



T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**Santral Adrenal Yetmezlik Tanısında Tükürük Kortizol
Ölçümünün Geliştirilmesi ve Serum DHEA ile DHEA-S
Düzeylerinin Rolünün Tayini**

Dr. Nigar ABDULLAZADA

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2024

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**Santral Adrenal Yetmezlik Tanısında Tükürük Kortizol
Ölçümünün Geliştirilmesi ve Serum DHEA ile DHEA-S
Düzeylerinin Rolünün Tayini**

Dr. Nigar ABDULLAZADA

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Doç. Dr. Oytun PORTAKAL
(TEZ DANIŞMANI)

ANKARA

2024

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince bilgisi, tecrübesi, hoşgörüsü ve saygınlığı ile örnek aldığım değerli hocam Sayın Doç. Dr. Oytun Portakal'a sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım. Bilgi birikimini ve desteğini bizden hiçbir zaman esirgemeyen hocamızın katkıları için minnettarlığımı ifade ederim.

Eğitimimiz boyunca bize verdiği katkılardan dolayı başta Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Asuman H. Özkara olmak üzere, Sayın Prof. Dr. Aslı Pınar'a, Sayın Prof. Dr. İncilay Lay'a, Sayın Prof. Dr. Günnur Dikmen'e ve Anabilim Dalımızdaki diğer hocalarımıza teşekkür ederim.

Asistanlık süresince birlikte çalıştığım değerli asistan arkadaşlarım Dr. Belgin Bayram, Dr. Ezgi Ekinci, Dr. Yarkın Dolaş, Dr. Nazende Işlak, Dr. Meryem Zengin, Dr. Şamil Binici, Dr. Ayşe Buruş ve değerli teknisyen arkadaşlarım İlknur Çoban, Hamiyet Ankara, Fatih Sarıkaya, Veli Tato, Merve Banu Polat ve diğer birlikte çalıştığım tüm teknisyen ve personel arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her türlü desteğini her zaman yanımda hissettiğim sevgili eşim Dr. Nihad Nazarzade'ye teşekkürlerimi sunarım. Yaşamım boyunca destekleri, sevgileri ve dostluklarıyla her zaman yanımda olan değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmamda her türlü destek ve bilgi donanımını benden esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Endokrinoloji Anabilim Dalı'nın başkanı Sayın Prof. Dr. Alev Ozon'a ve örnek toplamada yardımları için Endokrin poliklinik hemşireleri Ümmuhan ve Nurcan hanım'a teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Nigar ABDULLAZADA

ÖZET

Nigar Abdullazada, Santral Adrenal Yetmezlik Tanısında Tükürük Kortizol Ölçümünün Geliştirilmesi ve Serum DHEA ile DHEA-S Düzeylerinin Rolünün Tayini, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi. Ankara, 2024 ;BAP Proje No: 20776

Santral adrenal yetmezliğin (AY) doğru ve erken tanısı önemlidir. Tükürük, birçok avantajı nedeniyle son yıllarda önemli bir tanı aracı haline gelmiştir. Geçerli, uygulanabilir ve hassas LC MS/MS yöntemi, plazma ve idrarda steroidlerin belirlenmesi için son yıllarda önem kazanmıştır. Bu çalışmada, santral adrenal yetmezlik şüphesi olan ve düşük doz ACTH stimülasyon testi uygulanan çocuklarda toplanan tükürük örneklerinde LC-MS/MS ile kortizol ölçümü için doğru ve seçici bir yöntem tanımlandı ve analitik olarak doğrulandı. Tükürük kortizolünün pik değerleri simülasyondan 40 dakika sonra elde edildi. Linear regresyon analizi LDT'ye tükürük kortizol yanıtının serum kortizolü ile yüksek oranda ilişkili olduğunu gösterdi ($r=0,865$). ROC analizi ile serum kortizol için 546 nmol/L kesme değeri alınarak, tükürük kortizolünün kesme değerleri 40. dakikada ve pik değerlerinde sırasıyla 12.0 nmol/L ve 12.0 nmol/L olarak belirlendi. Ayrıca, LC MS/MS ile tükürük kortizol ölçümünün uygun analitik performansa sahip olduğu tespit edildi. Böylece, santral AI grubunda 4.6 nmol/L'lik başlangıç tükürük kortizol konsantrasyonuna dayanarak, rutin klinik uygulamalar için hızlı ve uygun maliyetli bir yöntem olan yeni bir algoritma önerildi. Bu çalışma ayrıca santral AY grubunda plazma DHEA ve DHEA-S düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede ($p<0,001$) düşük olduğunu gösterdi. Sonuç olarak, santral AY tanısı için 12 nmol/L pik tükürük kortizol kesim değeri kullanılabilir. Duyarlı ve seçici kütle spektrometrik tükürük kortizol ve plazma DHEA-S ölçümü, HPA eksenini değerlendirmede alternatif bir yaklaşım olabilir.

Anahtar kelimeler: Santral adrenal yetmezlik, tükürük kortizolü, bazal kortizol, kütle spektrometresi, kesme değeri

SUMMARY

Nigar Abdullazada, Development of Salivary Cortisol Measurement in the Diagnosis of Central Adrenal Insufficiency and Determination of the Role of Serum DHEA and DHEA-S Levels, Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Specialization Thesis in Medicine. Ankara, 2024; BAP Project No: 20776.

The accurate and early diagnosis of central adrenal insufficiency (AI) is important. Saliva has become an important diagnostic tool in recent years due to its many advantages. Valid, applicable and sensitive LC-MS/MS method has gained importance in recent years for the determination of steroids in plasma and urine. In this study, we describe an accurate and selective method for the measurement of cortisol by LC-MS/MS in saliva samples collected from children with suspected central adrenal insufficiency who underwent low-dose ACTH stimulation test; it was then analytically validated. Peak values of salivary cortisol were obtained at 40 min after simulation.. Linear regression analysis showed was strong correlation between salivary cortisol and serum cortisol in response to LDT ($r=0,865$). Using ROC analysis, the cut-off value for serum cortisol was taken as 550 nmol/L, and the cut-off values for salivary cortisol were determined as 12.0 nmol/L and 12.0 nmol/L at 40 minutes and at peak values, respectively. Additionally, analytical performance of saliva cortisol assay by LC MS/MS method was found to suitable. Therefore, based on the baseline salivary cortisol concentration of 4.6 nmol/L in the central AI group, we proposed a new algorithm as a rapid and cost-effective method in routine practice. This study also showed that plasma DHEA and DHEAS levels were significantly low in the central AI group than that of control group ($p < 0,001$). In conclusion, the peak salivary cortisol of 12 nmol/L as a cutoff value can be used for the diagnosis of central AI. The sensitive and selective mass spectrometric salivary cortisol and plasma DHEA-S measurements, may be an alternative approach to assess HPA axis.

Key words: Central adrenal insufficiency, salivary cortisol, basal cortisol, mass spectrometry, threshold value

İÇİNDEKİLER

Teşekkür	i
Özet	ii
Summary	iii
Simgeler ve kısaltmalar	x
Şekiller dizini	xiii
Tablolar dizini	xvi
1. Giriş ve amaç	1
2. Genel bilgiler	3
2.1. Steroidogenez	3
2.2. Kortizol	6
2.3. Hipotalamik-pituiter-adrenal eksen	6
2.4. Glukokortikoid etkisinin mekanizmaları	8
2.4.1. Glukokortikoidlerin metabolik ve immün sistem üzerindeki etkileri	9
2.5. Kortizol taşınması ve bağlanma proteinleri	10
2.6. Adrenal yetmezlik	11
2.6.1. Tanım	11
2.6.2. Primer adrenal yetmezlik	11
2.6.3. Sekonder adrenal yetmezlik	12
2.6.4. Santral Adrenal Yetersizliğin klinik tablosu ve semptomları	13
2.7. HPA ekseninin bütünlüğü ve dinamik testler	14
2.7.1. İnsülin tolerans testi	14
2.7.2. Metirapon stimülasyon testi	15

2.7.3. Glukagon stimülasyon testi	15
2.7.4. ACTH Stimülasyon Testi	16
2.8. Santral adrenal yetmezliğin tedavisi	17
2.9. Tükürük	18
2.9.1. Tükürük sentezi ve regülasyonu	18
2.9.2. Parotis bezi	19
2.9.3. Submandibular bezi	19
2.9.4. Sublingual bezi	19
2.9.5. Küçük tükürük bezleri	20
2.9.6. Tükürük oluşumu	20
2.9.7. Tükürük bileşenleri, pH değeri ve üretim oranları	20
2.9.8. Tükürük bezlerinin sinirsel düzenlenmesi	20
2.10. Tükürük kortizol ölçümü	21
2.10.1. Tükürük kortizol ölçümünün avantajları	21
2.10.2. Tükürük kortizol testlerinde toplama yöntemlerinin rolü	22
2.10.3. Tükürük kortizol ölçümünün serum kortizol ölçümlerine göre avantajları	22
2.10.4. Tükürük kortizol ölçümünde çapraz reaktivite ve LC-MS/MS	22
2.11. Kütle spektrometrisi	23
2.11.1. Numune girişi	23
2.11.2. İyon kaynağı	23
2.11.2.1. Elektrosprey iyonlaştırması	24
2.11.2.2. Naoelektrosprey iyonizasyonu (nanoESI)	25
2.11.2.3. Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyonu	25

2.11.2.4. Matriks yardımcı dezorpsiyon iyonizasyonu (MALDI)	26
2.11.2.5. Elektron iyonizasyonu	27
2.11.2.6. Kimyasal İyonizasyon	27
2.11.2.7. Atmosferik basınç foto iyonizasyonu (APPI)	28
2.11.3. Vakum sistemi	29
2.11.4. Kütle analizörü	30
2.11.4.1. Magnetik sektörlü kütle analizörü	30
2.11.4.2. Kuadrapol kütle analizörü	30
2.11.4.3. Tandem-MS/MS	30
2.11.4.4. Tuzak tabanlı kütle spektrometrisi (QTRAP)	31
2.11.4.5. Uçuş zamanlı (TOF)	32
2.11.5. Dedektör	33
3. GEREÇ ve YÖNTEM	34
3.1. Çalışma tasarımı	34
3.1.1. Hasta popülasyonu	34
3.1.2. Dahil etme kriterleri	34
3.1.3. Dışlama kriterleri	35
3.1.4. Amaçlar	35
3.2. LDT uygulaması	35
3.2.1 LDT hazırlanma protokolü	35
3.2.2. LDT dozunun hazırlanması	35
3.3. Örnek toplama	36
3.3.1. Tükürük örneklerinin toplanması	36

3.3.2 Tükürük toplama öncesi hastanın uyması gereken kurallar	36
3.3.3. LDT Testi sırasında kan örneklerinin toplanması	37
3.3.4. 24 saatlik idrar örneklerinin toplanması	37
3.4. Kimyasal madde, ekipman ve cihazlar	38
3.4.1. Kimyasal maddeler	38
3.4.2. Ekipman ve cihazlar	38
3.5. Biyokimyasal ölçümler	39
3.5.1. Serum kortizol ölçümü	40
3.5.2. Plazma ACTH ölçümü	40
3.5.3. Plazma DHEA ve DHEA-S ölçümü	40
3.5.4. İdrar serbest kortizol ölçümü	40
3.5.5. Tükürük kortizol ölçümü	41
3.5.5.1. Stok standart çözeltilerim hazırlanması	41
3.5.5.2. İnternal standart çözeltilerin hazırlanması	41
3.5.5.3. Standart solüsyonların hazırlanması	41
3.5.5.4. Kalite kontrol örneklerinin hazırlanması	41
3.5.5.5. Hasta tükürük numunelerinin hazırlanması	42
3.5.5.6. Tükürük numunelerinin ekstraksiyon protokolü	42
3.5.5.7. Tükürük kortizolü LC-MS/MS ölçüm prosedürü	42
3.6. Tükürük kortizol ölçümünün analitik değerlendirilmesi	45
3.6.1. Analitik tayin limitleri	45
3.6.1.1. Limit of Blank (LOB)	45
3.6 1.2. Limit of Detection (LOD)	45

3.6.1.3. Limit of Quantitation (LOQ)	45
3.6.2. Linearite çalışması	45
3.6.3. Geri elde (Recovery) çalışması	46
3.6.4. Tekrarlanabilirlik çalışması	46
3.6.5. İnterferans çalışması	47
3.6.6. Taşıma (Carry over)	47
3.6.7. Dondurup çözmenin etkisi	48
3.6.8. Matriks etkisi	48
3.6.9. Numune stabilitesi	49
3.7. İstatistiksel yöntemler	49
4. SONUÇLAR	50
4.1. Hasta bulguları	50
4.1.1. Hastalara ait demografik bulgular	50
4.1.2. Santral AY Etiyolojisi	51
4.2. LC MS/MS ile tükürük kortizol ölçümü	52
4.2.1. Tükürük Kortizol Standart Kromatogramları	52
4.2.2. Tükürük kortizol kalibrasyon eğrisi	55
4.2.3. Tükürük kortizol kontrol kromatogramları	55
4.2.4. Tükürük kortizol kromatogram örneği	56
4.3. Bazal serum kortizol/plazma ACTH konsantrasyonları	57
4.4. İdrarda serbest kortizolü	59
4.5. LDT' ye serum kortizol yanıtı	60
4.6. LDT' ye tükürük kortizol yanıtı	61

4.7.	Bazal tükürük kortizolu	62
4.8.	Tükürük ve serum kortizolünün karşılaştırılması	63
4.8.1.	LDT Tüm dakikalarında tükürük ve serum kortizolünün karşılaştırılması	63
4.8.2.	LDT pik değerlerinde tükürük ve serum kortizol karşılaştırılması	65
4.9.	Tükürük kortizol ölçümünün Santral AY için tanısal doğruluğu	67
4.10.	Plazma DHEAS Ölçümü	74
4.10.1.	Santral AY tanısı için plazma DHEA-S'ın tanısal doğruluğu	74
4.11.	Plazma DHEA ölçümü	76
4.12.	LC-MS/MS ile tükürük kortizolu ölçüm yönteminin analitik değerlendirilmesi	78
4.12.1.	Analitik ölçüm limitleri	78
4.12.2.	Linearite çalışması	78
4.12.3.	Geri elde (Recovery) çalışması	80
4.12.4.	İnterferans çalışması	80
4.12.5.	Tekrarlanabilirlik çalışması	81
4.12.5.A.	Çalışma içi tekrarlanabilirlik	81
4.12.5.B.	Günler arası tekrarlanabilirlik	83
4.12.6.	Taşıma (Carry over)	86
4.12.7.	Dondurup çözmenin etkisi	87
4.12.8.	Matriks etkisi çalışması	89
4.12.9.	Örnek stabilite Çalışması	89
5.	Tartışma	92
6.	Sonuç	105
	Kaynaklar	106

SİMGELER VE KISALTMALAR

HPA:	Hipotalamus-pituiter-adrenal eksen
CRH:	Kortikotropin salgılayan hormon
POMC:	Proopiomelanokortin
AMP:	Siklik adenosin monofosfat
AVP:	Arginin vazopressin
GC:	Glukokortikoid
GR	Glukokortikoid reseptörü
HSP	Isı şok proteinleri
GRE	Glukokortikoid yanıt elementleri
CBG:	Kortikosteroid bağlayıcı globulin
AY:	Adrenal yetmezlik
MC:	Mineralokortikoid
MSH	Melanosit uyarıcı hormon
ITT:	İnsülin stres testi
HDT:	Yüksek doz ACTH stimülasyon testi
LDT:	Düşük doz ACTH testi
HC:	Hidrokortizon
AQP	Aquaporin
MS:	Kütle spektrometrisi
EI	Elektron iyonizasyonu
CI	Kimyasal iyonizasyon
ESI	Elektrospray iyonlaştırması

MALDI	Matriks yardımcı desorbsiyon iyonlaştırma
API	Atmosferik basınç iyonizasyonu
APCI	Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyonu
APPI	Atmosferik basınç foto-iyonizasyon
ACTH	Adrenokortikotropik hormon:
LC-MS/MS	Sıvı kromatografi- tandem kütle spektrometresi
DHEA-S	Dihidroandrostenon sülfat
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
TSH	Tiroit Uyarıcı Hormon
GH	Büyüme hormonu
LH	Luteinizan hormon
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GST:	Glukagon stimülasyon testi
SST	Sinachten stimülasyon testi
PKA	Protein kinaz A
StAR	Steroidojenik akut düzenleyici protein
NF-kB	Nükleer faktör kappa- B
FC	Serbest kortizol
TC	Toplam kortizolden
SC	Tükürük kortizolü
HIV	İnan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
M/z	Kütle/yük
SF	Fizyolojik çözelti
ATP	Adenozin Trifosfat

IP3	İnositol 1,4,5 trisfosfat
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi
LOQ	Analitik tespit sınırı
LOD	Tespit limiti
LOQ	Kantitasyon limiti
LOB	Kör limiti
%CV	Yüzde değişim katsayısı
SD	Standart sapma

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hücre içi kolesterol taşınması	4
Şekil 2.2. Kolesterol sentezi	5
Şekil 2.3. Steroidogenez yolağı	5
Şekil 2.4. Kortizol yapısı	6
Şekil 2.5. Proopiomelanokortin ve işlem sonrası biyolojik aktif peptid hormonları	7
Şekil 2.6. Ön hipofizden adrenokortikotropik hormon (ACTH) salgılanmasını etkileyen faktörler	8
Şekil 2.7. Glukokortikoid etkisinin mekanizması	9
Şekil 2.8. Tükürük bezleri	19
Şekil 2.9. Elektrosprey iyonizasyon mekanizması.	25
Şekil 2.10. Dört kutuplu iyon tuzak kütle analizörünün yapısı	32
Şekil 3.1. Tükürük örneklerinin hazırlanması	36
Şekil 3.2. Kan ve Tükürük Örnek Alımları ve Çalışılan Testler	37
Şekil 3.3. İdrar örneklerinde çalışılan testler	38
Şekil 3.4. Çalışmada Kullanılan biyokimyasal yöntemler	39
Şekil 3.5. Mobil faz B'nin akış gradient eğrisi	43
Şekil 4.1 a-f: Tükürük kortizolü tandem MS standart kromatogramları	54
Şekil 4.2. Tükürük kortizol standart grafisi.	55
Şekil 4.3. Tükürük kortizol düşük, orta, yüksek kontrol değerleri	56
Şekil 4.4. Bir hastanın LDT sırasındaki (0., 20., 30. ve 40. dakikalar) tükürük kortizol sonuçları	57

