

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Steroidní metabolom ve fyziologii a patofyziologii
člověka

MUDr. Václav Hána

2019

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jaroslav Pokorný,
DrSc.

Školící pracoviště: Endokrinologický ústav a III.interní
klinika 1.LF UK a VFN

Školitel: Ing. Martin Hill, DrSc.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract.....	5
1. Úvod	6
2. Hypotézy a cíle práce.....	8
3. Materiál a metodika.....	9
4. Výsledky.....	11
5. Diskuse.....	16
6. Závěry.....	19
7. Použitá literatura	23

Poděkování:

Tato práce vznikla na 3. interní klinice 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 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, PhD., MUDr. Mikuláši Kosákovi, PhD. 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.

Abstrakt

Úvod: U pacientů s incidentalomy nadledvin se subklinickým hyperkortizolismem a různými formami Cushingova syndromu (CS) byly v literatuře popsány kromě změn kortizolu i změny ostatních steroidů. Komplexní stanovení steroidního metabolomu dosud provedeno nebylo.

Pooperační hypokortizolismus je jedním z rizik u pacientů po operacích hypofýzy. Jeho posouzení je zásadní v péči o tyto pacienty.

Cíle: V první části práce bylo cílem komplexně posoudit spektrum steroidů u zdravých jedinců a změny u pacientů s incidentalomy nadledvin a různými typy CS za pomoci nově vyvinuté metody plynové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (GC-MS/MS). V druhé části bylo cílem zhodnocení prediktivní hodnoty časného pooperačního bazálního kortizolu u pacientů po operacích hypofýzy ve vztahu k pooperační funkci kortikotropní osy.

Metodika a výsledky: Vyvinuli jsme novou metodu GC-MS/MS, která nám umožnila stanovení až sta steroidů z jednoho vzorku séra.

Ve skupině 52 pacientů s incidentalomy nadledvin a 26 kontrol jsme prokázali signifikantní pokles deseti různých steroidů. Jednalo se zejména o androgeny a jejich metabolity.

Za použití stejné nově vyvinuté metody GC-MS/MS jsme u 80 pacientů s CS a 23 kontrol prokázali změny steroidního metabolomu: u ACTH independentního CS snížení androgenů a jejich metabolitů, u ACTH dependentního CS naopak jejich zvýšení, u ektopické formy CS zvýšení mineralokortikoidních prekurzorů. Při snaze o rozlišení ACTH dependentních forem CS nejlépe oddělil Cushingovu chorobu od ektopické formy CS 11β -hydroxyepiandrosteron sulfát se senzitivitou 100% a specificitou 93,6%.

V druhé části práce jsme hodnotili prediktivní potenciál časného pooperačního kortizolu u 94 pacientů po operacích hypofýzy k predikci trvalého pooperačního hypokortizolismu. Potvrdili jsme význam bazálního kortizolu zejména u skupin pacientů s velmi nízkým anebo naopak vysokým bazálním kortizolem pooperačně. U pacientů s hladinami kortizolu mezi 100 a 500 nmol/l je pooperační substituce nutná až do definitivního posouzení v stimulačním testu s odstupem od operace.

Závěry: Naše práce s pomocí nové metodiky GC-MS/MS potvrdila výsledky jiných autorů a zároveň je významně rozšiřuje o další dosud nepopsané změny steroidního metabolomu. U částí pacientů po operaci hypofýzy můžeme na základě hodnot bazálního kortizolu s vysokou pravděpodobností předpovědět rozvoj trvalého hypokortizolismu.

Abstract

Introduction: Many studies have shown steroid hormone changes in adrenal incidentalomas with subclinical hypercortisolism and various forms of Cushing's syndrome.

Postoperative hypocortisolism is a serious complication if untreated. Save withdrawal of substitution therapy depends on stimulation testing usually few months after the operation.

Objective: The aim of our work was to measure, using novel steroid GC-MS/MS measurement procedure, complex picture of many steroids in patients with adrenal incidentalomas with subclinical hypercortisolism and in patients with Cushing's syndrome.

