Vitku J., Kvasnica M. Synthesis of 3 α -deuterated 7 α -hydroxy-DHEA and 7-oxo-DHEA and application in LC-MS/MS plasma analysis. *Steroids*, 2016, 112: 88–94.

Korbonits M., Chahal H.S., Kaltsas G., Jordan S., Urmanova Y., Khalimova Z., Harris P.E., Farrell W.E., Claret F.-X., Grossman A.B. Expression of Phosphorylated p27^{Kip1} Protein and Jun Activation Domain-Binding Protein 1 in Human Pituitary Tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002, 87: 2635–2643.

Kotłowska A., Sworzak K., Stepnowski P. Urine metabolomics analysis for adrenal incidentaloma activity detection and biomarker discovery. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2011, 879: 359–63.

Labrie F., Luu-The V., Lin S.X., Simard J., Labrie C., El-Alfy M., Pelletier G., Bélanger A. Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. *J. Mol. Endocrinol.*, 2000, 25: 1–16.

- Lachance Y., Luu-The V., Labrie C., Simard J., Dumont M., de Launoit Y., Guérin S., Leblanc G., Labrie F.** Characterization of human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase gene and its expression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 1990, 265: 20469–75.
- Lacroix A., Felders R. a, Stratakis C. a, Nieman L.K.** Cushing's syndrome. *Lancet (London, England)*, 2015, 386: 913–27.
- Lee S.H., Song K.-H., Kim J., Park S., Ahn S.H., Kim H., Cho Y.Y., Suh S., Kim B.-J., Kim J.H., Koh J.-M.** New diagnostic criteria for subclinical hypercortisolism using postsurgical hypocortisolism: the Co-work of Adrenal Research study. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 2017, 86: 10–18.
- Lenders J.W.M., Pacak K., Walther M.M., Linehan W.M., Mannelli M., Friberg P., Keiser H.R., Goldstein D.S., Eisenhofer G.** Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which test is best? *JAMA*, 2002, 287: 1427–34.
- De Leo M., Cozzolino A., Colao A., Pivonello R.** Subclinical Cushing's syndrome. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2012, 26: 497–505.
- Libé R., Coste J., Guignat L., Tissier F., Lefebvre H., Barrande G., Ajzenberg C., Tauveron I., Clauser E., Dousset B., Bertagna X., Bertherat J., Groussin L.** Aberrant cortisol regulations in bilateral macronodular adrenal hyperplasia: A frequent finding in a prospective study of 32 patients with overt or subclinical Cushing's syndrome. *Eur. J. Endocrinol.*, 2010, 163: 129–138.
- Libè R., Fratticci A., Bertherat J.** Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. *Endocr. Relat. Cancer*, 2007, 14: 13–28.
- Liddle G.W.** Tests of pituitary-adrenal suppressibility in the diagnosis of Cushing's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1960, 20: 1539–60.
- Lin C.-L., Wu T.-J., Machacek D.A., Jiang N.-S., Kao P.C.** Urinary Free Cortisol and Cortisone Determined by High Performance Liquid Chromatography in the Diagnosis of Cushing's Syndrome ¹. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1997, 82: 151–155.
- Lin D., Sugawara T., Strauss J.F., Clark B.J., Stocco D.M., Saenger P., Rogol A., Miller W.L.** Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science*, 1995, 267: 1828–31.
- Mah P.M., Jenkins R.C., Rostami-Hodjegan A., Newell-Price J., Doane A., Ibbotson V., Tucker G.T., Ross R.J.** Weight-related dosing, timing and monitoring hydrocortisone replacement therapy in patients with adrenal insufficiency. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 2004, 61: 367–375.
- Małunowicz E.M., Ginalska-Malinowska M., Romer T.E., Ruszczynska-Wolska A., Dura M.** Heterogeneity of urinary steroid profiles in children with adrenocortical tumors. *Horm. Res.*, 1995, 44: 182–8.
- Mansmann G., Lau J., Balk E., Rothberg M., Miyachi Y., Bornstein S.R.** The Clinically Inapparent Adrenal Mass: Update in Diagnosis and Management. *Endocr. Rev.*, 2004, 25: 309–340.
- Marek J., Hána V.** *Endokrinologie. Galén*, 2017.
- Masuda M.** Urinary ketosteroid excretion patterns in congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1957, 17: 1181–1190.
- Meikle A.W.** Dexamethasone suppression tests: usefulness of simultaneous measurement of plasma cortisol and dexamethasone. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 1982, 16: 401–8.
- Melmed S.** *The Pituitary. Elsevier*, 2011.
- 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, 70: 545–8.
- Mericq M. V, Cutler G.B.** High fluid intake increases urine free cortisol excretion in normal subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1998, 83: 682–4.
- Mesiano S., Mellon S.H., Gospodarowicz D., Di Blasio A.M., Jaffe R.B.** Basic fibroblast growth factor expression is regulated by corticotropin in the human fetal adrenal: a model for adrenal growth regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1991, 88: 5428–32.