Şekil.4.5. Kontrol ve santral AY grubunda sabah serum kortizolü	58
Şekil.4.6. Kontrol ve Santral AY grubunda sabah plazma ACTH değerleri	58
Şekil 4.7 Santral AY de bazal serum kortizolü ve bazal ACTH sonuçları	59
Şekil 4.8. 24 saatlik idrar serbest kortizol değerleri	59
Şekil 4.9.a. Kontrol grubunda DT' ye serum kortizol yanıtı	60
Şekil 4.9. b. Santral AY grubunda LDT' ye serum kortizol yanıtı	60
Şekil 4.10. Kontrol ve Santral AY gruplarında ortalama pik serum kortizolü	61
Şekil 4.11. a. Kontrol grubunda LDT'ye tükürük kortizol yanıtı	61
Şekil 4.11.b. Santral AY gruplarında LDT'ye tükürük kortizol yanıtı	61
Şekil 4.12. Kontrol ve Santral AY grubunun pik tükürük kortizol seviyeleri	62
Şekil 4.13. Santral AY ve kontrol grubunda bazal tükürük kortizol seviyeleri	62
Şekil 4.14. a. Kontrol grubunda bazal kortizol düzeyleri	63
Şekil 4.14. b. Santral AY grubunda bazal kortizol düzeyleri	63
Şekil 4.15. LDT tüm dakikalarında Santral AY hastalarının tükürük kortizolü ve serum kortizol korelasyonu	64
Şekil 4.16. Santral AY hastalarının tükürük kortizol ve serum kortizolü pik değerlerinin karşılaştırılması	66
Şekil 4.17. a. 0. Dakikada Tükürük Kortizolü İçin ROC Eğrisi	68
Şekil 4.17. b. 20. Dakikada tükürük kortizolü için ROC eğrisi	69
Şekil 4.17. c. 30. dakikada tükürük kortizolü için ROC eğrisi	70
Şekil 4.17.d. 40. dakikada tükürük kortizolü için ROC eğrisi	71
Şekil 4.17.e. Total tüm dakikada tükürük kortizolü için ROC eğrisi	72
Şekil 4.17.f. Pik tükürük kortizolü için ROC eğrisi	73
Şekil 4.18. Santral AY ve kontrol gruplarında plazma DHEA-S düzeyleri	74

Şekil 4.19. Plazma DHEA-S ROC eğrisi	75
Şekil 4.20. Kontrol ve Santral AY gruplarında plazma DHEA düzeyleri	76
Şekil 4.21. Bazal kortizolün DHEA'ya molar oranı	77
Şekil 4.22. Tükürük kortizolü linearite grafiği	79
Şekil 4.23. a. Düşük tükürük kortizol havuzunda tekrarlanabilirlik	81
Şekil 4.23.b. Orta tükürük kortizol havuzunda tekrarlanabilirlik	82
Şekil 4.23.c. Yüksek tükürük kortizol havuzunda tekrarlanabilirlik	82
Şekil 4.24. a. Düşük tükürük kortizol havuzunda günler arası tekrarlanabilirlik	84
Şekil 4.24. b. Orta tükürük kortizol havuzunda günler arası tekrarlanabilirlik	85
Şekil 4.24. c. Yüksek tükürük kortizol havuzunda günler arası tekrarlanabilirlik	85
Şekil 4.25. a. Düşük konsantrasyonda kortizol ölçümünde örnek stabilitesinin değerlendirilmesi	90
Şekil 4.25. b. Yüksek konsantrasyonda kortizol ölçümünde örnek stabilitesinin değerlendirilmesi	90
Şekil 5.1 HPA eksenini değerlendirmede algoritma	98
Şekil 5.2. Steroid hormon sentezi	100

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Tükürük kortizol ölçümü için kullanılan LC-MS/MS' in özellikleri	44
Tablo 4.1. Santral AY tanısı alan ve almayan tüm katılımcıların demografik özellikleri ve başlangıç laboratuvar bulguları	50
Tablo 4.2. Hastalara ait tanıları	51
Tablo 4.3 LDT yapılan iki grupta bazal ve pik kortizolü ve DHEA düzeyleri	76
Tablo 4.4 Kör örnekte tükürük kortizolü sonuçları	78
Tablo 4.5 Tükürük kortizolü linearite çalışması sonuçları	79
Tablo 4.6. Orta kortizol konsantrasyonlarında % Geri elde sonuçları	80
Tablo.4.7. İnterferans çalışma sonuçları	80
Tablo.4.8. Çalışma içi tekrarlanabilirlik sonuçları	81
Tablo 4.9. Günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları	83
Tablo 4.10. Tükürük kortizol ölçümünde taşıma sonuçları	86
Tablo 4.11.a. Düşük kortizol havuzunda don-çöz etkisinin değerlendirilmesi	88
Tablo 4.11.b. Yüksek kortizol havuzunda don-çöz etkisinin değerlendirilmesi	88
Tablo 4.12. Tükürük kortizol ölçümünde matris etkisi	89

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Santral adrenal yetmezlik (Santral AY), hipofiz veya hipotalamustaki hastalıklar veya yaralanmalar sonucu adrenokortikotropin (ACTH) sekresyonunda bozulma ve buna bağlı kortizol üretiminde azalma ile karakterize edilen bir endokrin bozukluktur. Santral AY'nin en sık görülen nedeni iyatrojeniktir; ekzojen glukokortikoid tedavisinin aniden kesilmesi sonucu ortaya çıkabilir. Diğer nedenler arasında hipofiz tümörleri, kranial enfeksiyonlar, travma, cerrahi müdahaleler ve kranial radyoterapi yer almaktadır. Ayrıca, yüksek doz opiat kullanımı ve son yıllarda kanser tedavisinde kullanılan immün kontrol noktası inhibitörleri de adrenal yetmezliğe yol açabilmektedir. Semptomlar ve bulgular genellikle spesifik olmadığından, tanı koymada zorluk yaşanabilir. Sabah 8:00'de yapılan bazal kortizol ve ACTH düzeyleri tek başına tanı koymada yetersizdir; bu nedenle dinamik testlerin yapılması kılavuzlarda önerilmektedir. Klinik uygulamada düşük doz ACTH testi (LDT) yaygın olarak kullanılmakta olup, 30. dakikada 500 nmol/L (<18.1 µg/dL) üzerinde ölçülen kortizol düzeyi adrenal yetmezliğin dışlanması için önerilmektedir.

Tükürük kortizolü hiperkortizolizm tanısında kullanılmakla birlikte, son yıllarda Santral AY değerlendirilmesinde de önerilmiştir. Tükürük, kolay ve invaziv olmayan bir örnek türü olarak değerlendirilmektedir. Sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ise küçük moleküllerin tayininde yüksek duyarlılık sağlayan bir yöntem olarak klinik laboratuvarlarda kullanılmaktadır ve kortizol ölçümü için oldukça spesifiktir.

Bu çalışmanın amacı, uzun süre glukokortikoid replasmanı uygulanan ve Santral AY 'den şüphelenilen hastalarda tükürük kortizol tayini için LC-MS/MS yöntemini geliştirmek ve analitik olarak değerlendirmektir. Ayrıca, plazma dihidroepiandrostenodion (DHEA) ve dihidroepiandrostenodion sülfat (DHEA-S) ölçümünün santral AY tanısındaki rolünün belirlenmesi ve ilgili eşik değerin değerinin saptanması hedeflenmektedir. Bu amaçla, Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi Çocuk Endokrinoloji Bölümü'ne başvuran, 1-18 yaş arasındaki santral adrenal yetmezlik şüphesi olan ve düşük doz ACTH testi (LDT) yapılan hastalar çalışmaya

dahil edilmiştir. Örneklerden, bazal ve LDT sırasında alınan tükürük ve venöz kan örneklerinden DHEA-S düzeyleri LC-MS/MS yöntemiyle ölçülmüştür. Ayrıca, bu hastalarda bazal ACTH ve adrenal rezervi değerlendirmek amacıyla idrar serbest kortizol ölçümü gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada şu hipotezlerin kanıtlanması amaçlanmıştır:

1. Santral AY tanısında LDT yapılan hastalarda bazal ve pik tükürük kortizolünün LC-MS/MS yöntemi kullanılarak ölçümü yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir.
2. Plazma DHEA/ DHEA-S düzeylerindeki düşüş, Santral AY'ın erken tanısında önemlidir.

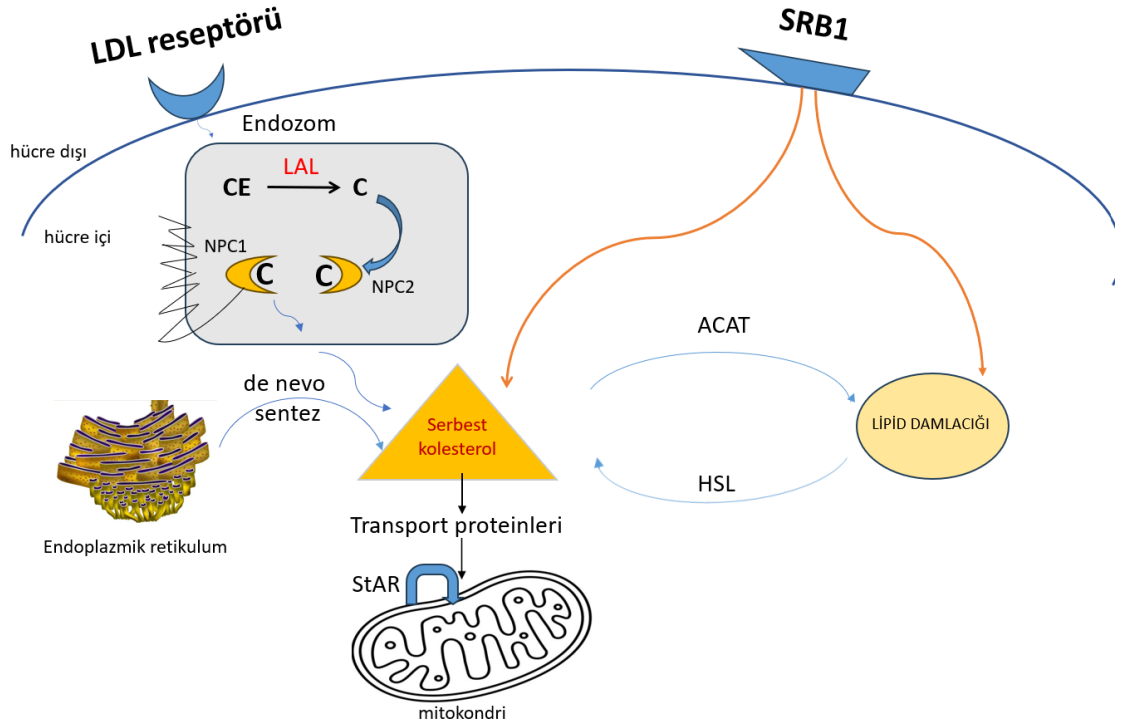
Ayrıca, LC-MS/MS yöntemi kullanılarak tükürük kortizol ölçümünün geliştirilmesi ve doğrulaması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Steroidogenez

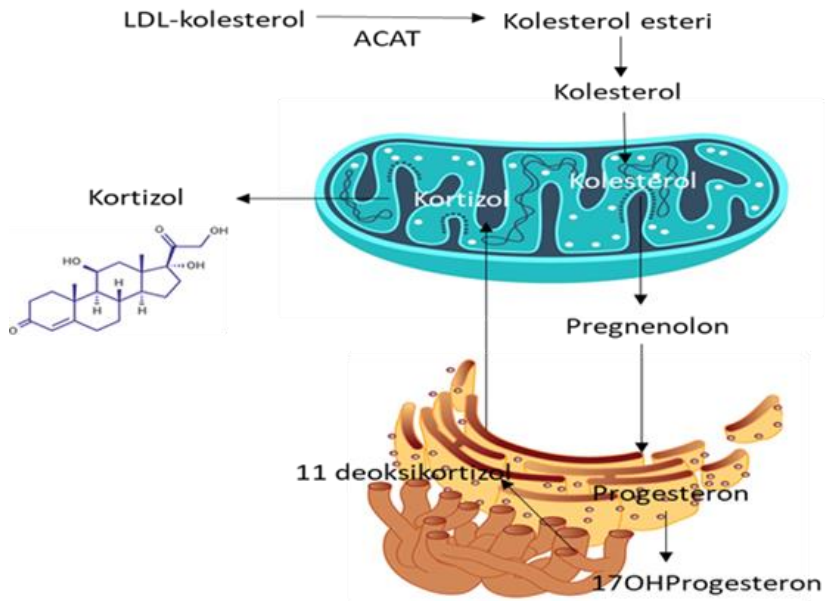
Steroidogenez, hücrede kolesterolün hormonlar tarafından düzenlenen enzimatik süreçlerle steroid hormonlarına dönüştürülmesidir. Bu süreçte kolesterol, steroid hormonlarının sentezi için temel yapı taşı oluşturur ve ilk kritik basamağı temsil eder.

Kolesterol, hücre içinde endoplazmik retikulumda (ER) de novo olarak sentezlenir ve serbest kolesterol olarak üretilir. Ancak, steroidojenik kolesterolün çoğu dolaşımdaki lipoproteinlerden elde edilir. Yüksek yoğunluklu lipoproteinlerde (HDL) bulunan kolesterol esterleri, scavenger reseptör B1 (SR-B1) aracılığıyla hücreye taşınır; düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL) ise LDL reseptörleri aracılığıyla reseptör aracılı endositoz yoluyla hücreye girer. LDL reseptörleri aracılığıyla hücreye alınan kolesterol esterleri, endozomlar ve lizozomlarda işlenir. Lizozomal asit lipaz (LAL), kolesterol esterlerini parçalayarak serbest kolesterol oluşumunu sağlar. Serbest kolesterol, NPC2 (Niemann-Pick C2 protein) tarafından bağlanır ve taşınmaya hazırlanır. NPC1 (Niemann-Pick C1), serbest kolesterolü lizozomal membrana entegre eder, bu da kolesterolün hücre içinde gerekli yerlere düzgün bir şekilde dağıtılmasını sağlar. Serbest kolesterol, hücre tarafından kullanılabilir veya acyl-koenzim-A-kolesterol-asil-transferaz (ACAT) tarafından yeniden esterleştirilerek lipid damlacıklarında depolanabilir. Benzer şekilde, SR-B1 aracılığıyla hücreye alınan HDL kaynaklı kolesterol esterleri, hormon duyarlı lipaz (HSL) tarafından hidrolize edilir ve ortaya çıkan serbest kolesterol ya hücre içi kullanım için ya da depolanmak üzere yeniden esterleştirilir. StAR (Steroidogenic Acute Regulatory) proteini, kolesterolü mitokondriye taşıyarak steroid hormonlarının sentezini başlatır (1, 2) (Şekil 2.1).

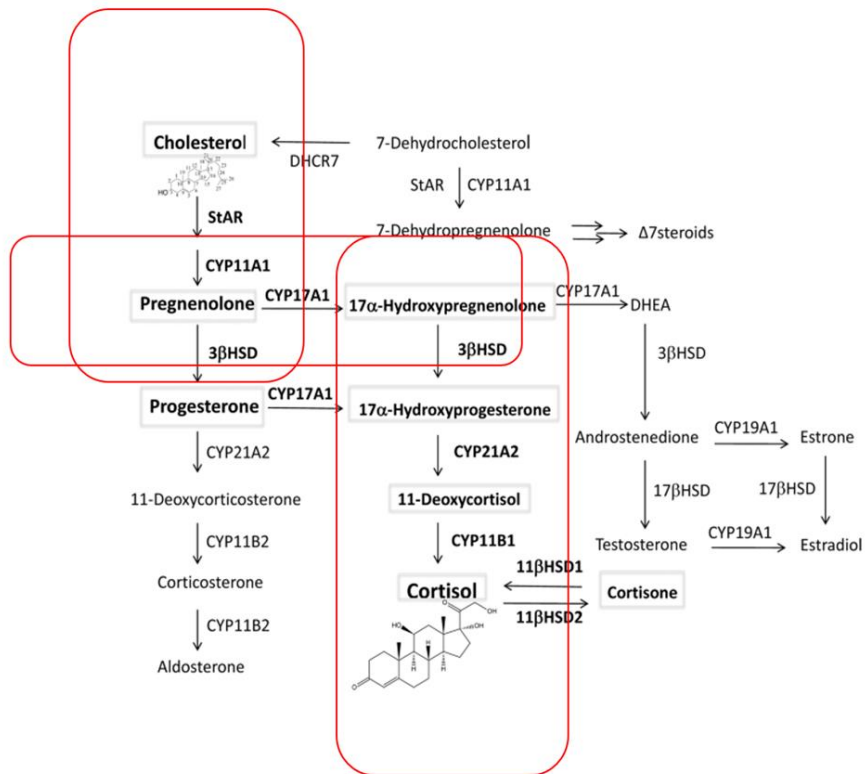


Şekil 2.1. Hücre içi kolesterol taşınması.

Kolesterolün dış mitokondriyal membran ile iç mitokondriyal membran arasındaki hareketi, steroidogenezinin başlatılması için kritik bir rol oynar. Bu süreç, kolesterol yan zincir kesici enzim (P450scc) sisteminin iç mitokondriyal membranda yerleşmiş olması nedeniyle büyük önem taşır. Bu enzim, kolesterolün 20,22 bağımlı keserek pregnenolona dönüştürür, bu da steroid hormonlarının sentezinde hız sınırlayıcı ve ilk adımdır. Pregnenolon, ya mitokondrideki veya endoplazmik retikulumda (ER) bulunan 3 β -hidroksisteroid dehidrojenaz (3 β HSD) tarafından progesterona dönüştürülür ya da ER'ye geçerek P450c17 enzimi tarafından 17 α -hidroksipregnenolona, ardından 3 β HSD ile 17 α -hidroksiprogesterona dönüştürülür. 17 α -hidroksiprogesteron, ER'deki P450c21 enzimi tarafından 21-hidroksilasyona uğrayarak 11-deoksikortizole dönüşür. 11-deoksikortizol, mitokondriye taşınır ve burada P450c11b (11 β -hidroksilaz) enzimi tarafından hidroksillenir, böylece kortizol oluşur (1) (Şekil 2.2 ve Şekil 2.3).



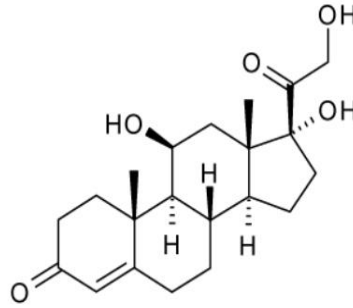
Şekil 2.2. Kolesterol sentezi.



Şekil 2.3. Steroidogenez yolağı.