Methods and results: In the study on patients with adrenal incidentalomas we described complex steroid changes in patients with subclinical hypercortisolism. Our data confirm earlier findings, but also widen the number of steroids involved.

We also 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 describe 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 this work evaluates the utility of early postoperative basal cortisol levels in patients undergoing pituitary surgery for the prediction of central hypocortisolism. We confirm the usefulness of morning basal cortisol levels postoperatively especially in patients with either sufficiently high cortisol levels or very low cortisol levels. In patients with cortisol levels 100 – 500 nmol/l postoperative glucocorticoid replacement is necessary until the final stimulation tests.

Conclusions: Novel GC-MS/MS methodology enabled us to confirm previous findings of steroid changes in patients with adrenal incidentalomas and Cushing's syndrome. Furthermore, our data uncover so far unknown changes of steroid metabolism.

In patients after pituitary surgery permanent hypercortisolism can be well predicted measuring morning basal cortisol in certain subgroups of patients

1. Úvod

Steroidní metabolom je soubor jednotlivých steroidů v lidském organismu. Jeho složení, podíl jednotlivých steroidů, závisí na řadě fyziologických a patofyziologických procesů. Základními endokrinními orgány produkujícími steroidní hormony jsou kůra nadledvin a pohlavní žlázy. Dále však byla prokázána mírnější steroidní sekrece i v jiných orgánech a tkáních jako např. nervová tkáň – mozek, kůže, prostata, játra a další. Základem naší práce bylo zkoumání steroidního spektra u zdravých jedinců a změn spojených se subklinickým a plně vyjádřeným hyperkortizolismem - Cushingovým syndromem (CS) metodou GC-MS/MS.

S rozvojem zobrazovacích metod – počítačové tomografie (CT) a magnetické rezonance (MR) 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 určité hormonální změny spojené s mírným zvýšením sekrece kortizolu a dalších steroidů, které i bez přímých klinických projevů pravděpodobně vedou ke komplikacím (Debono M., Newell-Price J., 2015). Ty následně způsobují zhoršení kvality a délky života pacientů (Di Dalmazi G. et al., 2014). Diagnostika těchto mírných hormonálních změn není jednoduchá a k přesnému zhodnocení je často třeba provedení více vyšetření, odběrů krve, moči a provedení dynamických testů (Arlt W. et al., 2011; Brossaud J. et al., 2016). V souvislosti s mírně zvýšenou sekrecí kortizolu byly popsány změny některých dalších steroidů jako např. dehydroepiandrosteronu (DHEA), DHEA sulfátu

(DHEAS), které mohou pomoci v diagnostickém rozhodování (Vassiliadi D. a, Tsagarakis S., 2011). Komplexní posouzení změn ve steroidním spektru v séru pomocí GC-MSMS u těchto stavů provedeno nebylo. Je to dáno i tím, že tato metoda je časově i finančně náročná a zatím není její užití v rutinní praxi běžně dostupné.

Kromě pacientů bez klinických symptomů hyperkortizolismu 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 významně užší. V literatuře zatím nebylo provedeno stanovení steroidního spektra u bilaterálních adrenálních expanzí způsobujících CS. Většina prací vychází ze stanovení steroidů ze sbírané moči a nikoliv ze séra, které je pro klinickou diagnostiku jednodušší (Di Dalmazi G. et al., 2015; Hines J. M. et al., 2017). Abychom mohli steroidní metabolom a jeho změny správně zhodnotit, vyšetřili jsme též kontrolní skupinu.