- Midorikawa S., Sanada H., Hashimoto S., Suzuki T., Watanabe T.** The improvement of insulin resistance in patients with adrenal incidentaloma by surgical resection. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 2001, 54: 797–804.
- Miller W.L.** Minireview: Regulation of Steroidogenesis by Electron Transfer. *Endocrinology*, 2005, 146: 2544–2550.
- Moayyeri A., Cheung C.-L., Tan K.C., Morris J.A., Cerani A., Mohny R.P., Richards J.B., Hammond C., Spector T.D., Menni C.** Metabolomic Pathways to Osteoporosis in Middle-Aged Women: A Genome-Metabolome-Wide Mendelian Randomization Study. *J. Bone Miner. Res.*, 2018, 33: 643–650.
- Moreira A.C., Leal A.M., Castro M.** Characterization of adrenocorticotropin secretion in a patient with 17 alpha-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1990, 71: 86–91.
- Morelli V., Donadio F., Eller-Vainicher C., Cirello V., Olgiati L., Savoca C., Cairoli E., Salcuni A.S., Beck-Peccoz P., Chiodini I.** Role of glucocorticoid receptor polymorphism in adrenal incidentalomas. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2010, 40: 803–811.
- Morelli V., Eller-Vainicher C., Salcuni A.S., Coletti F., Iorio L., Muscogiuri G., Della Casa S., Arosio M., Ambrosi B., Beck-Peccoz P., Chiodini I.** Risk of new vertebral fractures in patients with adrenal incidentaloma with and without subclinical hypercortisolism: A multicenter longitudinal study. *J. Bone Miner. Res.*, 2011, 26: 1816–1821.
- Morio H., Terano T., Yamamoto K., Tomizuka T., Oeda T., Saito Y., Tamura Y., Sasano H.** Serum Levels of Dehydroepiandrosterone Sulfate in Patients with Asymptomatic Cortisol Producing Adrenal Adenoma: Comparison with Adrenal Cushing's Syndrome and Non-Functional Adrenal Tumor. *Endocr. J.*, 1996, 43: 387–396.
- Mulatero P., Curnow K.M., Aupetit-Faisant B., Foekling M., Gomez-Sanchez C., Veglio F., Jeunemaitre X., Corvol P., Pascoe L.** Recombinant CYP11B genes encode enzymes that can catalyze conversion of 11-deoxycortisol to cortisol, 18-hydroxycortisol, and 18-oxocortisol. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1998, 83: 3996–4001.
- Muller C., Pompon D., Urban P., Morfin R.** Inter-conversion of 7alpha- and 7beta-hydroxy-dehydroepiandrosterone by the human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2006, 99: 215–222.
- Nawata H., Higuchi K., Yanase T., Takayanagi R., Ka K., Ibayashi H.** Mechanism of dissociation of cortisol and adrenal androgen secretion after removal of adrenocortical adenoma in patients with Cushing's syndrome. *Endocrinol. Jpn.*, 1985, 32: 691–700.
- Newell-Price J., Morris D.G., Drake W.M., Korbonits M., Monson J.P., Besser G.M., Grossman A.B.** Optimal response criteria for the human CRH test in the differential diagnosis of ACTH-dependent Cushing's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002, 87: 1640–5.
- Newell-Price J., Trainer P., Besser M., Grossman A.** The Diagnosis and Differential Diagnosis of Cushing's Syndrome and Pseudo-Cushing's States. *Endocr. Rev.*, 1998, 19: 647–672.
- Nickelsen T., Lissner W., Schöffling K.** The Dexamethasone Suppression Test and Long-Term Contraceptive Treatment: Measurement of ACTH or Salivary Cortisol Does Not Improve the Reliability of the Test. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 2009, 94: 275–280.
- Nieman L.K.** Cushing's syndrome: update on signs, symptoms and biochemical screening. *Eur. J. Endocrinol.*, 2015, 173: M33-8.
- Nieman L.K., Biller B.M.K., Findling J.W., Newell-Price J., Savage M.O., Stewart P.M., Montori V.M.** The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2008, 93: 1526–40.
- Nunes M.L., Rault A., Teynie J., Valli N., Guyot M., Gaye D., Belleannee G., Tabarin A.** 18F-FDG PET for the identification of adrenocortical carcinomas among indeterminate adrenal tumors at computed tomography scanning. *World J. Surg.*, 2010, 34: 1506–10.
- Okubo S., Niimura F., Nishimura H., Takemoto F., Fogo A., Matsusaka T., Ichikawa I.** Angiotensin-independent mechanism for aldosterone synthesis during chronic extracellular fluid