2.2. Kortizol

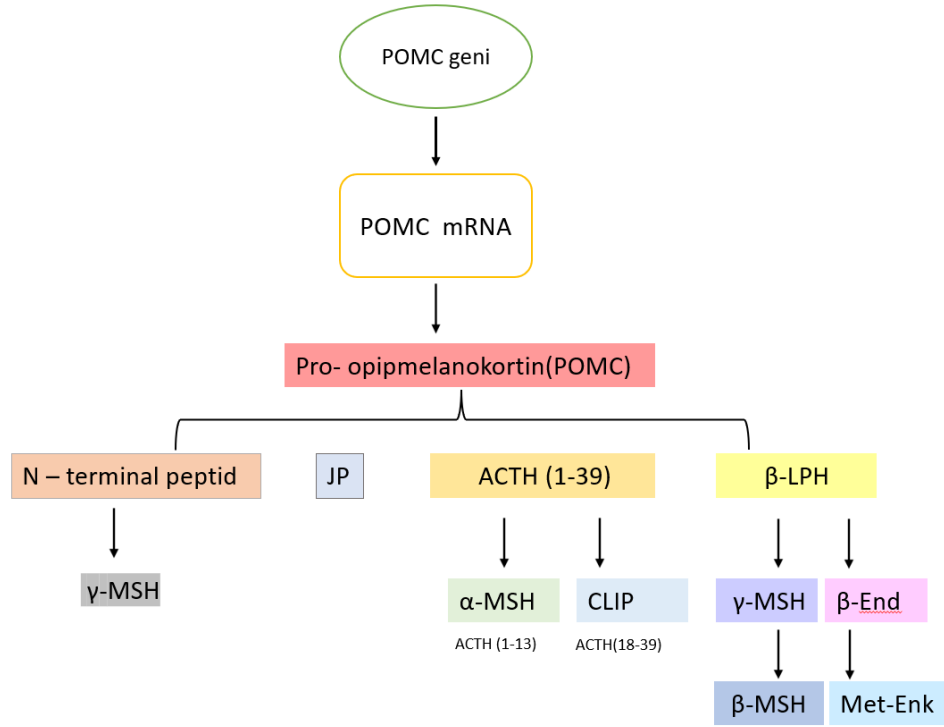
Kortizol, 21 karbonlu bir yapıya sahip olan ve adrenal korteksten salgılanan bir glukokortikoid hormondur. Kolesterolde türetilir. Plazmadaki normal kortizol seviyesi, hipotalamustaki suprachiasmatic nuclei (SCN) tarafından düzenlenen sirkadiyen ritimden etkilenir. Bu ritim, sabah saatlerinde kortizol seviyelerinin zirveye ulaşmasını (20 µg/dL) ve akşam saatlerine doğru azalarak gece yarısında en düşük değer olan 5 µg/dL'ye düşmesini sağlar (3).



Şekil 2.4. Kortizol yapısı.

2.3. Hipotalamik-pituiter-adrenal eksen

Hipotalamik-pituiter-adrenal (HPA) eksen, kortizol salgısının düzenlenmesinde temel bir rol oynar. Kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH), ilk olarak Wylie Vale tarafından koyun hipotalamusundan keşfedilmiştir. CRH, hipotalamustaki paraventricüler çekirdekten 41 amino asitten oluşan bir polipeptid olarak sentezlenir ve hipofiz portal venöz sistemine salgılanır. CRH, ön hipofizdeki CRH 1 reseptörlerine bağlanarak hücre içi siklik adenosin monofosfat (cAMP) seviyelerini artırır. Bu artış, proopiomelanokortin (POMC) geninin transkripsiyonunu uyarır. POMC, 241 amino asitten oluşan ACTH ve diğer hormonların öncülü olan prohormondur. Arginin ve lizin amino asitlerin bulunduğu bölgelerde hidrolitik kesilmelere uğrayarak birçok aktif peptid hormon üretimini sağlar. Ön hipofizde, POMC, N-terminal peptid, birleştirici peptid (JP), ACTH ve β-lipotropin (β-LPH) peptidlerine dönüştürülür (4, 5).



Şekil 2.5. Proopiomelanokortin ve işlem sonrası biyolojik aktif peptid hormonları.

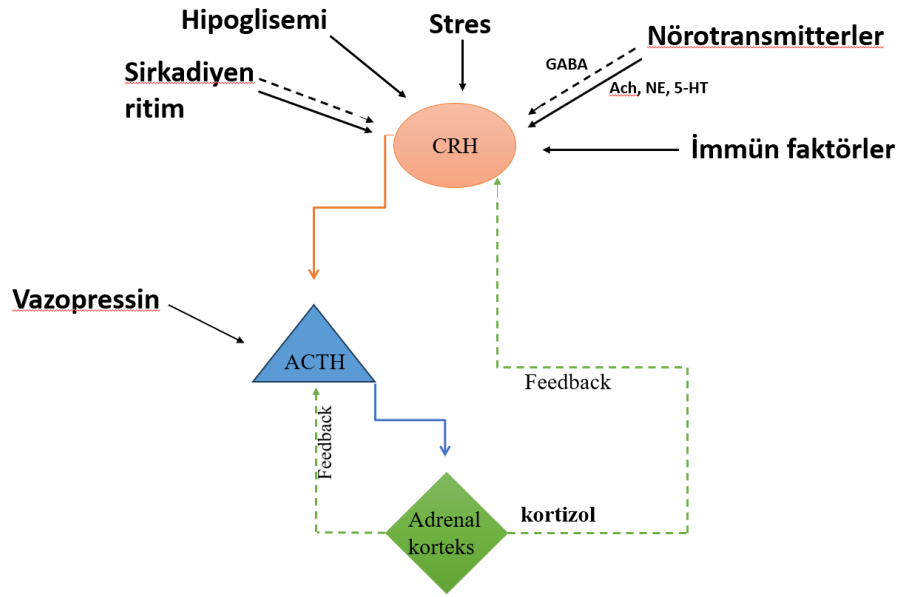
* CLIP (Corticotropin-like Intermediate lobe Peptide);*Alfa-MSH (Alfa-Melanotropin);*Gamma -MSH (Gamma-Melanotropin); *Beta-end(Beta-endorfin);* Met-enk (Met-enkephalin)

Interlökin-1, CRH salgısını artırarak ve ACTH salgılayıcı faktörlerin etkilerini modüle ederek ACTH salgısını teşvik ederken; Interlökin-2, POMC gen ekspresyonunu artırarak ve Interlökin-6, AVP salgısını artırarak ACTH salgısını güçlendirir. Ayrıca, HPA eksenini hem fiziksel hem de psikolojik stresörlere duyarlıdır ve özellikle yeni stresörler tarafından aktive edilir; tekrarlanan maruziyetle yanıt azalır. ACTH salgısı hamilelik ve menstrüasyon döngülerinde östrojen etkisiyle artar. Kortizol, ACTH ve CRH salgılanması üzerinde negatif geri bildirim yapar (4, 6) (Şekil 2.6.).

ACTH salgılanması sirkadiyen ritme ve pulsatif paterne sahiptir ve genellikle gece 24:00 ile 02:00 saatleri arasında düşük seviyelerde bulunur. Sabah erken saatlerde

(07:00 ile 08:00) bu hormonun seviyeleri zirveye çıkar ve gün boyunca azalır; yalnızca öğünlerden sonra kısa süreli artışlar gözlemlenir. Bu ritmin biyolojik saati hipotalamusun suprachiasmatic nükleusunda düzenlenir. Bununla birlikte, iltihap, enfeksiyon, ciddi hipotansiyon, yoğun egzersiz ve belirli derecelerde psikolojik stres gibi çeşitli stres faktörleri bu doğal ritmi bozabilir (4, 7).

ACTH, adrenal korteksin zona fasciculata hücrelerinde bulunan MC2-R reseptörlerine bağlanır. Bu bağlanma, hücre içindeki siklik adenozin monofosfat (cAMP) seviyelerini artırır ve cAMP, protein kinaz A' yı aktive eder. Aktif PKA, kolesterol taşıyıcı protein StAR'ı fosforile eder. Bu adım, tüm adrenokortikal hormonlar için hız sınırlayıcı bir süreçtir (3, 8).

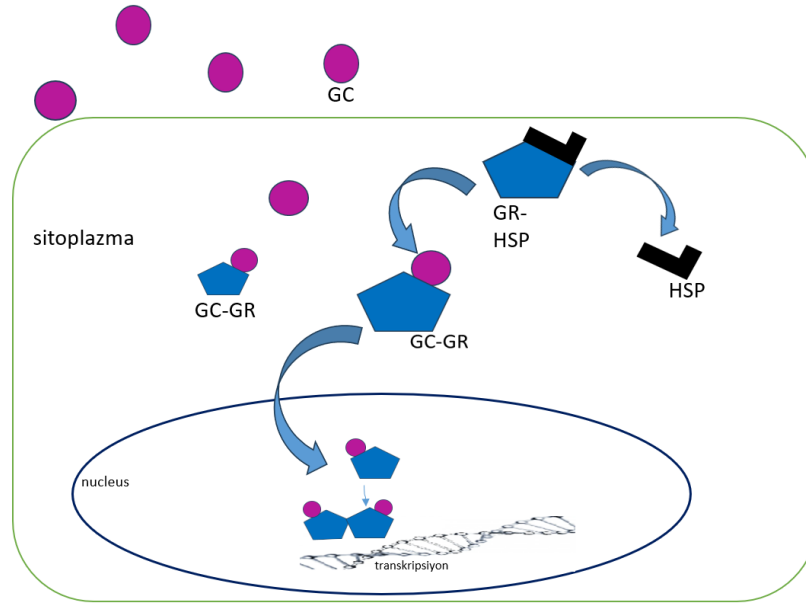


Şekil 2.6. Ön hipofizden adrenokortikotropik hormon (ACTH) salgılanmasını etkileyen faktörler.

2.4. Glukokortikoid etkisinin mekanizmaları

Glukokortikoidlerin (GC'lerin) etkisi, GC'nin hücre zarını geçip glukokortikoid reseptörüne (GR) bağlanmasıyla başlar. Normalde GR, hücre sitoplazmasında ısı şok

proteinleri (HSP'ler) tarafından inaktif halde tutulur. GC, GR'ye bağlandığında, HSP'ler ayrılır ve GR üzerindeki DNA bağlanma bölgeleri açığa çıkar, oluşan GC-GR kompleksi nucleusa girer. GR çekirdeğe girerken, başka bir GR kompleksi ile dimerleşir. Bu dimerleşme, GR'nin DNA üzerindeki glukokortikoid yanıt veren elemanlara (GRE'ler) bağlanmasını ve transkripsiyonun etkin bir şekilde düzenlenmesini sağlar (9).



Şekil 2.7. Glukokortikoid etkisinin mekanizması.

2.4.1. Glukokortikoidlerin metabolik ve immün sistem üzerindeki etkileri

Glukokortikoidler, özellikle kortizol, metabolizmayı ve bağışıklık sistemini düzenleyen steroid hormonlarıdır. Karaciğerde, glukokortikoidler glukoneogenez için gerekli enzimlerin üretimini artırarak karbonhidrat metabolizmasını düzenler. Bu anabolik süreç, glikoz sentezini teşvik ederken, kas ve yağ dokusunda kortizolün etkisiyle karbohidratlar, proteinler ve lipidlerin parçalanması sağlanır. Bu katabolik süreçler, hücrelerde enerji üretimi için gerekli olan ATP sentezini artırır.

Glukokortikoidler ayrıca insülin aktivitesini inhibe eder, böylece hücresele glüköz seviyelerinin düşmesine ve katabolik süreçlerin devam etmesine yol açar. Katabolik süreçler sonucunda oluşan amino asitler ve yağ asitleri, karaciğerde glukoneogenez için substrat olarak kullanılır.

Kortizol, dolaşımdaki lenfositlerin dalak ve kemik iliğine yeniden dağılımını sağlayarak plazma lenfosit sayısını azaltır. Ayrıca immünoglobulin üretimini engeller, lenfositlerin apoptozunu artırır ve inflamatuvar sitokinlerin üretimini, nükleer faktör kappa B (NF-kB) aktivitesini inhibe ederek durdurur. Kortizol, monositlerin makrofajlara dönüşümünü ve makrofaj fonksiyonlarını baskılar, böylece lokal inflamasyonu, histamin üretimini azaltır ve prostaglandin sentezini bozar. Bu etkiler, kortizolün inflamasyon ve immün yanıt üzerinde önemli bir düzenleyici rol oynadığını gösterir.

Glukokortikoidlerin uzun vadeli ve kontrolsüz etkileri ciddi sağlık sorunlarına yol açabilir. Kronik olarak yüksek kortizol seviyeleri, metabolik sendrom ve diyabet gibi hastalıkların yanı sıra bağışıklık sisteminin baskılanmasına ve enfeksiyon riskinin artmasına neden olabilir. Bu nedenle, glukokortikoidlerin etkilerinin dikkatlice izlenmesi ve düzenlenmesi önem taşır (10).

2.5. Kortizol taşınması ve bağlanma proteinleri

Kortizol, yağda çözünebilen bir hormon olup, vücutta taşınmak için protein taşıyıcılara ihtiyaç duyar. Toplam kortizol, serbest kortizol ve plazma proteinlerine bağlı kortizolü içerir. Dolaşımda kortizol, başlıca kortizol bağlayıcı globulin (CBG) ve albümine bağlı olarak taşınır; serbest formu ise <math>< 5\%</math>'tir ve bu form biyolojik olarak aktif olup idrar yoluyla atılır ve tükürükte bulunur. Bu serbest kortizol formunun ölçülmesi, tanı koymada önemli bir yardımcı olabilir. Serum CBG seviyelerindeki değişiklikler toplam kortizol düzeylerini etkilerken, serbest kortizol oranı sabit kalır. CBG ve albümin düzeylerindeki değişiklikler, klinik çalışmalarda sonuçların değerlendirilmesi ve HPA eksenini yetersizliklerinin teşhisi açısından önemli olabilir. Ayrıca, bu bağlanma proteinlerindeki değişiklikler böbrek yetersizliği, kritik

hastalıklar, gebelik ve oral kontraseptif kullanımı gibi durumlarda sonuçların yanlış yorumlanmasına yol açabilir (5, 7, 11, 12).

2.6. Adrenal yetmezlik

2.6.1. Tanım

Adrenal yetmezlik (AY), ilk olarak 1885 yılında Thomas Addison tarafından tanımlanmıştır. AY, adrenal korteksin hasar görmesi sonucu ortaya çıkan primer adrenal yetmezlik (Primer AY), ACTH salgısını etkileyen hipofiz bezi bozukluklarına bağlı olarak gelişen sekonder adrenal yetmezlik veya kortikotropin salgısını etkileyen hipotalamik bozukluklara bağlı olarak ortaya çıkan tersiyer adrenal yetmezlik şeklinde sınıflandırılabilir. Klinikte sekonder ve tersiyer AY arasındaki ayrımın tanısallık veya tedavi açısından belirgin bir önemi yoktur. Bu nedenle, bu iki durum genellikle Santral AY başlığı altında birlikte ele alınır (13).

AY, adrenal korteksin yeterli düzeyde GC ve/veya mineralokortikoid (MC) üretme kapasitesini kaybetmesi olarak tanımlanır. Primer AY gelişen hastalar hem GC hem de MC yetersizliği nedeniyle çeşitli klinik belirtiler gösterirler. Buna karşılık, Santral adrenal yetmezlik, hipotalamus veya hipofiz bezindeki hastalıklar ya da travmalar nedeniyle yetersiz ACTH salınımı sonucu meydana gelir ve bu da adrenal kortizol üretiminin yetersiz olmasına yol açar (14).

2.6.2. Primer adrenal yetmezlik

Primer AY, 100.000 bireyde 10-15' ini etkileyen ve farklı genetik nedenlere bağlı olarak ortaya çıkan bir durumdur. Genellikle otoimmün veya enfeksiyöz bir süreçten kaynaklanır; bu duruma Addison hastalığı da denir. Primer AY, adrenal korteksin progresif yıkımından kaynaklanır. Klinik belirtiler en az %80 adrenal parankimin kaybedilmesi durumunda ortaya çıkar. Başlangıçta bazal kortizol salgısı normaldir ancak stres tepkisi yetersizdir. Erken aşamada herhangi bir stres steroid talebini artırarak akut adrenal krize yol açabilir. Hormon salgısı, progresif yıkıma paralel olarak azalır ve bu da klinik belirtilerin zamanla ortaya çıkmasına neden olur. Azalan

kortizol seviyeleri, melanosit uyarıcı hormon (MSH) seviyelerinin artmasına yol açar. Artan MSH, melanosit hücrelerindeki melanokortin 1 reseptörüne bağlanarak, açık pigment olan feomelanin yerine kahverengi veya siyah pigment olan eumelanin üretimini tetikler. Yeni başlayan hastalarda bu pigmentasyon değişiklikleri mevcut olmayabilir. Ayrıca, MC eksikliği su ve elektrolit dengesizliklerine ve hipotansiyona yol açar. Bez atrofisi ayrıca adrenal seks steroidlerinde eksikliğe de neden olur (13, 15).

2.6.3. Santral adrenal yetmezlik

Santral AY genel prevalansı, milyonda 150 ile 280 vaka arasında değişmektedir (13). Santral AY'in başlıca nedenleri arasında: uzun süreli glukokortikoid tedavisinin kesilmesine bağlı olarak gelişen geçici izole ACTH eksikliği; glukokortikoid tedavisi gören annelerden doğan bebeklerde CRH salınımının baskılanması; beyin hasarı (örneğin, kraniyal radyasyon, beyin tümörü, beyin kanaması, beyin cerrahisi) ve infiltratif hastalıklar (hipofizit, Langerhans hücreli histiositoz, sarkoidoz, hemokromatoz) yer almaktadır. Genetik nedenler: İzole ACTH eksikliği, TBX19 genindeki otozomal resesif mutasyonlarla ilişkilidir. Doğumsal çoklu hipofiz hormonu eksikliği ise GLI1, HESX1, LHX3, LHX4, SOX3, SOX2 ve OTX2 genlerindeki mutasyonlarla bağlantılıdır. GLI1 eksikliği holoprozensefali ve diş anormallikleri ile, HESX1 eksikliği septo-optik displazi ile, LHX3 eksikliği ise işitme kaybı ve kısa sert boyun ile ilişkilidir. SOX3 ve OTX2 genlerindeki eksiklikler anoftalmiye yol açabilir. POMC eksikliği, POMC genindeki otozomal resesif mutasyonlar nedeniyle obezite ve kıızıl saç ile ilişkilidir. Prohormon konvertaz eksikliği ise PCSK1 genindeki otozomal resesif mutasyonlardan kaynaklanır ve obezite, hipoglisemi ve hipogonadotropik hipogonadizm gibi özelliklerle ilişkilidir (5).

Santral AY, tek başına ACTH eksikliği ile sınırlı kalmayıp, diğer hipofiz hormonlarının eksiklikleri ile görülebilir. Örneğin, tiroit uyarıcı hormon, büyüme hormon, luteinizan hormon veya folikül uyarıcı hormon gibi hormonların yetersizliği, Santral AY 'e eşlik edebilir. Bu nedente, hipofiz bezinin birden fazla fonksiyonunu etkileyen yaygın bir hipopituitarizm tablosu gelişebilir (16).