V druhé části práce jsme se zabývali prediktivní hodnotou ranního kortizolu u pacientů časně po operaci hypofýzy ve vztahu k následné dlouhodobé funkci kortikotropní osy. U všech pacientů během operace a pooperačně substituujeme glukokortikoidy, protože nevíme, u kterých pacientů dojde během operace k poškození funkce kortikotropní osy. Starší práce i klinická praxe ukazují, že je možné odhadnout rozvoj trvalého hypokortizolismu u části pacientů na základě

hodnot bazálního kortizolu časně po operaci (Klose M. et al., 2005; Watts N. B., Tindall G. T., 1988). U zbývající skupiny pacientů je nutná pooperační substituce glukokortikoidy až do definitivního provedení stimulačních testů sekrece kortizolu. V našich podmínkách dosud obdobná práce provedena nebyla.

2. Hypotézy a cíle práce

Cíle jsme rozdělili do dvou částí.

V první části se zabýváme změnami steroidního metabolomu (spektra steroidů) v séru pacientů s incidentalomy nadledvin (náhodně zjištěným zvětšením nadledviny) a u pacientů s CS v porovnání se skupinou zdravých jedinců. Popis steroidního metabolomu v tomto rozsahu steroidů u pacientů s těmito chorobami dosud nebyl publikován.

V první fázi výzkumu bylo cílem:

- vyvinout novou metodu stanovení steroidního metabolomu pomocí GC-MS/MS stanovující několik desítek steroidů v séru
- komplexně klasifikovat pacienty s incidentalomy nadledvin se subklinickým hyperkortizolismem v naší kohortě z hlediska věku, pohlaví, hormonálního profilu, komorbidit a dalších ukazatelů a posoudit, zda zhodnocení steroidního metabolomu (spektra 83 steroidů) u této skupiny pacientů může zpřesnit diagnostiku subklinického hyperkortizolismu

- popsat steroidní metabolom u pacientů s různými typy hyperkortizolismu a dle možností se pokusit objasnit etiopatogenezu změn
- zhodnotit, zda může stanovení steroidního metabolomu u pacientů pomoci v diferenciální diagnostice CS

Druhou částí práce bylo posouzení prediktivní hodnoty ranního kortizolu u pacientů časně po operaci hypofýzy ve vztahu k následnému hypokortizolismu.

Cíli práce bylo:

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

3. Materiál a metodika

1.část práce - soubor pacientů a metodika:

52 pacientů s incidentalomou nadledvin (unilaterální n=29 a bilaterální n=23) a 26 kontrol bylo vyšetřeno za účelem stanovení sekrece kortizolu, ACTH, aldosteronu a plazmatických metanefrinů.

U všech pacientů i kontrol byly provedeny odběry na stanovení steroidního metabolomu bazálně v 7 hodin ráno, poté v 23 h byl podán 1 mg dexametazonu a následující den v 8 h ráno byl proveden druhý odběr.

U pacientů s incidentalomou byl vyloučen primární hyperaldosteronismus stanovením aldosteronu, reninu, poměru aldosteron /renin (nabíráno ve vzpřímené poloze), feochromocytom stanovením plazmatických metanefrinů. 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 volný močový kortizol (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.

U 80 pacientů s CS (51 Cushingova choroba, 6 ektopická sekrece ACTH, 16 adenom kůry nadledviny, 7 bilaterální makronodulární hyperplazie (BMAH)) a 23 kontrol jsme odebrali vzorky séra v 7 h ráno. 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 koncentrací 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, či katetrizace adrenálních žil.

2.část práce - soubor pacientů a metodika

U 94 pacientů operovaných pro tumory hypofýzy jsme retrospektivně analyzovali data. Z nich bylo 61 pacientů s hormonálně afunkčními adenomy, 29 produkujících GH, 4 prolaktinomy (Tabulka 1). Porovnávali jsme hodnoty časného bazálního pooperačního kortizolu s výsledky stimulačních testů – synacthenového testu a inzulínového tolerančního testu (ITT) s odstupem.