volume depletion. *J. Clin. Invest.*, 1997, 99: 855–60.

Oliver R.L., Davis J.R.E., White A. Characterisation of ACTH related peptides in ectopic Cushing's syndrome. *Pituitary*, 2003, 6: 119–26.

Ozgen A.G., Bayraktar F., Yilmaz C. Low basal androstenedione levels plus augmented 17 α -hydroxyprogesterone and low dehydroepiandrosterone sulfate responses to adrenocorticotrophic hormone stimulation in patients with adrenal incidentaloma. *Endocr.Pract.*, 2001, 7: 448–453.

Papanicolaou D.A., Yanovski J.A., Cutler G.B., Chrousos G.P., Nieman L.K. Distinguishes Cushing's Syndrome from Pseudo-Cushing. *Endocrinol. Metab.*, 2009, 83: 1163–1167.

Parker K., Schimmer B. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr. Rev.*, 1997, 18: 361–377.

Rege J., Nakamura Y., Satoh F., Morimoto R., Kennedy M.R., Layman L.C., Honma S., Sasano H., Rainey W.E. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of human adrenal vein 19-carbon steroids before and after ACTH stimulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2013, 98: 1182–8.

Reimondo G., Allasino B., Bovio S., Saba L., Ardito A., Angeli A., Terzolo M. Pros and cons of dexamethasone suppression test for screening of subclinical Cushing's syndrome in patients with adrenal incidentalomas. *J. Endocrinol. Invest.*, 2011, 34: e1–e5.

Reincke M., Peter M., Sippell W.G., Allolio B. Impairment of 11 beta-hydroxylase but not 21-hydroxylase in adrenal "incidentalomas". *Eur. J. Endocrinol.*, 1997, 136: 196–200.

Reppert S.M., Weaver D.R. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 2002, 418: 935–941.

Reznik Y., Lefebvre H., Rohmer V., Charbonnel B., Tabarin A., Rodien P., Lecomte P., Bardet S., Coffin C., Mahoudeau J., REHOS study group Aberrant adrenal sensitivity to multiple ligands in unilateral incidentaloma with subclinical autonomous cortisol hypersecretion: a prospective clinical study. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 2004, 61: 311–9.