2.6.4. Santral adrenal yetersizliğin klinik tablosu ve semptomları

Santral AY'in klinik tablosu, hastalığın ilerleyişine ve hormon eksikliklerinin derecesine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Bazı hastalar belirgin semptomlar göstermeyebilir ve Santral AY, tesadüfen tespit edilebilir. Bu genellikle hafif veya erken evrelerdeki hastalarda görülür (17).

Santral AY durumunda, hipofiz veya hipotalamik tümörlerin varlığı, hastalarda baş ağrısı, bulantı, kusma, görme bozuklukları, büyüme geriliği ve gecikmiş ya da erken ergenlik gibi çeşitli belirtilere yol açabilir. Bu tür tümörler, optik sinirlere baskı yaparak görme alanı kayıplarına neden olabilirken, aynı zamanda hipofizin diğer fonksiyonlarını da bozabilir. Eğer birden fazla hipofiz hormonu eksikse, bu durum " Birleşik çoklu hipofiz hormonu eksikliği " olarak adlandırılır ve klinik tablo, eksik olan hormonların sayısı ve şiddeti ile doğrudan ilişkilidir. Örneğin, bu tür hastalarda büyüme geriliği, tiroid fonksiyon bozuklukları gibi semptomlar görülebilir.

Yenidoğanlarda ACTH eksikliği, ciddi hipoglisemi ve nöbetlerle kendini gösterebilir ve bu çocuklar, yeterli glukokortikoid üretiminin olmaması nedeniyle stresle başa çıkmakta zorlanabilirler, bu da potansiyel olarak yaşamı tehdit eden komplikasyonlara yol açabilir. Çocukluk döneminde ise, büyüme geriliği Santral AY' in önde gelen belirtilerinden biridir.

Primer AY' dan farklı olarak, Santral AY'da aldosteron üretimi korunur. Bu nedenle, Primer AY' da yaygın olan hiperkalemi Santral AY'da genellikle görülmez. Aldosteron üretimi, renin-anjiyotensin sistemi tarafından düzenlendiği için, ACTH eksikliği bu hormonun üretimini etkilemez.

Santral AY' da POMC ile ilişkili peptitlerin üretiminde azalma meydana gelebilir, bu da ciltte hiperpigmentasyon yerine solukluk veya cilt renginde açılmaya neden olabilir. Adrenal androjen salgılanması da ACTH kontrolü altında olduğundan, santral adrenal yetmezliği olan bireylerde adrenal androjen eksikliğiyle birlikte pubik ve aksiller kıllanmanın azalması görülebilir.

Ek olarak, Santral AY 'de kronik yorgunluk, kilo kaybı, kas güçsüzlüğü, iştahsızlık ve hipotansiyon gibi nonspesifik semptomlar da ortaya çıkabilir. Bu semptomlar,

adrenal kortizol üretiminin yetersizliğiyle ilişkilidir ve hastaların genel yaşam kalitesini olumsuz etkileyebilir (17).

2.7. HPA ekseninin değerlendirilmesi ve dinamik testler

HPA eksenini sirkadyen ritmi gösterir. Kortizol salgısı sabahları zirveye ulaşır, bu nedenle sabah düşük kortizol seviyeleri adrenal yetersizliğinin tanısında önemli olabilir. Ancak, sabah kortizol ölçümlerinin geniş bir değişkenlik göstermesi nedeniyle, sabah serum ve tükürük kortizol seviyelerinin değerlendirilmesi, genellikle yetersiz olabilir. Bu sınırlamayı aşmak için, HPA ekseninin fonksiyonunu değerlendirmek üzere çeşitli provokatif testler geliştirilmiştir. Bu testler, HPA ekseninin farklı seviyelerini ve yanıtlarını test etmek için tasarlanmıştır (18).

Dinamik test kullanılırsa, steroid ölçümlerinde interferansı önlemek için herhangi bir glukokortikoid tedavisini en az 24 saat bekllettikten sonra yapılmalıdır (19).

2.7.1. İnsülin tolerans testi

İnsülin stres testi (ITT), bazıları tarafından hem HPA ekseninin rezervinin değerlendirilmesi için altın standart olarak kabul edilmektedir.

Test sabahı hastalara intravenöz bolus olarak çözünür insülin (0.1 IU/kg) uygulanır. Hipoglisemi sağlanana kadar (kan şekeri <2 mmol/L, 40 mg/dL) glukoz düzeyleri her 5 dakikada bir ölçülür. Kortizol düzeyleri, 0., 30., 60., 90. ve 120. dakikalarda alınan kan örnekleri ile ölçülür. İki ardışık kan şekeri ölçümünün 2 mmol/L veya altında olması durumunda, normoglisemi sağlamak amacıyla 50 g oral glukoz verilir. Biyokimyasal hipoglisemi (<2.2 mmol/L) (<40 mg/dL) sağlanamayan hastalarda test, ertesi gün artmış insülin dozu ile tekrar yapılır (5, 14, 17, 20).

ITT'ye uygun kortizol yanıtı, maksimum plazma kortizol seviyesinin 500 nmol/L'nin (>18 µg/dL) üzerinde olması ve semptomatik hipogliseminin (<2.2 mmol/L) (<40 mg/dL) görülmesi ile tanımlanır (20, 21).

Test rahatsız edici olup, riskleri de vardır. Bilinç kaybı, nöbetler, dirençli hipoglisemi, glukoz infüzyonuna bağlı olarak hipokalemi, miyokard enfarktüsü ve ölüm bu testin bilinen komplikasyonlarından. Bu nedenle, mutlaka deneyimli hekimlerin gözetiminde ve deneyimli merkezlerde yapılması uygundur. Ayrıca, çocuklarda uygulanması zor ve genellikle tercih edilmez. Test, genellikle tanısı daha basit yöntemlerle konulamayan hastalarda kullanılmaktadır (5, 13, 14, 17).

2.7.2. Metirapon stimülasyon testi

Bu test genellikle adrenal yetersizlik veya Cushing sendromu gibi durumların teşhisinde kullanılır. Metirapon, kortizol sentezini azaltan bir 11-hidroksilaz inhibitörüdür ve adrenal bezlerde kortizol üretimini geçici olarak baskılayarak ACTH salınımı üzerindeki negatif geri bildirimini kaldırır. Amaç vücudun kortizol kapasitesini ve hipofiz bezi ile adrenal bezlerin yanıtını değerlendirmektir (5, 22).

Metirapon testi, genellikle Santral AY şüphesi olan ve ACTH stimülasyon testinde normal sonuçlar gösteren hastalarda tercih edilmektedir. Ancak, metiraponun bulunabilirliği sınırlı olup, aynı zamanda adrenal krize neden olma riski taşıdığı için bu testin kullanımı zor olabilir. Ayrıca, metirapon dünya genelinde (örneğin, ABD'de) mevcut değildir ve Endokrin Derneği'nin kılavuzlarında hipopituitarizm için metirapon testi yer almamaktadır. Türkiye'de de metirapon testi tercih edilmemektedir. Bu nedenle, metirapon testinin Santral AY teşhisindeki rolünü değerlendirmek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir (14).

2.7.3. Glukagon stimülasyon testi

Bu test iskemik kalp hastalığı veya epilepsisi olan ve ITT'nin yapılamadığı hastalarda alternatif olarak geliştirilmiştir. Glukagon stimülasyon testi (GST), 30 µg/kg'ye kadar olan dozlarda i.m. glukagon uygulamasıyla, her 30 dakikada bir 180 dakika süresince kortizol ölçümleri yapılmasını içerir. Testte kortizol değerinin >16-18 µg/dL olması normal kabul edilmektedir (5, 17, 22).

2.7.4. ACTH Stimülasyon Testi

ACTH stimülasyon testi, adrenal yetmezliği değerlendirmek için en sık kullanılan tanı testidir. Bu testte, sentetik kosintropin veya tetracosactrin olarak bilinen ACTH 1-24 kullanılarak adrenal bezlerin uyarılması sağlanır. Kosintropin, adrenal korteksin kortizol üretim kapasitesini ölçmek amacıyla uygulanır. (18) Yüksek doz ACTH stimülasyon testi (Standard doz test veya HDT), genellikle açlık şartı olmadan uygulanır, ancak sıklıkla açlık ve sabah saatleri tercih edilir. Testte, 250 µg ACTH intravenöz (IV) yoluyla uygulanır; ardından kortizol düzeyleri, uygulamadan önce ve 30-60 dakika sonra ölçülür. HDT, adrenal bezleri uyararak için yeterli olan yüksek dozda ACTH dozlarını kullanır, böylece yanlış negatif sonuçlara yol açar.

Düşük doz ACTH stimülasyon testi (LDT) (1 µg) bu endişeye uygun bir çözüm olduğu düşünülmektedir. LDT, 2 yaşından büyük çocuklarda daha duyarlı bir birinci basamak test olarak tanıtılmıştır (5).

1 µg dozun adrenal yanıtı indüklemek için en düşük doz olduğu bilinmektedir, çünkü 0,6 veya 0,8 µg, sağlıklı kontrol grubunda kortizol seviyelerini artıramamıştır (14).

Avrupa Endokrinoloji Derneği (EES) ve Endokrin Derneği Ortak Klinik Kılavuzu'na (ESCCG) göre, primer ve santral adrenal yetmezikte, teste bağlı olarak 30 veya 60 dakikada tepe kortizol seviyesinin <500 nmol/L (<18.1 µg/dL) olması, adrenal yetmezliğin göstergesi olarak kabul edilir (19).

Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği Adrenal ve Gonadal Hastalıklar Kılavuzu'na göre ACTH stimülasyon testlerinde, kortizol düzeyinin herhangi bir anda 18-20 µg/dL'nin üzerinde olması genellikle yeterli bir yanıt olarak kabul edilir. Bununla birlikte, bazı çalışmalar, en az 7 µg/dL'lik bir artış veya başlangıç değerinin iki katı kadar bir artışın beklenmesi gerektiğine dair veriler sunmaktadır (22).

Bazı yazarlar, 30 dakikada LDT için maksimum yanıtın elde edildiğini ve ardından kortizol seviyelerinin azalmaya başladığını bildirmişlerdir. Ancak, SDT kullanıldığında hem sağlıklı kontrollerde hem de bilinen bozulmuş HPA eksenini olan hastalarda, 30 ile 60 dakika arasında hala belirli bir kortizol artışı gözlemlenmiştir (14).

Düşük doz testi, standart yüksek doz testine göre avantajlara sahip olabilir. Özellikle, yakın zamanda başlayan ACTH yetmezliği (sekonder adrenal yetmezlik) ve kronik kısmi hipofiz ACTH yetmezliği gibi durumlar için düşük doz testi tercih edilebilir.

Düşük doz kortikotropin uyarım testinin, santral adrenal yetersizliğin tanısında yüksek doz testine göre daha yüksek hassasiyet sağladığı gösterilmiştir (23).

Ayrıca, düşük konsantrasyonlu çözeltinin seyreltilmesi ve saklanması kritik öneme sahiptir. Ancak, seyreltilmiş tetrakosaktidin (%0,9 tuzlu suda 1 µg/mL) 2–8°C sıcaklıkta 60 gün süreyle stabil olduğu rapor edilmiştir (24).

1 µg sinachten stimülasyon testi için bildirilen en fazla 10 seyreltme yöntemi bulunmaktadır, bu da doz varyasyonuna (0.8 µg'ye kadar) ve dolayısıyla yanlış sonuçlara, potansiyel olarak önemli klinik sonuçlara neden olabilir (14).

HPA eksenini değerlendirmek için kullanılan mevcut testler genellikle serumda total kortizol düzeylerine odaklanır. Ancak, doku yanıtı için kritik öneme sahip serbest kortizol düzeylerinin ölçümü çoğu testte göz ardı edilmektedir. Bu durum, HPA ekseninin işlevsel kapasitesini değerlendirmede tanısal doğruluğun sınırlı kalmasına yol açabilir. Bu nedenle, HPA ekseninin işlevini daha doğru ve kapsamlı bir şekilde belirleyebilecek daha güvenilir ve hassas testlere ihtiyaç duyulmaktadır (11).

2.8. Santral adrenal yetmezliğin tedavisi

Santral adrenal yetmezlik tanısı almış hastalar ömür boyu GC yerine koyma tedavisi almalıdır ve bu tedavinin temel amacı, sirkadiyen kortizol ritmini mümkün olduğunca taklit etmektir. Ancak mevcut oral GC formülasyonları, bu ritmi fizyolojik olarak yeterince taklit edememektedir. Bu nedenle, tedaviye rağmen hastaların tam iyilik hali genellikle sağlanamaz ve yaşam beklentisi azalabilir (25).

Son araştırmalar, günlük kortizol üretim hızının vücut yüzey alanı başına 5-10 mg olduğunu gösterdi, bu da önceki tahminlerden daha düşüktür. Geleneksel olarak 30 mg/gün olarak belirlenen hidrokortizon (HC) dozu, bu bulgular ışığında suprafizyolojik bulunmuştur. 25 mg/gün' den fazla HC kullanımı, özellikle

kardiyovasküler hastalık riskini artırarak %44'e varan artmış mortaliteyle ilişkilendirilmiştir. Non-fonksiyonel hipofiz adenomu olan Santral AY hastalarında, 20 mg/gün'den fazla HC kullanımı da artmış mortalite riskine neden olmuştur. Kısa yarı ömürlü GC'ler (HC ve kortizon asetat) adrenal yetmezlik tedavisinde genellikle daha uzun yarı ömürlü GC'lere (prednizolon, deksametazon) tercih edilir.

Son zamanlarda geliştirilen çift salınlı HC preparatları, santral adrenal yetmezlik anısı almış hastalarda tedaviyi iyileştirerek sirkadiyen kortizol ritmine daha yakın bir serum profili sağlamaktadır. Primer adrenal yetmezlikte, bu yeni formülasyonlar glukoz metabolizmasını iyileştirir, kardiyovasküler risk faktörlerini (kilo, bel çevresi, kan basıncı, kolesterol) düzeltir ve tekrarlayan enfeksiyonları azaltır. Ancak, santral adrenal yetmezlik durumunda metabolik parametreleri iyileştirmek için çift salınlı HC kullanımını destekleyen yeterli veri henüz bulunmamaktadır (14).

2.9. TÜKÜRÜK

Tükürük, genellikle göz ardı edilen ancak hayati öneme sahip bir vücut sıvısıdır. Mandel (1990), tükürüğün, kanın dramatik etkisi, terin içten doğası ve gözyaşlarının duygusal cazibesine kıyasla daha mütevazı bir vücut sıvısı olarak görüldüğünü, ancak çok yönlü işlevleri sayesinde vazgeçilmez bir biyolojik role sahip olduğunu ifade etmiştir (26).

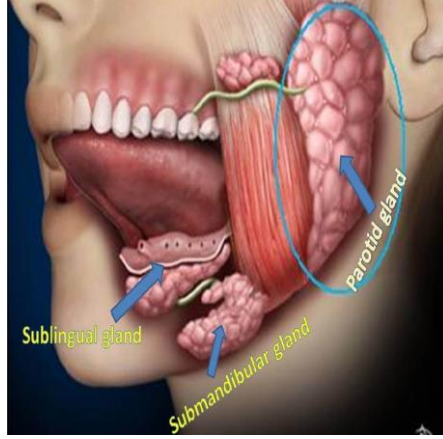
2.9.1. Tükürük sentezi ve regülasyonu

Tükürük bezleri üç ana çiftten oluşur: parotis, submandibular ve sublingual. Ayrıca, ağızda dudak, yanak, damak, dil ve retromolar bölgelerde bulunan 600 ila 1000 küçük tükürük bezi de vardır. Tükürük, bu büyük ve küçük bezlerden gelen salgılar ile dişeti sıvılarından oluşur ve bu birleşim, tükürüğün kapsamlı işlevsel özelliklerini sağlar (27).

Tükürük bezleri, nöral sistem ve gastrointestinal hormonlar tarafından düzenlenir ve tükürük akışı, bezlerin farklı türdeki uyarılara bağlı olarak değişir.

Tükürüğün işlevleri arasında dişleri koruma, konuşma, çiğneme yardımı, sindirim ve dengeli bir mikrobiota sağlama bulunur.

Tükürüğün kıvamı, bezlerin türüne göre farklılık gösterir. Parotis bezinden salgılanan tükürük daha ince ve sıvı haldeyken, submandibular ve sublingual bezlerden ile küçük mukozal bezlerden gelen tükürük, glikoproteinler açısından zengin olduğu için daha yoğun ve yapışkan olur (27).



Şekil 2.8. Tükürük bezleri

2.9.2. Parotis bezi

Parotis bezleri vücuttaki en büyük tükürük bezleridir ve kulakların önünde, mandibula ramusunun arkasında yer alırlar. Parotis bezinin sekresyonları ağız boşluğuna Stensen kanalı aracılığıyla ulaşır ve bu kanal, üst ikinci molar dişin hizasında ağız içine açılır. Parotis bezlerinden salgılanan tükürük seroz özelliindedir (27).

2.9.3. Submandibular bezi

Submandibular bez, parotis bezinin yaklaşık yarısı kadar büyüktür ve mandibulanın alt kısmında yer alır Her bezden çıkan Wharton kanalı, ağzın alt kısmından geçer ve dilin ön kısmının altına açılır. Salgısı, mukozal ve seroz sıvıların karışımından oluşur (27).

2.9.4. Sublingual bezi

Sublingual bez, büyük tükürük bezlerinin en küçüğüdür ve dilin ön kısmının altında bulunur. Sublingual bezden 8-20 küçük kanal ağız içine açılır ve bu kanallardan bazıları submandibular bezin kanalıyla birleşir. Sublingual bezin bazı salgıları

Wharton kanalı aracılığıyla, geri kalanları ise dilin altındaki Bartholin kanalları aracılığıyla ağız boşluğuna ulaşır. Bu bez genellikle mukozal salgılar üretir (26).

2.9.5. Küçük tükürük bezleri

Küçük tükürük bezleri, ağız içinde yaygın olarak bulunur ve birkaç türü vardır. Bukkal ve labial bezler hem mukozal hem de seroz sıvılar üretir. Palatal ve palatoglossal bezler sadece mukozal sıvı üretir. Lingual bezler de mukozaldır, ancak Von Ebner bezleri seroz sıvı üretir ve dilin arka tarafındaki papillaların çevresindedir (27).

2.9.6. Tükürük oluşumu

Tükürük, tükürük bezlerinde seroz ve mukozal hücrelerin farklı sıvılar üretmesiyle oluşur. Bu sıvılar kandan başlar, bezlerin içinde değişir ve sonunda ağız içine salınır. Tükürük kanalları sıvının içeriğini değiştirir ve hipotonik hale getirir (27).

2.9.7. Tükürük bileşenleri, pH değeri ve üretim oranları

Tükürük %99 su içerir ve sodyum, potasyum, kalsiyum, magnezyum, bikarbonat [HCO_3^-], fosfatlar, immünoglobülinler, proteinler, enzimler, mukinler, üre ve amonyak gibi bileşenler içerir. Normal pH'ı 6-7 arasında değişir, düşük akışta 5,3 ve yüksek akışta 7,8'e kadar çıkabilir. Günlük tükürük üretimi yaklaşık 0,6 litre civarındadır. Uyarılma durumunda, parotis bezlerinin katkısı %50-70'e çıkar ve bu değişim tükürüğün bileşimini etkiler (26, 28).