Tabulka 1. 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
Poop.adrenální insuficience	13	12	0	1

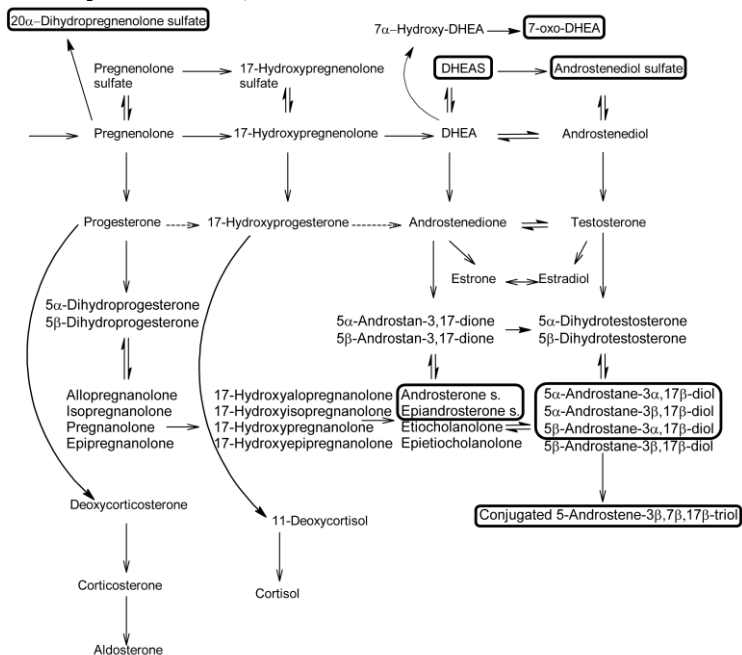
NF- horm. afunkční adenom, GH -růstový hormon produkující adenom, PRL – prolaktinom; věk vyjádřen jako průměr±2SD

4. Výsledky

1.část práce

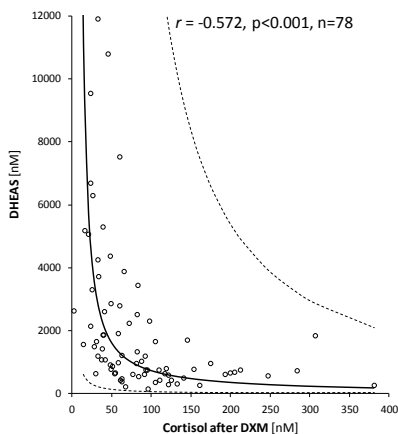
Z 52 pacientů s incidentalomou nadledvin suprimovalo kortizol v 1-mg dexametazonovém testu pod 50 nmol/l 11 pacientů. Zbývajících 41 mělo hodnoty kortizolu mezi 51 a 381 nmol/l. Hladiny ACTH byly signifikantně snižené ve skupině subklinického CS oproti ostatním horm. afunkčním incidentalomům a kontrolám.

Při porovnání bazálních koncentrací steroidů měřených GC-MS/MS jsme prokázali signifikantní snížení u pacientů se subklinickým periferním CS oproti hormonálně afunkčním incidentalomům u 10 z 83 měřených steroidů, Obr. 1.



Obr. 1. Steroidy signifikantně statisticky odlišné ve skupině subklinického CS oproti skupině hormonálně afunkčních incidentalomů

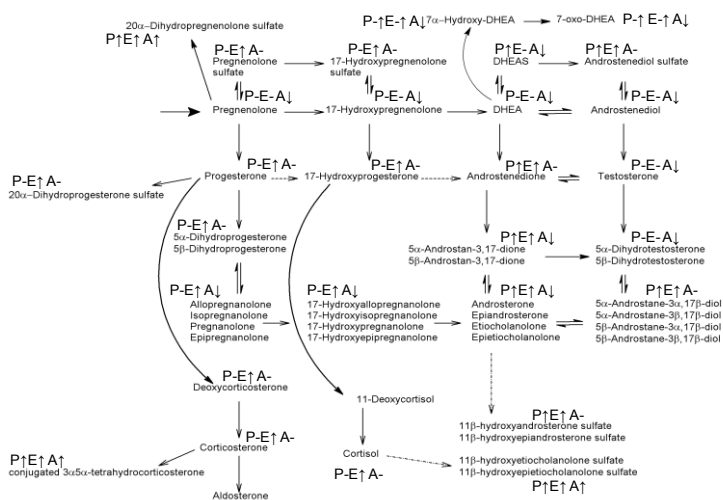
Suprese kortizolu v 1 mg dexametazonovém testu korelovala (dle očekávání) nepřímo úměrně s bazální hladinou DHEAS, Obr. 2.