Ritzel K., Beuschlein F., Berr C., Osswald A., Reisch N., Bidlingmaier M., Schneider H., Honegger J., Geyer L.L., Schopohl J., Reincke M. ACTH after 15 min distinguishes between Cushing's disease and ectopic Cushing's syndrome: a proposal for a short and simple CRH test. *Eur. J. Endocrinol.*, 2015, 173: 197–204.

Ross E.J., Linch D.C. Cushing's syndrome—killing disease: discriminatory value of signs and symptoms aiding early diagnosis. *Lancet (London, England)*, 1982, 2: 646–9.

Sakai Y., Yanase T., Hara T., Takayanagi R., Haji M., Nawata H. Mechanism of abnormal production of adrenal androgens in patients with adrenocortical adenomas and carcinomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1994, 78: 36–40.

Sayed Kassem L., El Sibai K., Chaiban J., Abdelmannan D., Arafah B.M. Measurements of serum DHEA and DHEA sulphate levels improve the accuracy of the low-dose cosyntropin test in the diagnosis of central adrenal insufficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2012, 97: 3655–62.

Schöneshöfer M., Weber B., Oelkers W., Nahoul K., Mantero F. Urinary excretion rates of 15 free steroids: Potential utility in differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Clin. Chem.*, 1986, 32: 93–96.

Seppel T., Schlaghecke R. Augmented 17 α -hydroxyprogesterone response to ACTH stimulation as evidence of decreased 21-hydroxylase activity in patients with incidentally discovered adrenal tumours ('incidentalomas'). *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 1994, 41: 445–451.

Sidhu S., Gicquel C., Bambach C.P., Campbell P., Magarey C., Robinson B.G., Delbridge L.W. Clinical and molecular aspects of adrenocortical tumourigenesis. *ANZ J. Surg.*, 2003, 73: 727–38.

Simard J., Rheume E., Mebarki F., Sanchez R., New M.I., Morel Y., Labrie F. Molecular basis of human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1995, 53: 127–38.

Stewart P.M., Corrie J., Seckl J.R., Edwards C.R., Padfield P.L. A rational approach for assessing the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Lancet*, 1988, 1: 1208–1210.

Stewart P.M., Gibson S., Crosby S.R., Penn R., Holder R., Ferry D., Thatcher N., Phillips P.,