2.9.8. Tükürük Bezlerinin Sinirsel Düzenlenmesi

Tükürük salınımı, genellikle tat ve çiğneme gibi uyarılarla tetiklenir ve sinir sistemi aracılığıyla tükürük bezlerine iletilir. Bu süreç, G-protein bağlı reseptörler üzerinden düzenlenir. Tat ve çiğneme başlıca tetikleyiciler olsa da yiyeceklerin görünüşü, kokusu ve düşünülmesi gibi faktörler de salınımı etkileyebilir.

Parasempatik sinirler, yüz siniri (VII. kranial sinir) ve glossopharyngeal sinir (IX. kranial sinir) aracılığıyla tükürük bezlerine sinyaller gönderir. Bu sinyaller, submandibular ve otik ganglionlar üzerinden asinar hücrelerde asetilkolin (ACh) salgısını tetikler, bu da tükürük üretimini artırarak salınımı teşvik eder.

Sempatik sinirler ise spinal korddan köken alarak servikal ganglionlarda sinaps yapar ve norepinefrin salgısını uyarır. Norepinefrin, tükürüğün daha az su ve daha fazla protein ya da enzim içeren bir formda olmasını sağlar, bu da tükürük bezlerinin fonksiyonlarını düzenler (27).

2.10. Tükürük kortizol ölçümü

Tükürük kortizolü ilk olarak 1978 yılında doğrudan radyoimmunoassay yöntemi ile ölçülmüştür. Bu amaçla otomatik serum kortizol immünoassayları uyarlanmış olsa da, yüksek kortizon konsantrasyonları nedeniyle antikör çapraz reaksiyonları özgüllük açısından sınırlamalara yol açmaktadır. Ayrıca, geç gece tükürük kortizol seviyeleri genellikle ölçüm limitlerine yakın veya altında olabilir, bu da testin hassasiyetini etkileyebilir. 2003 yılında, tükürük kortizol ölçümü için ilk kez LC-MS/MS testi tanıtılmıştır ve bu yöntem, mevcut yöntemlere kıyasla daha iyi bir özgüllük sağlamıştır. O zamandan beri, LC-MS/MS'nin hızlı ve yüksek verimli hizmet sağlama kapasitesi önemli ölçüde artırılmıştır ve birçok başarılı test geliştirilmiştir. Ancak, tükürük kortizol ölçümünün yaygın kullanımı, standartlaşmamış testler ve geçerli referans aralıklarının eksikliği nedeniyle hala sınırlıdır (27).

2.10.1. Tükürük kortizol ölçümünün avantajları

Tükürük örneklerinde kortizol ölçümü stres olmadan toplanabilmesi nedeniyle özellikle avantajlıdır. Bu yöntem, örnek toplama sürecinin kolaylığı, damar delme ile ilişkili stresten kaçınma gibi önemli avantajlar sunar (29).

Tükürük kortizolü, serum albümini ve CBG'nin tükürük hücrelerinin zarından geçemeyecek kadar büyük olması nedeniyle biyolojik olarak aktif serbest kortizol seviyelerini yansıtır. Tükürük kortizolü ayrıca 24 saatlik süre boyunca serum serbest kortizol ile yakından ilişkilidir, bu da tükürük kortizol testlerinin sirkadiyen ritmi değerlendirmek için kullanılabileceğini gösterir (30,31).

Tükürük kortizolü, 1980'lerden beri adrenal fonksiyonu değerlendirmek için kullanılmaktadır. Geç saatlerde tükürük kortizol ölçümleri artık Cushing sendromunu

teşhis etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna karşılık, tükürük kortizolünün AY için kullanımı daha az yaygındır (32).

2.10.2. Tükürük kortizol testlerinde toplama yöntemlerinin rolü

Tükürük toplama tekniği, tükürük kortizol testlerindeki farklılıklara katkıda bulunabilir. Tükürük genellikle pasif damlama veya emici pamuklu pedlerle (örneğin, Sarstedt Salivette) toplanır. Pamuklu pedlerden kortizol kurtarma miktarı, diğer toplama yöntemlerinden farklı olabilir, bu nedenle toplama tekniği test sonuçlarını etkileyebilir. Testlerin geliştirilmesi sırasında toplama cihazının değerlendirilmesi önemlidir. Örnek toplama sırasında kan kontaminasyonu ve sigara içme, yanlış yüksek kortizol konsantrasyonlarına yol açabilir. Bu nedenle, pembe tükürüklerin analizinden kaçınılmalı ve çoğu yazar, tükürüğü yemek, içmek veya diş fırçalamadan en az 30 dakika sonra toplamayı önerir, ancak bu yaklaşımı destekleyen kanıtlar sınırlıdır (10).

2.10.3. Tükürük kortizol ölçümünün serum kortizol ölçümlerine göre avantajları

- Hastalar örnekleme evde kendi başlarına yapabilirler.
- Test, plazma proteinlerindeki değişikliklerden etkilenmez. Taşıyıcı proteinlerin anormal seviyelerinin serum kortizol seviyelerinin yorumlanmasını zorlaştırdığı durumlarda bu test uygun olabilir (13).
- Tükürükte kortizol ölçümü, strese neden olmaması ve non-invaziv olması adrenal fonksiyonun değerlendirilmesi için pediatrik yaş grubunda önceliklidir.

2.10.4. Tükürük kortizol ölçümünde çapraz reaktivite ve LC-MS/MS

Tükürükteki çok düşük kortizol düzeylerinin belirlenmesinde başlıca kısıtlama, immün analizlerde eksojen glukokortikoidler ve endojen kortizol öncüleri ile metabolitlerinin çapraz reaktivitesidir. LC-MS/MS, ilgili steroidler tarafından meydana gelen çapraz reaktiviteyi ortadan kaldırmak için gereken özgüllüğü sağlar.

LC-MS/MS ile tükürük kortizol ölçümlerine dair raporlar olmasına rağmen, bunun HPA eksenini endokrin uyarı testlerinde kullanımını henüz yaygın değildir (30).

Kortizol ölçümünde ana sorunlardan biri, sabahları hem serum hem de tükürükte kortizol düzeylerinde geniş değişkenliktir. Bu nedenle, HPA eksenini yetersizliği şüphesi varsa, bazı yazarlar bazal kortizol konsantrasyonlarını ölçmek yerine Sinachten testini önermektedir (11).

2.11. Kütle Spektrometresi

Kütle spektrometresi, 1912'de Sir J.J. Thomson'ın ilk kütle spektrometresini geliştirmesiyle başlamıştır. Thomson, bu ilk cihazla oksijen, azot ve karbon gibi türlere ait kütle spektrumları elde etmiştir. Bu tarihten itibaren birçok kütle spektrometresi geliştirilmiş ve günümüzdeki cihazlar farklı enstrümantasyon konfigürasyonlarına sahip olarak çeşitlenmiştir (33).

Kütle spektrometresi (MS) yöntemi, örneğin buharlaştırılarak gaz fazına geçirilmesi, ardından iyonize edilmesi ve oluşan iyonların kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılması prensiplerine dayanır. MS, özellikle karmaşık karışımların karakterizasyonunda ve ultra düşük konsantrasyonlardaki bileşiklerin tespitinde olağanüstü hassasiyet ve seçicilik sunar. Cihaz, numune giriş sistemi, iyon kaynağı, vakum sistemi, kütle analizörü, dedektör ve bilgisayar gibi birbiriyle uyumlu bileşenlerden oluşur ve elde edilen spektrum verileri kapsamlı analizler için kullanılır.

2.11.1. Numune girişi

İğne, örneği taşımak için merkezi bir kanala sahiptir. Bu kanal, sıvıyı sıvı kromatografisinden alıp, kütle spektrometresi iyonizasyon kaynağına iletir.

2.11.2. İyon kaynağı

MS sistemine giren numune moleküllerine ilk olarak iyonlaştırma işlemi uygulanır; yani, iyon kaynağında iyonlar üretilir. İyonlaştırma basamağında molekülün fiziksel

özelliklerine ve iyonlaşma enerjisine bağlı olarak farklı iyonlaştırma teknikleri uygulanabilir. İyonlaştırma sırasında hem pozitif hem de negatif yüklü iyonlar oluşmakta ancak pozitif olanlar çoğunlukta olup analitik tekniklerde her ikisi de kullanılmaktadır.

MS' de kullanılan çeşitli iyonizasyon teknikleri vardır: elektron iyonizasyon (EI), kimyasal iyonizasyon (CI), elektro sprey iyonlaştırması (ESI), matriks yardımcı desorbsiyon iyonlaştırma (MALDI), atmosferik basınç iyonizasyonu (API), atmosferik basınç kimyasal iyonizasyonu (APCI), atmosferik basınç foto-iyonizasyon (APPI) teknikleridir (33).

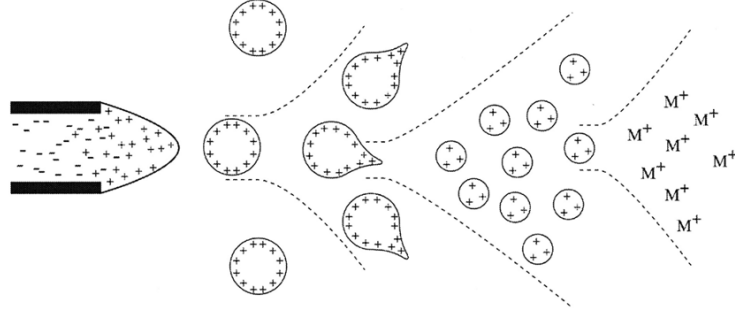
2.11.2.1. Elektrosprey iyonlaştırması

Elektrosprey İyonizasyonu (ESI), 1980'lerin ortalarında Fenngrup tarafından geliştirilmiş ve sonrasında çeşitli araştırma grupları tarafından sistemin sağlamlığını artıracak şekilde modifiye edilmiştir. Atmosferik basınçta iyonizasyon sağladığı için, ESI, atmosferik basınç iyonizasyonu (API) olarak da adlandırılır. ESI, analiz edilen moleküllerin çözeltiden kütle spektrometresine minimum parçalanma ile transfer edilmesini sağlar.

Sıvı örnek, kapiller iğne aracılığıyla cihazın giriş noktasına iletilir. Paslanmaz çelikten yapılan bu iğne, yaklaşık 4000 voltluk sabit bir voltajla çevrilidir; bu voltaj damlacıkları iyonlaştırır ve çıkan partiküller yüklü moleküler iyonlara dönüşür. Uygulanan yüksek voltaj, sıvıyı küçük, yüklü damlacıklara dönüştürür ve bu damlacıklar kapiler iğne ucu tarafından püskürtülür. Püskürme sırasında damlacıklar havada çözücünün buharlaşması ve çevre sıcaklığı nedeniyle küçülür ve yük yoğunluğu artar. Artan yük yoğunluğu Coulomb patlamasına neden olarak damlacıkların daha küçük parçalara ayrılmasını sağlar. Sonuç olarak, iyonize olmuş moleküller gaz fazına geçer ve serbest kalır (34, 35, 36).

ESI, özellikle polar bileşenlerin ve çözeltideki iyonların hassas bir şekilde iyonize edilmesini sağlar. Klinik kütle spektrometrisinde geniş bir kullanım alanına sahiptir ve büyük molekülleri (örneğin, 1000 Da'dan büyük) analiz etmek için çeşitli türlerde

yüklü iyonlar üretebilir. Ancak, APCI'ye göre matris etkilerine, yani diğer bileşenlerin iyonlaşmayı etkileyebilmesine, daha duyarlı olabilir (37).



Şekil 2.9. Elektrosprey iyonizasyon mekanizması.

2.11.2.2. Nanoelektrosprey İyonizasyonu (NanoESI)

NanoESI, elektrosprey tekniğinin bir uzantısı olarak geliştirilmiş ve 1996 yılında Wilm ve Mann tarafından tanımlanmıştır. Bu yöntem, çok küçük çaplı açıklıklar kullanarak 1-2 μm çapında yüklü damlacıklar üretir. Sıvı numune, çok düşük bir akış hızında bir kapiller uçtan geçirilir, bu da çözeltinin çok küçük damlacıklar haline gelmesini sağlar. Bu damlacıklar, bir elektriksel alan altında iyonize edilir.

NanoESI'nin tercih edilmesinin başlıca nedenleri arasında yüksek iyonizasyon verimliliği, numunede parçalanma olmaması ve büyük moleküllerin etkili bir şekilde iyonize edilmesi yer alır. Ayrıca, düşük akış hızları kullanarak numune tüketimini azaltır ve hassas analizlere olanak sağlar (38).

2.11.2.3. Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyonu

APCI (Atmosferik Basınç Kimyasal İyonizasyonu), Sıvı Kromatografi sisteminden gelen "elüent" in aerosolünü oluşturmak için ısı ve bir nebulizasyon gazı kullanır. ESI'nin aksine, iyonlar çözeltide veya sıvı fazında değil, gaz fazında oluşturulur. Bu, aerosol içindeki çözücü moleküllerini ve analiz edilen bileşenleri

iyonize etmek için yüksek voltaj uygulanan bir korona deşarjı (bir iğne) kullanılarak gerçekleştirilir.

Sıvı örnek, ilk olarak ince bir akış halinde ısıtılmış bir iğne aracılığıyla püskürtülür. Bu iğne genellikle 400°C veya daha yüksek sıcaklıklarda çalışır, bu da sıvının buharlaşmasını sağlar. Buharlaşan örnek, gaz fazına geçer ve APCI iyonizasyon bölmesine girer. Burada, yüksek voltaj altında çalışan korona iğnesi çevredeki gaz moleküllerini (genellikle hava veya azot) iyonlaştırır. Bu işlem, gaz moleküllerini pozitif yüklü iyonlara veya serbest radikallere dönüştürür. İğne tarafından üretilen bu reaktif iyonlar, genellikle H_3O^+ (hidronyum iyonu), N_2^+ (azot iyonu) ve O_2^+ (oksijen iyonu) gibi türlerdir. Bu iyonlar, buharlaşmış analit molekülleriyle çarpışarak protonasyon adı verilen bir reaksiyonla analit molekülüne bir proton (H^+) verir. Bu şekilde analit, pozitif yüklü bir iyon haline gelir ve $[M+H]^+$ olarak iyonize olur. İyonize edilmiş analit molekülleri daha sonra kütle spektrometresi tarafından analiz edilir.

APCI, özellikle polar olmayan metabolitlerin iyonizasyonu için uygundur. Bu yöntemin kullanıldığı klasik örnekler arasında fosfolipitler, yağ asitleri, steroller, steroidler, bazı esterler ve uçucu yağlar gibi bileşiklerin analizi yer alır. APCI, genellikle ESI'ye kıyasla matris etkilerine (iyon baskılama dahil) daha az duyarlıdır ve az polar bileşenler için daha iyi hassasiyet sağlayabilir. Ancak, APCI'nin bazı sınırlamaları da vardır: Genellikle yalnızca tek yüklenmiş iyonlar oluşur, bu da analiz edilebilecek kütle aralığını sınırlar. Ayrıca, termal olarak hassas bileşenler için uygun olmayabilir ve ESI'ye göre genellikle daha düşük sinyal verir (37).

2.11.2.4. Matriks yardımcı desorbsiyon iyonlaştırma (MALDI)

Lazer ışını kullanarak numunelerin iyonize edilmesini sağlayan bir kütle spektrometresi tekniğidir. Bu yöntemde, numune molekülleri UV ışığını emen bir matris malzemesi ile karıştırılır. Matris, numune moleküllerinden çok daha fazla bulunur ve karışım, küçük damlacıklar halinde hedef plakaya uygulanarak kurutulur. Kurutma sonrası sıvı buharlaşır ve matris içinde gömülü numune molekülleri kalır. Katı çözeltilinin büyük parçaları, vakum altında yoğun lazer darbeleri ile hedef alınır.

Lazer ışını, matris moleküllerini uyararak ısı birikimine yol açar ve bu da analit moleküllerinin iyonlaşmasını sağlar. Vakum altında gerçekleşen bu süreçte oluşan iyonlar, kütle analizörüne doğru hızlandırılır.

MALDI, 300.000 Da'ya kadar olan büyük biyomoleküllerin (örneğin, proteinler ve DNA) analizinde etkili bir yöntemdir (33).

2.11.2.5. Elektron iyonizasyonu

Elektron iyonizasyonu (EI) tekniği, Dempster tarafından 1918-1921 yılları arasında geliştirilmiş ve "elektron darbesi" olarak adlandırılmıştır. Daha sonra Bleakney, Winn ve Nier bu yöntemi iyileştirmiştir (39).

EI yöntemi, numunenin gaz fazında bulunmasını ve yüksek enerjili elektronlarla iyonizasyonunu gerektirir. İlk olarak, numune ısıtılarak gaz fazına geçirilir. Ardından, vakum altında yaklaşık 70 eV enerjili elektronlarla çarpıştırılır. Bu yüksek enerjili elektronlar, hedef moleküllerle çarpışarak onların iyonizasyonunu başlatır. EI yöntemi genellikle 10^{-5} torr vakum altında çalışır ve neredeyse tüm uçucu bileşiklerin analizinde kullanılabilir.

Avantajları arasında yüksek hassasiyet ve sağlam tekrarlanabilirlik ile büyük kütüphanelerle hızlı ve güvenilir bileşen tanımlaması bulunur. Ancak, bazı bileşiklerde moleküler iyonlar zayıf olabilir; yöntem sadece termal olarak kararlı ve uçucu moleküller için uygundur. Ayrıca, karmaşık spektrumlar ve düşük kütle aralığı (<1.000 Da) nedeniyle detaylı bilgi sağlamak zor olabilir (40).

2.11.2.6. Kimyasal iyonizasyon

CI, kütle spektrometrisinde numunelerin iyonlaştırılmasında kullanılan ve kimyasal etkileşimlere dayanan bir yöntemdir. Bu teknik, iyonların düşük enerjiyle üretilmesini sağlayarak numunelerin daha az parçalanmasını hedefler. Yani, CI yöntemiyle oluşturulan iyonlar, elektron iyonizasyonunda olduğu gibi yüksek enerjiye sahip değildir. Bu düşük enerji, moleküllerin parçalanmasını azaltır ve moleküler yapının daha iyi korunmasına yardımcı olur, böylece spektrumda moleküler türler daha net bir

şekilde tanımlanabilir. Munson ve Field tarafından geliştirilen bu teknik, başlangıçta hidrokarbonlar ve petrokimyasallar üzerinde uygulanmıştır (33). Bu yöntemde, numuneyi iyonize etmek için reaktif gazlar kullanılır; yaygın olarak metan (CH₄), amonyak (NH₃) ve isopropanol (C₃H₇OH) gibi gazlar tercih edilir (41).