Obr. 2 Pearsonova korelace mezi bazální hladinou DHEAS a kortizolem v 1 mg dexametazonovém testu. Plná a čárkované čáry reprezentují hlavní osu, resp. 95% konfidenční interval spolehlivosti.

U všech skupin pacientů s Cushingovým syndromem jsme pozorovali nedostatečnou supresi kortizolu v 1 mg 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 významnosti. UFC byl signifikantně vyšší ve skupině Cushingovy choroby oproti CS při adenomech nadledvin, zatímco hladiny pŕlnočního kortizolu byly u těchto skupin srovnatelné.

Statisticky signifikantní rozdíly mezi různými typy CS jsou znázorněny na Obr. 3.

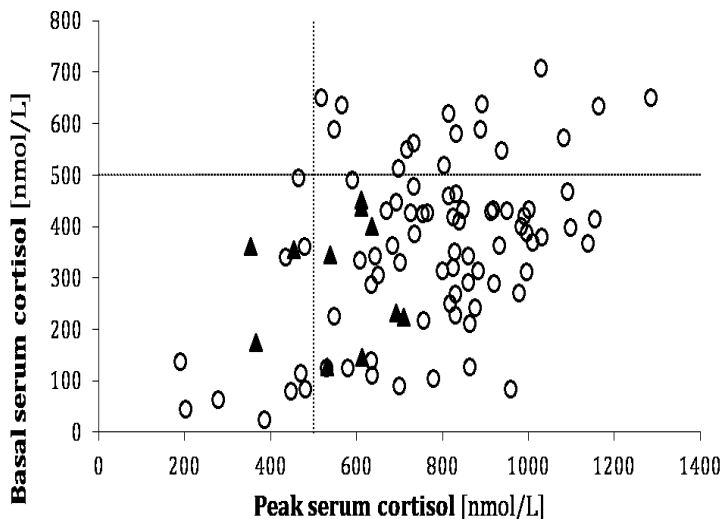


Obr. 3 Zobrazení steroidního metabolomu a jeho signifikantní změny ($p < 0,05$) oproti kontrolám. Cushingova choroba (P); Ektopický CS (E); Adrenální CS (A)

2.část práce

Všech 16 pacientů s hodnotami bazálního pooperačního kortizolu >500 nmol/l prokázalo dobrou odpověď v stimulačních testech. 78 z 94 pacientů mělo časné pooperační koncentrace kortizolu <500 nmol/l. Ve skupině pacientů s bazálním kortizolem <100 nmol/l měli pouze 2 z 7 pacientů dostatečnou odpověď ve 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 - 500nmol/l měli v 27 z 28 případů dostatečnou odpověď v stimulačním testu. Jeden pacient měl bazální kortizol 494nmol/l a stimulovanou maximální hodnotu 465nmol/l. Výsledky zobrazeny v Obr. 4.



Obr. 4 Vztah hodnot bazálního kortizolu časně po operaci a stimulačních testů s odstupem několika měsíců; bazální pooperační kortizol (osa y); maximální stimulovaný kortizol v stimulačním testu s odstupem (osa x); ▲ – ITT; ○ – synacthenový test

5. Diskuse

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

Nízký DHEAS u pacientů se subklinickým periferním CS byl popsán již v mnoha studiích (Nawata H. et al., 1985; Yamaji T., Ibayashi H., 1969). Také nízký volný DHEA a androstendion byl popsán (Di Dalmazi G. et al., 2015; Ozgen A. G. et al., 2001). Naše výsledky tyto poznatky potvrzují. Je nutné brát v potaz i změny těchto hormonů v různých věkových skupinách, neboť např. DHEAS klesá s narůstajícím věkem (Dušková M. et al., 2018).