- London D.R., White A.** ACTH precursors characterize the ectopic ACTH syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 1994, 40: 199–204.
- Stocco D.M., Clark B.J.** Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr. Rev.*, 1996, 17: 221–44.
- Stratakis C.A., Boikos S.A.** Genetics of adrenal tumors associated with Cushing's syndrome: A new classification for bilateral adrenocortical hyperplasias. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.*, 2007, 3: 748–757.
- Suzuki T., Sasano H., Takeyama J., Kaneko C., Freije W.A., Carr B.R., Rainey W.E.** Developmental changes in steroidogenic enzymes in human postnatal adrenal cortex: immunohistochemical studies. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 2000, 53: 739–747.
- Tauchmanová L., Rossi R., Biondi B., Pulcrano M., Nuzzo V., Palmieri E.-A., Fazio S., Lombardi G.** Patients with Subclinical Cushing's Syndrome due to Adrenal Adenoma Have Increased Cardiovascular Risk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002, 87: 4872–4878.
- Tenenbaum F., Groussin L., Foehrenbach H., Tissier F., Gouya H., Bertherat J., Dousset B., Legmann P., Richard B., Bertagna X.** 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography as a diagnostic tool for malignancy of adrenocortical tumours? Preliminary results in 13 consecutive patients. *Eur. J. Endocrinol.*, 2004, 150: 789–92.
- Terzolo M., Bovio S., Pia A., Conton P.A., Reimondo G., Dall'Asta C., Bemporad D., Angeli A., Opocher G., Mannelli M., Ambrosi B., Mantero F.** Midnight serum cortisol as a marker of increased cardiovascular risk in patients with a clinically inapparent adrenal adenoma. *Eur. J. Endocrinol.*, 2005, 153: 307–315.
- Terzolo M., Stigliano A., Chiodini I., Loli P., Furlani L., Arnaldi G., Reimondo G., Pia A., Toscano V., Zini M., Borretta G., Papini E., Garofalo P., Allolio B., Dupas B., Mantero F., Tabarin A.** AME position statement on adrenal incidentaloma. *Eur. J. Endocrinol.*, 2011, 164: 851–70.
- Tetsi Nomigni M., Ouzounian S., Benoit A., Vadrot J., Tissier F., Renouf S., Lefebvre H., Christin-Maitre S., Louiset E., Ne M., Nomigni T., Ouzounian S., Benoit A., Vadrot J., Dé F., Tissier R., Renouf S., Lefebvre H., Christin-Maitre S., Louiset E.** Steroidogenic enzyme profile in an androgen-secreting adrenocortical oncocytoma associated with hirsutism. *Endocr. Connect.*, 2015, 4: 1–26.
- Toniato A., Merante-Boschin I., Opocher G., Pelizzo M.R., Schiavi F., Ballotta E.** Surgical Versus Conservative Management for Subclinical Cushing Syndrome in Adrenal Incidentalomas: A Prospective Randomized Study. *Ann. Surg.*, 2009, 249: 388–391.
- Tordjman K., Jaffe A., Trostanetsky Y., Greenman Y., Limor R., Stern N.** Low-dose (1 microgram) adrenocorticotrophin (ACTH) stimulation as a screening test for impaired hypothalamo-pituitary-adrenal axis function: sensitivity, specificity and accuracy in comparison with the high-dose (250 microgram) test. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 2000, 52: 633–640.
- Trautmann K., Thakker R. V, Ellison D.W., Ibrahim A., Lees P.D., Harding B., Fischer C., Popp S., Bartram C.R., Jauch A.** Chromosomal aberrations in sporadic pituitary tumors. *Int. J. cancer*, 2001, 91: 809–14.
- Tsagarakis S., Vassiliadi D., Thalassinos N.** Endogenous subclinical hypercortisolism: Diagnostic uncertainties and clinical implications. *J. Endocrinol. Invest.*, 2006, 29: 471–482.
- Van L.T.** Assessment of steroidogenesis and steroidogenic enzyme functions. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2013, 137: 176–182.
- Vassiliadi D. a, Tsagarakis S.** Endocrine incidentalomas--challenges imposed by incidentally discovered lesions. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 2011, 7: 668–80.
- Vassiliadi D.A., Ntali G., Vicha E., Tsagarakis S.** High prevalence of subclinical hypercortisolism in patients with bilateral adrenal incidentalomas: A challenge to management. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 2011, 74: 438–444.
- Vinson G.P., Whitehouse B.J., Goddard C., Sibley C.P.** Comparative and evolutionary aspects of aldosterone secretion and zona glomerulosa function. *J. Endocrinol.*, 1979, 81: 5P–24P.

Voutilainen R., Miller W.L. Coordinate tropic hormone regulation of mRNAs for insulin-like growth factor II and the cholesterol side-chain-cleavage enzyme, P450scc [corrected], in human steroidogenic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1987, 84: 1590–4.

Wajchenberg B.L., Mendonca B.B., Liberman B., Pereira M.A., Carneiro P.C., Wakamatsu A., Kirschner M.A. Ectopic adrenocorticotrophic hormone syndrome. *Endocr. Rev.*, 1994, 15: 752–87.

Watts N.B., Tindall G.T. Rapid assessment of corticotropin reserve after pituitary surgery. *JAMA*, 1988, 259: 708–711.