CI süreci, öncelikle reaktif gazların iyonlaştırılması ile başlar. Bu gazlar, elektriksel boşaltma veya diğer enerji kaynakları yardımıyla iyonize edilir. Bu iyonizasyon genellikle elektron çarpmasıyla gerçekleştirilir ve CH₅⁺ gibi kararlı iyonlar oluşur. Bu iyonlar, numunedeki moleküllerle kimyasal reaksiyona girer ve yeni iyonlar oluşturur. İyonize reaktif gaz (örneğin CH₅⁺), numune molekülleriyle etkileşime girerek MH⁺ gibi iyonlar üretir. Reaksiyonlar genellikle proton transferi veya elektron transferi yoluyla gerçekleşir, böylece numunedeki moleküller iyonize olup kütle spektrometrisine yönlendirilir (41).

CI (Kimyasal İyonizasyon) kaynakları, EI (Elektron İyonizasyonu) kaynaklarından daha yüksek bir basınçta (yaklaşık 1 Torr) çalışır, bu da iyon-molekül çarpışmalarını artırır ve iyonizasyon verimliliğini yükseltir. Ayrıca, CI' de kullanılan elektron enerjisi, EI' deki tipik 70 eV'nin üzerine çıkarak 500-1000 eV aralığına ulaşır, bu da iyon kaynağı kutusunun merkezine daha derin nüfuz edilmesini sağlar (33).

Kimyasal iyonlaşmanın (CI) başlıca avantajları arasında yüksek seçicilik, düşük kütle kaybı ve yüksek duyarlılık bulunur. Düşük kütle kaybı, spektrumda moleküler iyonların daha belirgin olmasını sağlar. Yüksek duyarlılık ise reaktif gazların numune ile etkileşiminden doğan iyonlaşma verimliliğini artırır.

2.11.2.7. Atmosferik basınç fotoiyonizasyonu (APPI)

APPI'nin teknik kurulumu, bir ısıtılmış nebülizör ve iyonizasyonu sağlamak için UV ışığı kullanan bir lambadan oluşur. Bu sistem, analitik sıvıyı püskürtüp buharlaştırarak bileşenlerin analizini gerçekleştirir. UV lambası, hedef molekülleri iyonize ederek analizi sağlar. APPI, özellikle düşük uçuculuğa sahip ve polar olmayan bileşenlerin etkili analizini yapma kapasitesine sahiptir.

Ancak, APPI'nin bazı sınırlamaları vardır. Diğer iyonizasyon yöntemlerine göre daha düşük duyarlılık gösterebilir, bu da düşük konsantrasyonlu analitlerin tespitini

zorlaştırabilir. Ayrıca, yüksek uçuculuğa sahip veya çok polar bileşiklerin analizi için sınırlı bir uygulama alanına sahiptir (37).

2.11.3. Vakum sistemi

Tüm MS çeşitlerinde bulunan üç ana bileşen, bir iyonizasyon kaynağı, bir kütle analizörü ve bir dedektördür; bu üç bileşen, iyonların analizöre ve dedektöre iletimini optimize etmek için vakum altında tutulur.

İyonizasyon işlemi tamamlandığında, oluşan iyonlar vakumlu ortama yönlendirilir. İyonlar, kütle analizörüne ve dedektöre ulaşabilmek için genellikle düşük basınçlı bir ortamda taşınır.

Kütle analizörü ve dedektör genellikle vakum altında çalışır çünkü düşük basınç, iyonların daha düzgün ve kesintisiz bir şekilde hareket etmesini sağlar ve çarpışma oranlarını azaltır.

Vakum sistemi, cihazın hassasiyetini ve doğruluğunu artırmak için kritik bir bileşendir. Vakumun temel amacı, iyonların analiz süreçlerinde engellenmeden hareket edebilmesi için gaz moleküllerinin sayısını minimize etmektir. Yüksek vakum, iyonların analiz süresince başka gaz molekülleriyle çarpışmasını önler, bu da sonuçların tekrarlanabilir ve güvenilir olmasını sağlar.

MS cihazında kullanılan vakum sistemi genellikle iki kademelidir:

1. Rotary Pompa: Bu pompa ilk adımda vakumu sağlar ve sistemi başlangıçta atmosfer basıncından yaklaşık 10^{-3} - 10^{-4} torr mertebesine kadar düşürür. Rotary pompa, hava ve diğer gazları sistemden çıkararak daha düşük bir basınca ulaşılmasını sağlar.
2. Turbomoleküler Pompa: Rotary pompanın sağladığı vakumu daha da derinleştirerek 10^{-6} - 10^{-7} torr seviyelerine kadar düşürür. Bu pompa, çok yüksek hızda dönen rotorlar kullanarak gaz moleküllerini daha da etkili bir şekilde dışarı atar. Bu düşük basınç seviyesi, iyonların dedektöre kadar kesintisiz bir şekilde ulaşmasına olanak tanır.

2.11.4. Kütle analizörü

Kütle analizörü iyon kaynağı içerisinde oluşturulan iyonların elektrik alan etkisiyle zaman veya alan içindeki m/z oranlarına göre ayrıldığı kısım olup kütle spektrometrelerinin temel bileşenidir. En çok kullanılan kütle analizörleri magnetik sektörlü, uçuş zamanlı (TOF), quadrapol (Q), Tandem MS/MS ve iyon tuzaklı kütle analizörüdür.

2.11.4.1. Magnetik sektörlü kütle analizörü

Manyetik sektör kütle analizörü, iyonları bir manyetik alan içinde dönel bir yol boyunca yönlendirir. İyonların hareket yolu, kütle/yük oranlarına bağlı olarak değişir, bu nedenle belirli bir m/z oranına sahip iyonlar ayrılır ve yalnızca hedef iyonlar dedektöre ulaşır.

2.11.4.2. Quadrapol kütle analizörü

Tekli quadrupol, dört paralel metal çubuktan oluşur ve karşılıklı iki çubuk çifti elektriksel olarak birbirine bağlanır. Bu çubuklar arasında radyo frekansı (RF) voltajı uygulanırken, doğru akım (DC) voltajı da eklenir. Çubuklar, pozitif ve negatif voltajlar olacak şekilde yerleştirilir, ancak her iki çubuk çifti arasında 180° faz farkı vardır. Bu faz farkı, elektrik alanın yönünü değiştirerek belirli iyonların yörüngelerini dengeler ve geçişlerini sağlar.

Quadrupol, yalnızca belirli bir kütle/yük (m/z) oranına sahip iyonların dedektöre ulaşmasına izin veren bir kütle filtresi görevi görür. RF ve DC voltajı arasındaki oran, hangi iyonların kararlı yörüngeler izleyerek dedektöre ulaşabileceğini belirler. Uygun m/z aralığındaki iyonlar quadrupolden geçerken dengeli bir yol izlerken, bu aralığın dışındaki iyonlar kararsız yörüngelere saparak çubuklara çarpar ve elenirler. Bu sayede sadece istenen iyonlar seçilir ve analiz edilir.

2.11.4.3. Tandem-MS/MS

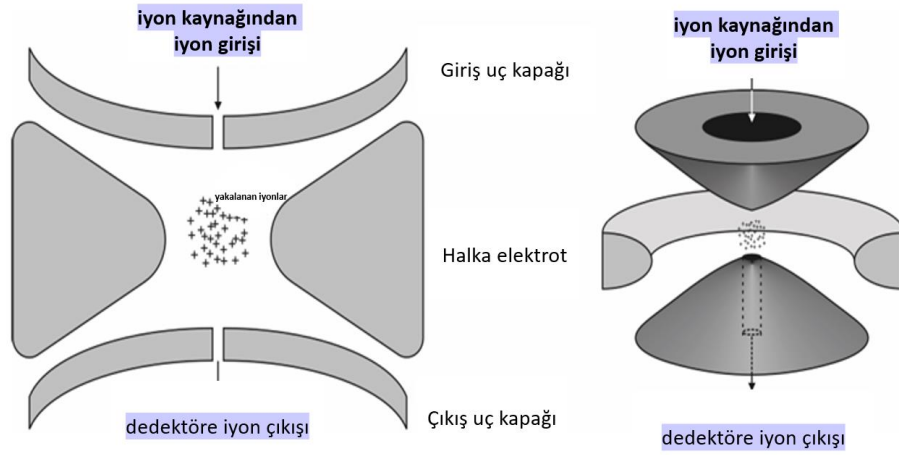
Ardışık kütle spektrometresi (MS/MS) seri olarak birbirine bağlanmış iki dört kutuplu kütle analizörünü kullanır. Tipik bir MS/MS analizinde, seçilen bir kütle iyonları (öncü veya ana iyonlar), bir çarpışma hücreğine iletilmeden önce ilk kütle

analizörü (ilk quadrupol) tarafından izole edilir. İkinci RF olmayan quadrupol bir çarpışma hücresi olarak hizmet eder. Çarpışma hücresindeki iyonlar, genellikle inert bir gazın nötr atomlarıyla çarpışarak parçalanır. Bu işlem sırasında hücreye bir çarpışma gazı (örneğin azot, argon veya helyum) eklenir. Bu gaz, iyonlarla etkileşime girer ve onların parçalanmasına neden olur. Çarpışma hücresi genellikle 10^{-3} Torr basınçta çalışır. İyonlar, çarpışma gazı molekülleriyle yaklaşık 30 elektron volt (eV) enerjiyle çarpışır. Üretilen sonraki parçalar (ürün veya yavru iyon) daha sonra ikinci kütle analizörü (üçüncü ve son quadrupol) tarafından analiz edilir. Tandem kütle spektrometreleri, son derece düşük yoğunluktaki moleküllerin yüksek doğruluk derecesiyle tanımlanmasını ve miktarsal ölçümünü sağlayan oldukça spesifik ve hassas cihazlardır.

İyon Kaynağı → Q1 [Filtreleme] → Q2 [Çarpışma] → Q3 [Filtreleme] → Dedektör

2.11.4.4. Tuzak tabanlı kütle spektrometrisi (QTRAP)

QTRAP, dört kutuplu iyon tuzakları (Quadrupole Ion Trap) olarak bilinen kütle spektrometresi bileşenleri, ilk olarak 1953 yılında Bonn Üniversitesi'nden Paul ve Steinwedel tarafından geliştirilmiştir. QTrap sistemleri, iki dört kutuplu kütle analizörü ve bir iyon tuzağı içerir. İlk dört kutuplu analizör (Q1), belirli kütle/yük oranına sahip iyonları seçer. Bu seçilen iyonlar, çarpışma hücresinde parçalanarak ürün iyonları oluşturur. Parçalanmış iyonlar, genellikle ikinci dört kutuplu analizör'ün (Q3) içinde bulunan bir iyon tuzağında tutulur. Bir iyon tuzağı da, iki hiperbolik uç kap elektrodu ve bir donut şeklindeki halka elektrodan oluşur.



Şekil 2.10. Dört kutuplu iyon tuzak kütle analizörünün yapısı. Solda kesit, sağda eğik 3D görünüm bulunur.

Bu tuzak, iyonların ek analizler için saklanması sağlar. İyon tuzakında iyonlar sınırlı bir hacimde depolanır. Son olarak, Q3 bu ürün iyonlarını analiz eder ve dedektör bu iyonları ölçerek kütle spektrumu oluşturur (42).

QTRAP Sistemi:

İyon Kaynağı → Q1 [Filtreleme] → Q2 [Çarpışma] → Q3 [Kadrupol /İyon Tuzakı] → Dedektör

2.11.4.5. Uçuş zamanlı kütle analizörü (TOF)

TOF (Time-of-Flight) kütle analizörü, iyonları kütle/yük oranlarına göre ayırmak için iyonların uçuş sürelerini kullanır. İyonlar, belirli bir enerji ile hızlandırılır ve bir İyonlar, dedektöre ulaşana kadar belirli bir mesafe boyunca hareket eder. Bu hareket süresi, iyonların kütle/yük oranına bağlı olarak değişir; hafif iyonlar bu mesafeyi daha kısa sürede kat ederken, ağır iyonlar daha uzun sürede dedektöre ulaşır. İyonların uçuş süreleri, kütle/yük oranlarını belirlemek için ölçülür.

2.11.5. Dedektör

İyon dedektörleri, kütle spektrometrisinde iyonları tespit etmek ve ölçmek için kullanılır. Ayrıştırılmış iyonlar, kütle spektrometresinde kullanılan bir ayrıştırıcıdan (örneğin quadripol) sonra dedektöre yönlendirilir. Dedektör içinde, genellikle metal bir kap ve içindeki bir tel elektrot kullanılarak bir elektrik alanı oluşturulur. Bu elektrik alanı, iyonların dedektör içinde hareket etmelerini sağlar. İyonlar, elektrik alanı tarafından yönlendirilerek elektrotlara çarpar. İyonların elektrotlara çarpması, bir elektrik akımı oluşturur. Bu akım, iyonların varlığını ve miktarını belirlemek için ölçülür. Ölçülen akım verileri, iyonların kütlesi ve miktarı hakkında bilgi sağlayarak bir kütle spektrumu oluşturur.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışma tasarımı

Çalışma, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ile Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Endokrinoloji Bilim Dalı ile birlikte yürütülmüştür. Tüm test ölçümleri, Hacettepe Erişkin Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Çalışma, prospektif bir tasarıma sahip olup gönüllülük esasına dayanmaktadır. Çalışmanın etik onayı, Hacettepe Üniversitesi Etik Kurulu tarafından alınmış ve katılımcılardan bilgilendirilmiş yazılı onay alınmıştır.

3.1.1. Hasta Populasyonu

Hacettepe Üniversitesi, Çocuk Hastanesi Çocuk Endokrinoloji bölümüne başvuran ve Santral AY olduğundan şüphelenilen ve LDT uygulanan 1-18 yaş arasındaki çocuklar çalışmaya dahil edilmiştir. İki grup oluşturuldu:

- Santral AY grup (hasta grup)
- HPA intakt grup (kontrol grup)

Çalışma grubu, kurumumuzda Santral AY olduğundan şüphelenilen ve LDT uygulanan 63 ayaktan pediatrik hastadan oluşmaktadır. Katılımcıların 42'si erkek çocuk, 21'i kız çocuktur. Yaş aralığı 1 ile 18 arasındadır.

Önceki bir çalışmada, AY tanısı için düşük doz ACTH testi (LDT) ile metirapon testi karşılaştırılmış ve düşük doz ACTH testi sırasında pik kortizol için kesim noktası 19,8 µg/dL (546 nmol/L) olarak belirlenmiştir. Buna göre LDT' de serum pik kortizol seviyeleri 19.8 µg/dL'nin altında olan hastalar adrenal yetmezlik olarak tanımlandı (43). Biz de çalışmamızda AY tanısı için bu kesim değerini kullandık.

3.1.2. Dahil etme kriterleri

- Gönüllü olmayı kabul eden hastalar
- Santral AY den şüphelenilen ve LDT yapılan hastalar

3.1.3. Dışlama kriterleri

- Primer adrenal yetmezliği olan ve plazma ACTH'ı yüksek olan çocuklar
- Akut kortizol yetmezliği olan çocuklar
- Test sırasında hemodinamik stabilitesi bozuk olan çocuklar
- Ağız içi kanaması olan çocuklar
- Östrojen tedavisi alan kız çocuklar
- Hipotalamus-hipofiz tümör cerrahisi geçiren çocuklar
- Diyabet ve komorbiditesi olan çocuklar

3.1.4. Bu çalışmanın amaçları şunlardır

- 1-18 yaş arası çocuklarda LDT sırasında tükürük kortizol (SC) seviyelerini serum seviyeleri ile karşılaştırmak ve SC'nin tanısal doğruluğunu belirlemek
- AY tanısında SC'nin duyarlılığını ve özgüllüğünü belirlemek
- HPA aksının bütünlüğünün değerlendirilmesinde SC için eşik değer belirlemek
- AY' tanısında DHEA ve DHEA-S'in rolünü belirlemek

3.2. LDT Uygulaması:

Polikliniğe başvuran Santral AY' dan şüphelenilen çocuklara test, sabah 08.30-09.00 arasında yapıldı.

3.2.1 LDT Hazırlanma Protokolü

- İ.V kateter takılır.
- Bazal ACTH ve kortizol ölçümü için kan alınır.
- 1 µg doz ACTH (Synacthen) kateterden verilir.
- 0., 20., 30. ve 40. dakikalarda kan ve tükürük örnekleri alınır.

3.2.2. LDT dozunun hazırlanması

1 ampul 250 µg/ ml Synacthen (tetracosactide 250 µg, Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, Almanya) içeriği 249 ml fizyolojik çözeltinin (SF) içine eklenir. Bu

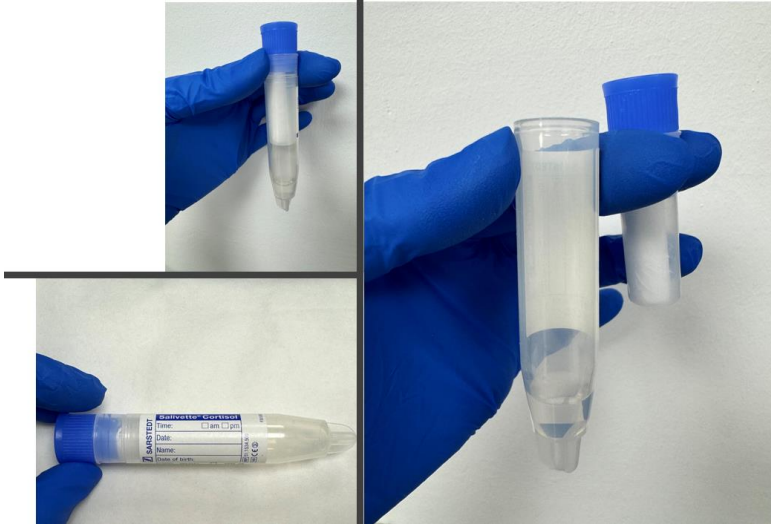
seyreltme testin yapılacağı gün yapılır, taze olarak hazırlanılır. Testin başında, seyreltmış çözeltinin 1 ml' si (1 µg) intravenöz olarak uygulanılır serum ve tükürük örnekleri 0, 20, 30, 40. dakikalarda hastadan alınır.

3.3. Örnek Toplama

3.3.1. Tükürük Örneklerinin Toplanması

Tükürük örnekleri bazal ve test sonrası 20., 30 ve 40. dakikada Salivette tüplere (Sarstedt Salivette Cotton Swab for Saliva Collection, Rommelsdorf, Germany) toplandı. Maksimum örnekleme süresi 2 dakikaydı. Total hacim 1 mL toplandı ve 1 saat içinde laboratuvara transfer edildi. Tüm örnekler laboratuvara teslim edilene kadar 4 °C'de saklandı.

Tükürük örnekleri laboratuvara kabul edildikten sonra 2000 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek, ayrılan süpernatant –80 °C'de çalışmaya kadar saklandı (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Tükürük örneklerinin hazırlanması.