V souladu s výše popsányi známými změnami naše výsledky potvrzují zásadní roli nízkého DHEAS u obou pohlaví a unilaterálních i bilaterálních incidentalomů se subklinickým CS. Kromě toho jsme zjistili 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 dihydrotestosteron vedoucí z 17-hydroxy-progesteronu přes androsteron (Auchus R. J., 2004; Van L. T., 2013). U pacientů s plně vyjádřeným CS (jiná studie, nepublikovaná data) jsme též pozorovali obdobné, ale více vyjádřené změny. Na základě těchto znalostí usuzujeme, že nízké koncentrace epiandrosteron sulfátu, androsteron sulfátu, androstenediol sulfátu, konjugovaného 5α -androstane- $3\beta,17\beta$ -diolu, konjugovaného 5α -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diolu,

a konjugovaného 5β -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diolu vycházejí pravděpodobně z nízkého DHEAS. Nelze však ani vyloučit přispění „back-door“ cesty.

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 sensitivitou a specificitou jako běžné používané klinické metody. Přesnější zhodnocení těchto steroidních změn musí být dále zhodnoceno ve studiích porovnávajících klinické dopady a komorbidity.

Při hodnocení steroidů u pacientů s CS se většina minulých prací zabývala stanovením steroidů ze sbírané moči. Naproti tomu naše práce hodnotí změny v séru. V minulých pracích bylo popsáno snížení DHEA u adrenálních adenomů, ale zvýšení u ACTH dependentních forem CS (Schöneshöfer M. et al., 1986). Snížení močových hladin androstetriolu, androsteronu a etiocholanolonu u adenomů nadledvin s CS potvrdila další práce (Kikuchi E. et al., 2000). Naše data potvrzují zvýšení androgenů u ACTH dependentních forem CS a snížení u adrenálního CS. Dále jsme pozorovali zvýšení deoxykortikosteronu a kortikosteronu u ektopické formy CS, ale ne u Cushingovy choroby. To může být vysvětleno sníženou aktivitou aldosteron syntetázy s následnou akumulací těchto prekurzorů u ektopické formy CS. Při rozlišení ACTH dependentních forem je „zlatým standardem“ katetrizace petrozních splavů. Stejně tak vysokodávkový dexametazonový supresní test a test s CRH mají v tomto rozlišení vysokou výpovědní

hodnotu (Isidori A. M. et al., 2006). (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.

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. 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; Watts N. B., Tindall G. T., 1988). Na druhou stranu jako dostatečně vysoké koncentrace časného pooperačního 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 koncentrace kortizolu vykazující 100% specificitu pro detekci pouze hypokortikálních pacientů 82 nmol/l a níže, a naopak kontrace se 100% specificitou pro vyloučení adrenální insuficience vyšla 495 nmol/l a výše. 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 časnými pooperačními

bazálními koncentracemi 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 časný bazální kortizol pod 100 nmol/l pooperačně je vysoká pravděpodobnost adrenokortikální insuficience, ale i přes to může časem dojít k restituci adrenokortikální funkce.

6. Závěry

Závěry 1. části práce

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 pupečnicku 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 hyperkortizolismu?

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

3. Jaké je složení pacientů s incidentalomy nadledvin se 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 maximálního rozměru incidentalomu u pacientů s SH oproti afunkčním (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 ovlivněno relativně malým počtem pacientů.

4. Jaké jsou 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 prokázali zvýšení mineralokortikoidních prekurzorů ve srovnání se zdravými kontrolami. Jako hlavní příčina těchto rozdílů se jeví stimulace androgenů ACTH, ale nelze vyloučit ovlivnění jinými, dosud neodhalenými 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 přispívá k diagnostice CS. U adrenálních lézí je vyšetření androgenů jedním z důležitých vyšetření při suspekci na karcinom nadledviny. Stanovení dalších námi popsanych, dosud rutinně neužívaných steroidů může v budoucnu tuto diagnostiku zpřesnit. Při srovnání ektopické formy CS s centrální formou CS (Cushingova choroba) jsme našli rozdíly ve steroidním metabolomu, které by potenciálně mohly v budoucnu pomoci v diferenciální diagnostice CS.