Weir M.R., Dzau V.J. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am. J. Hypertens.*, 1999, 12: 205S–213S.

Yamaji T., Ibayashi H. Plasma Dehydroepiandrosterone Sulfate in Normal and Pathological Conditions. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1969, 29: 273–278.

Young Jr W. jr The incidentally discovered adrenal mass. *N. Engl. J. Med.*, 2007, 601–610.

Zachmann M., Tassinari D., Prader A. Clinical and biochemical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11 beta-hydroxylase deficiency. A study of 25 patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1983, 56: 222–9.

Zada G., Tirosh A., Huang A.P., Laws E.R., Woodmansee W.W. The postoperative cortisol stress response following transsphenoidal pituitary surgery: a potential screening method for assessing preserved pituitary function, 2012.

Zeiger M. a, Siegelman S.S., Hamrahian A.H. Medical and surgical evaluation and treatment of adrenal incidentalomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2011, 96: 2004–15.

Zeiger M., Thompson G., Duh Q.-Y., Hamrahian A., Angelos P., Elaraj D., Fishman E., Kharlip J., American Association of Clinical Endocrinologists, American Association of Endocrine Surgeons American Association of Clinical Endocrinologists and American Association of Endocrine Surgeons Medical Guidelines for the Management of Adrenal Incidentalomas: Executive Summary of Recommendations. *Endocr. Pract.*, 2009, 15: 450–453.

14 Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 30.3.2019

MUDr. Václav Hána

Podpis

15 Identifikační záznam

HÁNA, Václav. *Steroidní metabolom ve fyziologii a patofyziologii člověka* [*Steroid metabolome in the human physiology and pathophysiology*]. Praha, 2019. 165 s. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, III. Interní klinika. Školitel Hill, Martin.

**Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta
Kateřinská 32, Praha 2**

**Prohlášení zájemce o nahlédnutí
do závěrečné práce absolventa studijního programu
uskutečňovaného na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze**

Jsem si vědom/a, že závěrečná práce je autorským dílem a že informace získané nahlédnutím do zpřístupněné závěrečné práce nemohou být použity k výtěžným účelům, ani nemohou být vydávány za studijní, vědeckou nebo jinou tvůrčí činnost jiné osoby než autora.

Byl/a jsem seznámen/a se skutečností, že si mohu požít výpisy, opisy nebo kopie závěrečné práce, jsem však povinen/a s nimi nakládat jako s autorským dílem a zachovávat pravidla uvedená v předchozím odstavci.

Příjmení, jméno (hůlkovým písmem)	Číslo dokladu totožnosti vypůjčitele (např. OP, cestovní pas)	Signatura závěrečné práce	Datum	Podpis

16 Příloha I

Martin Hill, **Václav Hána jr.**, Marta Velíková, Antonín Pařízek, Lucie Kolátorová, Jana Vítků, Tereza Škodová, Markéta Šimková, Patrik Šimják, Radmila Kancheva, Michal Koucký, Zuzana Kokrdová, Karolína Adamcová, Andrej Černý, Zdeněk Hájek, Michaela Dušková, Josef Bulant, Luboslav Stárka. A method for determination of one hundred endogenous steroids in human serum by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Physiol. Res.* 68: Issue 2, 2019.

17 Příloha II

Václav Hána jr., Jana Ježková, Mikuláš Kosák, Michal Kršek, Václav Hána, Martin Hill. Novel GC-MS/MS technique reveals a complex steroid fingerprint of subclinical hypercortisolism in adrenal incidentalomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2019.

18 Příloha III

Václav Hána jr., Jana Ježková, Mikuláš Kosák, Michal Kršek, Josef Marek, David Netuka, Martin Hill, Václav Hána. Prediction of adrenocortical insufficiency after pituitary adenoma surgery using postoperative basal cortisol levels. *Physiol. Res.* 64: Issue 3, 2015.