3.3.2 Tükürük Toplama Öncesi Hastanın Uyması Gereken Kurallar:

- Örnek alınımından 30 dakika önce yemek yememek ve sıvı içecek içmemek

- Örnek alınımından 30 dakika önce dişlerini fırçalamamak
- Örnek alınımından 30 dakika önce sigara içmemek
- Örnek alınımından 30 dakika önce stresten uzak olmak
- Örnek alınımının 24 saat öncesinden itibaren meyvan kökü içeren besinlerin (glisirizin) almamaları istendi.

3.3.3. LDT Testi Sırasında Kan Örneklerinin Toplanması

LDT sırasında, 0., 20., 30 ve 40. dakikalarda kan örnekleri farklı tüplere alındı (Şekil 3.2). 0. dakikada ACTH ve DHEA-S için EDTA'lı mor kapaklı tüpe, kortizol için jel içeren sarı kapaklı tüpe (SST tüp) numune alındı. Ayrıca, 0. dakikada tükürük kortizölü için tükürük örnekleri ilgili tükürük toplama kabına alındı.



Şekil 3.2. Kan ve Tükürük Örnek Alımları ve Çalışılan Testler.

3.3.4. 24 Saatlik İdrar Örneklerinin Toplanması

Hastaların 24 saatlik idrar toplama işlemi için borik asit içeren idrar bidonları sağlandı ve her hastaya ve annesine 24 saatlik idrar toplama yöntemi detaylı bir şekilde anlatıldı.



Şekil 3.3. İdrar örneklerinde çalışılan testler.

3.4. Kimyasal Madde, Ekipman ve Cihazlar

3.4.1. Kimyasal Maddeler:

•Kortizol (%98 saflıkta), kortizon (%99 saflıkta) ve deksametazon (%99 saflıkta) Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, USA) temin edilerek analizlerde kullanılmıştır.

•Deuteriyum etiketli d4-kortizol standardı, Cambridge Isotope Laboratories'den (Andover, MA, USA) sağlanarak çalışmalar için kullanılmıştır.

• Çözücüler (metanol, asetonitril ve su, HPLC-grade) Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, USA) tedarik edilip kullanılmıştır.

• Asetik asit, amonyum asetat ve formik asit Merck'ten (Darmstadt, Almanya) temin edilmiştir.

Bu kimyasalların hazırlandığı cam malzemeler, vialler laboratuvar bünyesinde mevcut olup deneylerde kullanılmıştır.

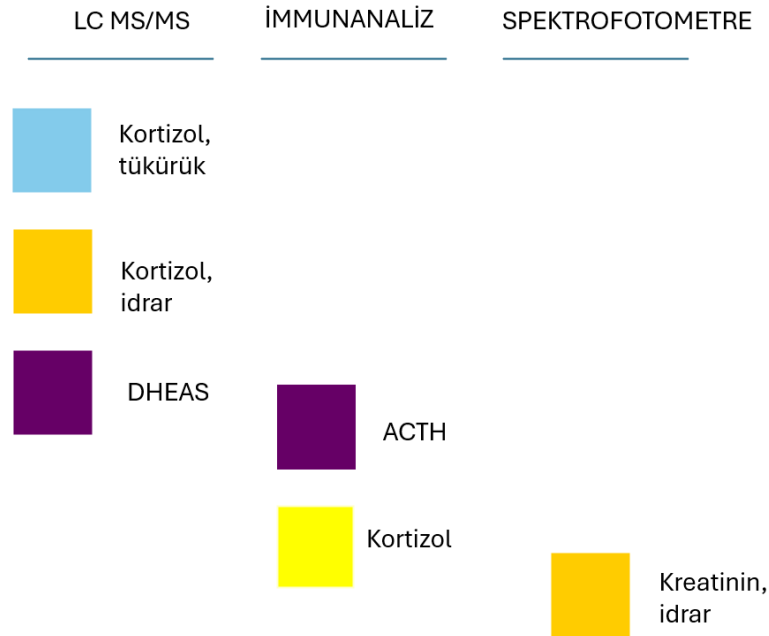
3.4.2. Ekipman ve cihazlar:

- Santrifüj (Mikro 20, Hettich)
- Vorteks (Oragon Lab)
- Otomatik pipetler
- Ependorf tüp (1.5 ml)
- Vialler (Shimadzu)

- -80 °C derin dondurucu (MDF-U6086S)
- -20 °C derin dondurucu (MDF-U6086S)
- Buzdolabı
- HPLC kolonu (Shimadzu, JAPAN): C18 loading column, (100mm x 3,5 mm x 3 µm) (Luna Omerga, Phenomenex, USA).
- SCIEX 5500: LC- MS/MS: Triple Quad™ 5500+ QTRAP® Ready (sütun fırın içeren bir HPLC (Shimadzu), otomatik sampler, iki sıvı kromatografi pompası, iki adet degazör, elektrosprey iyonizasyon kaynağı ve triple quadripol kütle spektrometre içerir).

3.5. Biyokimyasal Ölçümler

- Kütle spektrometre
- İmmüanaliz
- Spektrofotometre



Şekil 3.4. Çalışmada kullanılan biyokimyasal yöntemler.

3.5.1. Serum Kortizol Ölçümü

Serum bazal kortizolü kemilüminesans yöntem ile Beckman Coulter DXI 800 otomatik analizöründe ölçüldü. Analitik ölçüm aralığı 0,4-60 µg/dL, ölçüm sensitivitesi 0,4 µg/dL idi. Çalışma içi %CV düşük, orta ve yüksek düzey için sırasıyla %6,7, %4,4 ve %4,4 iken günler arası %CV sırasıyla %7,9, %6 ve %6,4 idi.

3.5.2. Plazma ACTH Ölçümü

Plazma bazal ACTH düzeyleri, kemilüminesans sandviç immünanaliz yöntemi ile IMMULITE 2000 cihazında ölçüldü. Çalışma içi tekrarlanabilirlik, düşük, orta ve yüksek düzeyler için sırasıyla %8,7, %6,7 ve %6,8 iken, günler arası tekrarlanabilirlik sırasıyla %9,8, %8,2, ve %8,7 idi. Ölçüm sensitivitesi 5 ng/mL idi.

3.5.3. Plazma DHEA ve DHEA-S Ölçümü

DHEA ve DHEA-S düzeyleri, LC-MS/MS yöntemi kullanılarak SCIEX 5500 Triple Quad™ 5500+ QTRAP® Ready cihazında ölçüldü. DHEA-S için ölçüm aralığı 15-85,290 µg/dL olup, tayin limiti 0,1 µg/dL idi. Gün içi tekrarlanabilirlik, ESI modunda düşük düzeyde %9,1, orta düzeyde %8,4 ve yüksek düzeyde %4,0 iken, günler arası tekrarlanabilirlik ise düşük düzeyde %9,2, orta düzeyde %6,8 ve yüksek düzeyde %3,3 idi.

DHEA için ölçüm aralığı 0,1- 500 ng/mL olup, tayin limiti 0.1 ng/mL idi. Gün içi tekrarlanabilirlik, ESI modunda düşük düzeyde %10,2, orta düzeyde %3,3 ve yüksek düzeyde %1,3 iken, günler arası tekrarlanabilirlik, düşük düzeyde %11,5, orta düzeyde %6,1 ve yüksek düzeyde %5,3 idi.

3.5.4. İdrar Serbest Kortizol Ölçümü

İdrar serbest kortizol düzeyleri, LC-MS/MS yöntemi kullanılarak SCIEX 5500 Triple Quad™ 5500+ QTRAP® Ready cihazında ölçüldü. Gün içi varyasyon düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda %4,8, %2,9 ve %1,4 iken, günler arası varyasyon %CV, düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda %7,4, %5,8 ve %2,5 idi. Analitik tayin limiti 0,25 ng/mL idi.

3.5.5. Tükürük Kortizol Ölçümü

3.5.5.1. Stok Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Çalışma için kortizol standardı (Sigma Aldrich, Zwijndrecht, Hollanda) den temin edildi.

- Ana stok standart çözeltisi (1 mg/mL) metanolde hazırlandı. Daha sonra metanol ile dilüsyonlar yapılarak çalışma stok solüsyonları hazırlandı.
- Ana stok çözeltiden 1/100 dilüsyon ile 10 µg/mL standart hazırlandı. Sonra bundan 1/50 dilüsyon ile 200 ng/mL standart solüsyonu (çalışma standart solüsyonu) elde edildi.
- Daha sonra bu solüsyondan dilüsyonlar yapıldı ve kalibrasyon eğrisinin çizilmesi için gerekli standartların hazırlanmasında kullanıldı.

3.5.5.2. İnternal Standart Çözelti Hazırlanması

D4-kortizol (1 mg) Cambridge Isotope Laboratories'den (Andover, MA, USA) temin edildi. Stok kortizol IS solüsyonu (120 µg/mL) metanolde hazırlandı. Sonra stok IS, metanol ile (1/2000) oranında dilüe edilerek 60 ng/mL çalışma IS solüsyonu hazırlandı. Çalışmaya dek -80 °C'de saklandı.

3.5.5.3. Standart Solüsyonlarının Hazırlanması

Sağlıklı bireylerden gece yarısı toplanan tükürük örnekleri birleştirilerek havuz haline getirildi. Bu havuz, 40 ml'ye 0,8 gram aktif karbon eklenerek bir gece boyunca muamele edildi. Ardından, 14.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilip, 0,22 mikrometrelik filtreden geçirildi ve "Çalışma tükürük havuzu" olarak adlandırıldı.

Çalışma standart solüsyonundan dilüsyonlar yapıldı ve "çalışma tükürük havuzu" spiked edilerek farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı. Kalibrasyon eğrisi 0, 1, 5, 30, 60, 130 ng/mL kortizol olacak şekilde yedi noktalı olarak çizildi.

3.5.5.4. Kalite Kontrol Örneklerinin Hazırlanması

Tükürük havuzu hazırlandı ve aktif karbonla muamele sonrası filtre edilerek çalışma tükürük havuzu oluşturuldu. Bu tükürük havuzu dilüe edilmiş çalışma standart

solüsyonu ile spiked edilerek düşük (1,2-3,8 ng/mL), orta (6,5-9,5 ng/mL) ve yüksek (13-19 ng/mL) konsantrasyonlarda kontrol örnekleri hazırlandı. Kontrol örnekleri 1000 µL alikot edildi ve analize dek -80 °C'de saklandı. Her bir çalışmada bir seri düşük, orta ve yüksek kontrol deep freeze'den çıkarılıp taze olarak kullanıldı.

3.5.5.5. Hasta Tükürük Numunelerinin Hazırlanması:

Laboratuvarda -80 °C'de saklanan hastalara ait tükürük numuneleri çalışma günü çözülerek oda sıcaklığına getirildi. Bu örnekler ekstrakte edildikten sonra süpernatant alınarak LC-MS/MS ile ölçüm yapıldı.

3.5.5.6. Tükürük Numunelerinin Ekstraksiyon Protokolü:

Tükürük örnekleri deproteinize edildi. Bunun için 500 µL numune üzerine 20 µL %0,5 asetik asit içeren saf asetonitril çözeltisi ve 20 µL internal standart (d4-kortizol, 60 ng/mL) eklendi. 5 dakika vortex yapıldıktan sonra 14,000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Supernatan (300 µL) başka bir tübe transfer edildi ve üzerine 100 µL metanol eklendi ve kütle spektrometresine verildi.

3.5.5.7. Tükürük Kortizolü LC-MS/MS Ölçüm Prosedürü

Çalışmaya başlamadan önce kütle spektrometrik tükürük kortizol ölçümü için en yüksek intensite ve rezolüsyona sahip pikleri elde etmek üzere optimizasyon çalışmaları yapıldı. Literatüre uygun şekilde gerçekleştirildi.

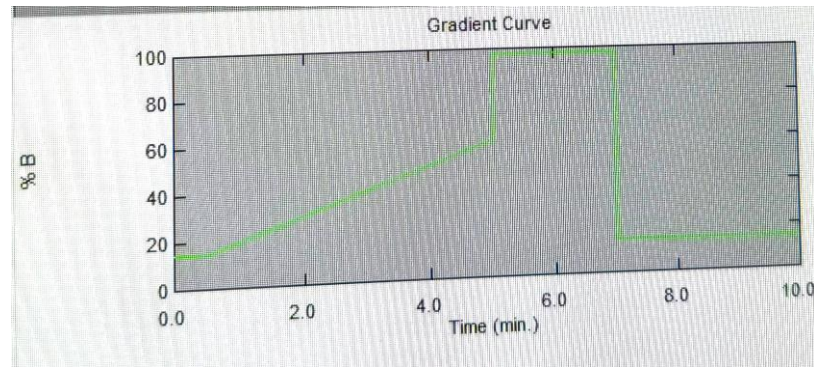
Mobil faz için, mobil faz A olarak %0,1 asetik asit içeren HPLC grade su, mobil faz B olarak %5 asetonitril; mobil faz A olarak 2 mmol/L amonyum asetat ve %0,1 formik asit içeren HPLC grade su, mobil faz B olarak 2 mmol/L amonyum asetat ve %0,1 formik asit içeren metanol; mobil faz A olarak 2,5 mM amonyum format içeren HPLC grade su ve mobil faz B olarak 2,5 mM amonyum format içeren metanol; mobil faz A olarak %0,05 asetik asit içeren HPLC grade su ve mobil faz B olarak %95 asetonitril denendi. Son olarak, mobil faz A olarak 2,5 mM amonyum format içeren HPLC grade su ve mobil faz B olarak 2,5 mM amonyum format içeren metanol optimum şartları sağladığı tespit edildi.

Kromatografik ayrılma, ReproSil–XR 120 C18 kolonu (100 mm × 3.0 mm, Dr. Maisch GmbH, Almanya) ve LC 20AD, LC 20AC, CBM 20A, CTO 10AS, DGU 20A3, FVC 20AH2 içeren UFLC sistemi (Shimadzu Co., Tokyo, Japonya) kullanılarak gerçekleştirildi. Örnekler, standart ve kontroller (10 µL) sisteme enjekte edildi.

Enjeksiyon hacmi ile ilgili olarak 5–25 µL arasındaki hacimlerde uygulamalar yapıldı; rezolüsyonu en yüksek pikler 10 µL ile elde edildi. En yüksek intensiteli piklerin 450 °C’de alındığı tespit edildi. İyon püskürtme voltajı için 4000 V–6000 V arasında uygulandı ve en uygun voltaj değerinin 5500 V olduğu saptandı.

Tükürük kortizol için MRM geçişleri 363/121 ve 363/91, döteryum-internal standart için ise 367/121 olarak belirlendi. Pik retansiyon zamanı 5,6 dakika olarak saptandı. MRM modunda deteksiyon yapıldı; ESI ve pozitif iyon modu kullanıldı.

Akış gradyanını belirleme çalışmalarında ideal akış hızı 0.3 mL/dakika olarak tespit edildi. Pompa B nin yüzdesi için %50, %65 ve %80 ile deneme yapıldı ve akış gradyanı Şekil 3.5 de gösterilmektedir.



Şekil 3.5. Mobil faz B'nin akış gradiyent eğrisi.

Tükürük kortizolü ve IS için retansiyon zamanı sırasıyla 5,6 ve 5,5 dakika bulundu. Kalibrasyon eğrisinin oluşturulması için tükürük serbest kortizol/internal standart tepe alanları oranı tükürük serbest kortizol konsantrasyonlarına karşı çizildi. Tüm ölçümler Sciex 5500 kütle spektrometresinde (AB Sciex, Concord, Ontario, Canada)

gerçekleştirildi. En yüksek intensite ve rezolüsyona sahip piklerin olduğu koşullar elde edildi. Ölçüme ait kütle spektrometre bilgileri Tablo 1’de verilmiştir:

Tablo 1. Tükürük kortizol ölçümü için kullanılan LC-MS/ MS’in özellikleri.

Pompa modu	MRM
Analiz süresi	10 dakika
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Retention time	5,65 dakika
Kolon sıcaklığı	40 ° C
Total akış hızı	0,3 mL/dakika
İonization mode(pozitive)	ESI
DP(volts) Düşüş gerilimi	116
EP(volts)Giriş plakası gerilimi	10
CE(volts) Çarpışma enerjisi gerilimi	31/87
CXP Çarpışma hücresi çıkış gerilimi	16/14
Curtain Gas(CUR)	35
Collision Gas (CAD)	9
İon spray voltage	5500 V
Çözülme sıcaklığı	5500 ° C
MRM dedection window	60 dakika
Mobil faz A	85%
Mobil faz B	15%
Gradian programı:	0,5. dakika Pompa B %15
	5 dakika Pumb B %60
	5,01 dakika Pumb B %98
	7 dakika Pumb B %98
	7,01 Pumb B %15
	10 dakika STOP

3.6. Tükürük Kortizol Ölçümünün Analitik Değerlendirilmesi

Tükürük kortizol ölçümünün analitik değerlendirilmesi için linearite, ölçümün tekrarlanabilirliği, tayin limitleri, doğruluğu, bulaş etkisi, matriks etkisi, örnek stabilitesi ve interferans CLIA standartlarına göre belirlendi.

Hastaların tükürüklerinde kortizol ölçümü yapıldıktan sonra, kalan örnekler konsantrasyonlarına göre bir araya getirilerek bir tükürük havuzu oluşturuldu. Bu havuz, analitik değerlendirme için kullanıldı.

3.6.1. Analitik Tayin Limitleri

Analitik ölçüm limitleri (Clinical and Laboratory Standards Institute) CLSI EP17 protokolüne göre belirlendi (Westgard 2008).

3.6.1.1. Limit of Blank (LOB)

Kortizol içermeyen süpernatant ve en düşük kortizol içeren süpernatant, LC-MS/MS cihazında ardışık olarak 20 kez ölçüldü; ardından bu ölçümler için ortalama ve standart sapma (SD) hesaplandı.

3.6 1.2. Limit of Detection (LOD)

Tayin limitini belirlemek için sinyal/gürültü (S/N) oranını kullanıldı. Sinyal/gürültü oranının 3 olduğu konsantrasyon seviyesi tespit limiti olarak kabul edildi.

3.6.1.3. Limit of Quantitation (LOQ)

Kantitasyon limiti, sinyal/gürültü (S/N) oranlarına göre belirlendi. Sinyal/gürültü oranının 10 olduğu konsantrasyon seviyesi kantitasyon limiti olarak belirlendi.

3.6.2. Linearite Çalışması

Linearite çalışması, CLSI EP6-A protokolüne göre gerçekleştirildi. Çalışmanın amacı, kortizol için analitik ölçüm aralığını belirlemektir.