Závěry 2. části práce

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

Na základě výsledků analýzy našich dat lze u pacientů s velmi nízkým, a naopak vysokým bazálním kortizolem pooperačně s vysokou pravděpodobností předpovědět

funkci osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny. Naopak u pacientů s hodnotami bazálního kortizolu pooperačně ve středním pásmu je provedení stimulačního testu s odstupem nutné, i když riziko hypokortizolismu je menší než pravděpodobnost dobré kortikotropní funkce. U pacientů s bazálním kortizolem > 500 nmol/l je riziko hypokortizolismu minimální.

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

U pacientů s bazálním kortizolem <100 nmol/l byla v naší skupině zachovaná kortikotropní osa 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 osa 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 v pooperační substituční terapii glukokortikoidy. Je však nutno zmínit, že v jiných studiích byla vzácně popsána glukokortikoidní insuficience, která se rozvinula i s delším odstupem od operace.

7. Použitá literatura

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.

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

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.

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.

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.*, 2015, 100: 3529–3538.

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.*, 2014, 2: 396–405.

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

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.

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.

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).

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

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.

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.

Masuda M. Urinary ketosteroid excretion patterns in congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1957, 17: 1181–1190.

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.

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

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.

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.

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

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

Vlastní publikace autora:

1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

a) s IF

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

IF 5,789

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.

Physiological Research 64: Issue 3, 2015

IF 1,487

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

Physiological Research 68: Issue 2, 2019

IF 1,324

2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

a) s IF

Netuka, D., et al.. Intraoperative Magnetic Resonance Imaging During Endoscopic Transsphenoidal Surgery of Growth Hormone-Secreting Pituitary Adenomas. World Neurosurgery, 2016; 91, 490–496

IF 2,592

Franck, S. E., et al.. A multivariable prediction model for pegvisomant dosing: monotherapy and in combination with long-acting somatostatin analogues. European Journal of Endocrinology, 2017; EJE-16-0956

IF 4,012

Petrossians, P., et al.. Acromegaly at diagnosis in 3173 patients from the Liège Acromegaly Survey (LAS) Database. Endocrine-Related Cancer, 24(10), 505–518

IF 5,331

b) bez IF

Hána V. et al. Hypogonadismus u mužů a jeho léčba Čas. Lék. čes. 2017; 156: 258-265

Hána V. et al. Registr selárních tumorů - RESET: Diagnostika a terapie akromegalie v České a Slovenské republice v 21. století, DMEV Diabetes metabolismus, endokrinologie, výživa, 2013; 16, 4

Monografie a kapitoly v monografiích

ENDOKRINOLOGIE, Galén, Josef Marek, Václav Hána et al., 2017, spoluautor

Abstrakta v sbornících

Adrenal cortex conference, Munich, 2018

ECE - 20th European congress of endocrinology, Barcelona 2018

ECE - 19th European congress of endocrinology, Lisabon 2017

ECE - 18th European congress of endocrinology, Mnichov 2016

XXXVIII. Endokrinologické dny, Špindlerův Mlýn 2015

ECE - 17th European congress of endocrinology, Dublin 2015

XXXVI. Endokrinologické dny Plzeň, 2013

13th ESE Postgraduate Course in Clinical Endocrinology, 2013

Přednášky na odborných setkáních přednesené autorem

40. Endokrinologické dny s mezinárodní účastí, Praha, 2017

7. hradecký postgraduální kurz v endokrinologii, 2016

6. hradecký postgraduální kurz v endokrinologii, 2014

MUSIC-Pit (Marseille University Specialized International Course on Pituitary disorders) Preceptorship, 2014