İlk olarak, yüksek konsantrasyonunda (130 ng/mL) bir standart çözelti hazırlandı. Bu çözeltilerden sırasıyla 1/2, 1/4, 1/10, 1/50, 1/100, 1/200, 1/500, 1/1000, 1/2000 ve 1/4000 oranlarında dilüsyon yapılarak 0,03-130 ng/mL konsantrasyon aralığında çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan standart çözeltiler numuneye benzer şekilde ön işleme tabi tutulduktan sonra tandem MS ile analiz edildi.

3.6.3. Geri elde (Recovery) çalışması:

Geri elde çalışması için 5 ng/mL, 30 ng/mL ve 130 ng/mL konsantrasyonlarındaki standartlar kullanıldı. Orta konsantrasyonda tükürük havuzu (8 ng/mL) hazırlandı ve ardından her bir standart bu havuza eklendi:

1. tüp: 100 µL 5 ng/mL standart + 900 µL örnek havuzu
2. tüp: 100 µL 30 ng/mL standart + 900 µL örnek havuzu
3. tüp: 100 µL 130 ng/mL standart + 900 µL örnek havuzu

Bu örnekler ön işlemden geçirilerek kortizol ölçümü yapıldı. %Geri elde hesaplandı.

3.6.4. Tekrarlanabilirlik çalışması

Tekrarlanabilirlik çalışması, CLSI EP5 protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi. Çalışma içi tekrarlanabilirlik ve günler arası tekrarlanabilirlik değerlendirildi. İlk olarak, Yüksek (16 ng/mL), orta (8 ng/mL) ve düşük (2 ng/mL) konsantrasyonlarda tükürük havuzu (SP) hazırlandı.

Çalışma içi tekrarlanabilirlik için, her üç konsantrasyonda 20 örnek hazırlandı. Bu örnekler ön işleme tabi tutulduktan sonra aynı çalışmada ardışık kortizol ölçümü yapıldı. Ortalama, standart sapma (SD) ve yüzde değişim katsayısı (%CV) hesaplandı.

Günler arası tekrarlanabilirlik için, her üç konsantrasyon düzeyinde 4 örnek hazırlandı. Bu örnekler 5 ardışık gün boyunca ön işleme tabi tutuldu ve kortizol ölçümü yapıldı; toplamda 20 ölçüm gerçekleştirildi. Ortalama, SD ve %CV hesaplandı.

3.6.5. İnterferans çalışması:

Tekrarlanabilirlik çalışması, CLSI EP7 protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi. İnterferans çalışması kapsamında, 1 mg/mL konsantrasyondaki deksametazon çözeltisi, tükürük havuzuna 150 ng/mL olacak şekilde eklendi. Dilüsyon işlemi metanol ile yapıldığından, çalışma için gereken kör numune de metanol ile hazırlandı. Ön işlem basamaklarından geçirildikten sonra LC- MS/MS de her biri 5 kez çalışıldı. Ortalama ve %bias hesaplandı.

1. tüp: 150 µL (150 ng/mL) Deksametazon + 9850 µL örnek havuzu
2. tüp: 150 µL Metanol + 9850 µL örnek havuzu

İnterferans çalışması kapsamında, 1 mg/mL konsantrasyondaki Kortizon çözeltisi, tükürük havuzuna 150 ng/mL olacak şekilde eklenmiştir. Seyreltme işlemi metanol ile yapıldığından, çalışma için gereken kör numune de metanol kullanılarak hazırlandı. Ön işlem basamaklarından geçirildikten sonra LC-MS/MS de her biri 5 kez çalışıldı. Ortalama ve %bias hesaplandı.

1. tüp: 150 µL (150 ng/mL) Kortizon + 9850 µL örnek havuzu
2. tüp: 150 µL Metanol + 9850 µL örnek havuzu

Her iki interfere edici madde için 1. tüp ve 2. tüp arasındaki %bias hesaplandı.

3.6.6. Taşıma (Carry over)

Taşıma çalışması, CLSI EP05 protokolüne göre gerçekleştirildi. Yüksek(Y) ve düşük(D)konsantrasyonlarda tükürük havuzu hazırlandı; ön işleme tabi tutuldu. Numunelerdeki kortizol düzeyleri şu sırayla analiz edildi: Y1-Y2-D1-D2-D3-Y3-Y4-D4-D5-D6-Y5-Y6-D7-D8-D9-Y7-Y8-D10-D11-D12-Y9-Y10-D13-D14-D15.

Bu sıralama içinde 1. grup, düşük konsantrasyondan sonra gelen düşük konsantrasyon içeren örnekleri (D-D) ve 2. grup, yüksek konsantrasyondan sonra gelen düşük konsantrasyon içeren örnekleri (Y-D) kapsamaktadır. Grup ortalamaları ve standart sapmalar hesaplandı. Grup ortalamaları arasındaki farkın toplam müsaade edilen hatadan düşük olup olmadığı değerlendirildi.

1. grup: D2-D3-D5-D6-D8-D9-D11-D12-D14-D15
2. grup: D1-D4-D7-D10-D13

3.6.7. Dondurup çözmenin etkisi

Dondurma ve çözmenin stabilite üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, yüksek (16 ng/mL) ve düşük (2ng/mL) konsantrasyonlarda tükürük havuzları hazırlandı. Her bir konsantrasyon dört tüpe ayrıldı (toplam 8 tüp) ve ön işleme tabi tutularak hemen kortizol ölçümü yapıldı. Ölçümün ardından tüpler -80°C'de saklandı. Ertesi gün, dört seri tüp derin dondurucudan çıkarıldı. Yüksek ve düşük konsantrasyonlardaki birer seri ön işleme tabi tutularak kortizol ölçümü yapıldı, kalan üç seri tekrar -80°C'ye kondu. Toplamda dört kez dondurma-çözme işlemi uygulanarak her seferinde kortizol ölçümü yapıldı ve %bias hesaplandı.

3.6.8. Matriks etkisi

Matriks etkisi daha önce önerilen protokole uygun şekilde çalışıldı ve % matriks etkisi formülüne göre hesaplandı. Kısaca, 3 farklı konsantrasyonda kortizol standardı hazırlandı. Matriks etkisini değerlendirmek amacıyla üç tüp alındı. Her bir tüpe 250 µL distile su ve 250 µL standart çözeltisi eklendi. Numuneler ön işleme tabi tutuldu ve ardından cihaza enjekte edildi.

1. tüp: 250 µL distile su + 250 µL 5 ng/mL standart
2. tüp: 250 µL distile su + 250 µL 30 ng/mL standart
3. tüp: 250 µL distile su + 250 µL 130 ng/mL standart

Daha sonra üç tüp daha alındı. Bu tüplere eklendi. Bu numuneler ön işleme tabi tutulmadan doğrudan kortizol ölçümü için cihaza gönderildi.

1. tüp: 250 µL distile su + 250 µL 5 ng/mL standart
2. tüp: 250 µL distile su + 250 µL 30 ng/mL standart
3. tüp: 250 µL distile su + 250 µL 130 ng/mL standart

Ön işlem uygulanan ve uygulanmayan aynı konsantrasyondaki standartların pik alanları saptanarak %matriks etkisi Chambers ve ark. göre hesaplandı.

3.6.9. Numune stabilitesi

Stabilite çalışması için düşük ve yüksek düzeyde tükürük havuzları hazırlandı ve toplam 20 porsiyona bölündü (10 düşük ve 10 yüksek). Bu porsiyonlardan 2'si (bir düşük ve bir yüksek düzey) ön işleme tabi tutuldu ve kortizol ölçümü için cihaza verildi. Diğer 18 porsiyon her birinde 1 düşük bir yüksek olmak üzere 48. Saat, 15. gün ve 30. günlerde değerlendirilmek üzere +4 °C, -20 °C ve -80 °C'de saklandı.

3.7. İstatistiksel Yöntemler

Düşük doz ACTH uygulamasından sonra, serum veya tükürük yanıtı enjeksiyondan 20, 30 ve 40 dakika sonra ölçüldü. Başlangıç ve stimülasyon sonrası seviyeler arasındaki anlamlılık, parametrik olmayan Wilcoxon Rank Sum testi ile hesaplandı. Mann Witney U testi yalnızca iki grup arasındaki anlamlılık için kullanıldı.

20., 30. ve 40. noktalar arasında en yüksek değer, pik serum ve tükürük kortizol seviyeleri olarak tanımlandı. 40. dakikada tüm örneklerdeki serum ve tükürükteki serbest kortizol konsantrasyonları ile pik değeri arasındaki ilişkiyi incelemek için doğrusal regresyon analizi kullanıldı. Temel özellikler ve tanımlayıcı istatistikler hesaplandı ve ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. Anlamlılık düzeyi tüm testler için $P < 0,05$ olarak ayarlandı. Korelasyon analizi için Spearman testi kullanıldı.

Duyarlılığı (SE), özgüllüğü (SP), AUC'yi ve bunların %95 CI'lerini belirlemek için alıcı işletim eğrisi (ROC) analizleri yapıldı. AY tanısı için optimum tükürük kortizol kesme değerini belirlemek için ROC eğrileri oluşturuldu. 0., 20., 30., 40. dakika ve pik değeri sırasında tükürük kortizolünün tanısallık performansı ROC analizi kullanılarak araştırıldı. AY tanısı için en uygun pik tükürük kortizol kesme değerini tahmin etmek için Youden indeksi (duyarlılık (%) + özgüllük (%) – 100) kullanıldı.

İstatistiksel analizi gerçekleştirmek için Windows için SPSS 24 yazılım paketi (SPSS, Inc.) kullanıldı. Grafikler Graphs GraphPad Prism Sürüm 9.3.0 (GraphPadYazılımı) ile çizildi. Korelasyon için MedCalc istatistiksel yazılım programı kullanıldı.

4. SONUÇLAR

4.1. Hasta bulguları

4.1.1. Hastalara ait demografik bulgular

Çalışmaya toplam Santral AY şüphesi bulunan başvuran ve LDT uygulanan 1-18 yaş arasındaki toplam 63 çocuk dahil edildi. Yaş ortalaması 10 ± 5.1 idi ve E/K oranı 2/1 idi. Bunların 36'si santral AY tanısı aldı. Bütün katılımcılardan tükürük örnekleri sabah 8:30- 09:30 arasında alındı. Katılımcıların başlangıç bilgileri tablo 4.1 de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Santral AY tanısı alan ve almayan tüm katılımcıların demografik özellikleri ve başlangıç laboratuvar bulguları.

	Santral AY (+) (n=36)	Santral AY (-) (n=27)	p değeri
Yaş	$11,3 \pm 4,6$	$8,5 \pm 4,9$	0,03
E/K oranı	2,1	1,8	0,056
BMI	27,4	24,2	0,088
TA	125/72	116/68	0,214
Serum Na+ (mmol/L)	$136 \pm 15,4$	$138 \pm 14,1$	0,256
Serum K+ (mmol/L)	$3,9 \pm 0,5$	$4,1 \pm 0,42$	0,313
Serum kreatinin (mg/dL)	$0,81 \pm 0,13$	$0,76 \pm 0,1$	0,421
Serum albumin (mg/dL)	$3,8 \pm 0,34$	$4,1 \pm 0,55$	0,445

İki grup arasında yaş dışında anlamlı farklılık bulunmadı. Cinsiyet, vücut kitle indeksi, kan basıncı iki grup arasında farklı değildi. Serum elektrolit ve albümin seviyeleri ve böbrek fonksiyonları referans limitler içinde idi.

4.1.2. Santral AY Etiyolojisi:

Santral AY 'den şüphelenilen hastalar, tanılarına göre sekiz gruba ayrıldı: ekzojen steroid tedavisi kullananlar (n=25), hipopitüitarizm (n=6), santral hipotiroidi (n=16), beyin tümörleri (n=2), büyüme hormonu eksikliği tanısı alanlar (n=19) ve puberte prekoks (n=5) (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Hastalara ait tanıları.

	HASTA	Hipo pitüitarizm	BH eksikliği	Beyin tümörü	Ekzojen Steroid tedavisi	Santral hipotiroidi	Puberte prekoks
1	M. E. U	p				p	
2	E. T	p	p			p	
3	B. A. Ç				p		
4	A. K	p		p		p	
5	Ö. Ş				p		
6	E. N. B				p		
7	O. Ö	p	p			p	
8	U. T. O				p		
9	N. S. K					p	p
10	A. A				p		
11	B. A					p	
12	M. Y. D				p		
13	R. R. A			p			
14	E. U		p				
15	R. A				p		
16	B. M				p		
17	M. E. U		p				
18	A. B						p
19	Y. E	p				p	
20	A. Y. T					p	
21	M. H				p		
22	M. E. A		p				
23	Ç. G		p				
24	N. S. B				p		
25	H. M. K		p				
26	R. A		p				
27	M. E. L				p		
28	K. B. D		p				
29	Y. E. Ü		p				
30	M. H. G				p		

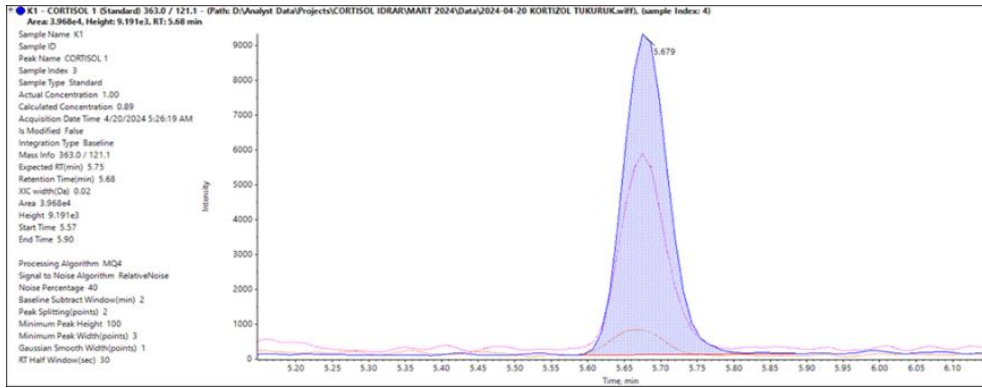
31	H. M. K		p				
32	C. İ					p	
33	F. A				p		
34	Z. S	p				p	
35	Z. F. G				p		
36	Ö. F. K				p		
37	M. S. T					p	
38	M. H. Y					p	
39	S. T. A		p				
40	B. C. K		p				
41	E. E. Ö					p	
42	M. E. K		p				
43	E. O						p
44	A. B						p
45	E. A. K				p		
46	M. N. İ		p				
47	İ. C				p		
48	A. P				p		
49	A. Ö					p	
50	E. N. G		p				
51	A. Ü				p		
52	D. U. Ü				p		
53	R. M. K		p				
54	F. M. H		p				
55	C. A					p	
56	M. D				p		
57	P. K		p				
58	N. B					p	
59	H. Ç				p		
60	Y. K						p
61	M. M. S				p		
62	K. E				p		
63	Y. M. K				p		

*p: pozitif sonuçlar

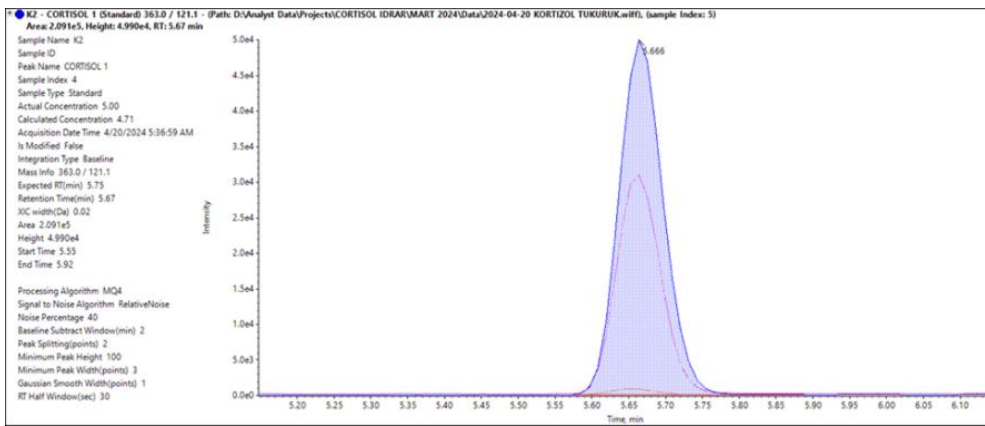
4.2. LC-MS/MS ile Tükürük Kortizol Ölçümü

4.2.1. Tükürük Kortizol Standart Kromatogramları

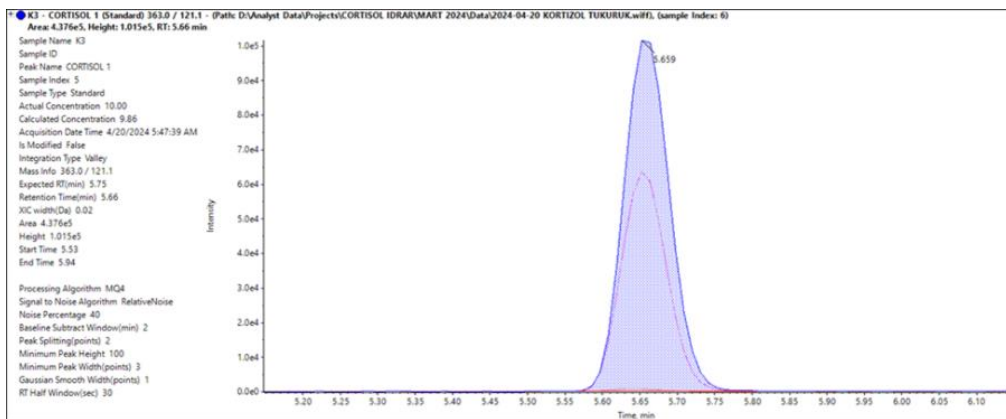
Tükürük kortizolünün LC-MS/MS standart kromatogramları Şekil 4.1. a-f 'de gösterilmektedir.



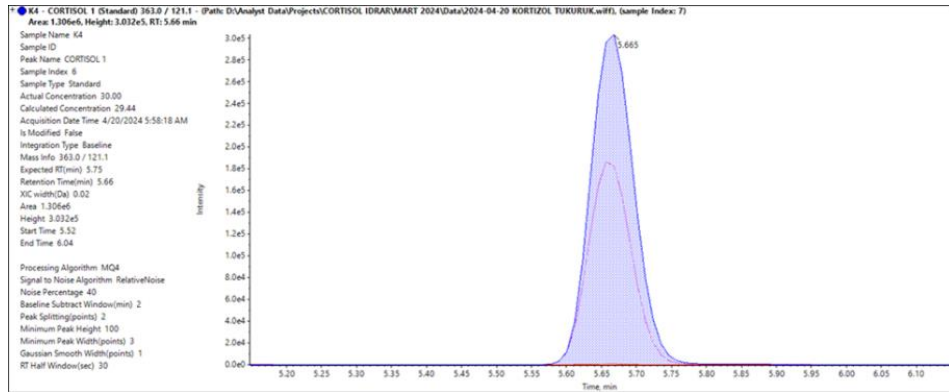
a. Standart-1



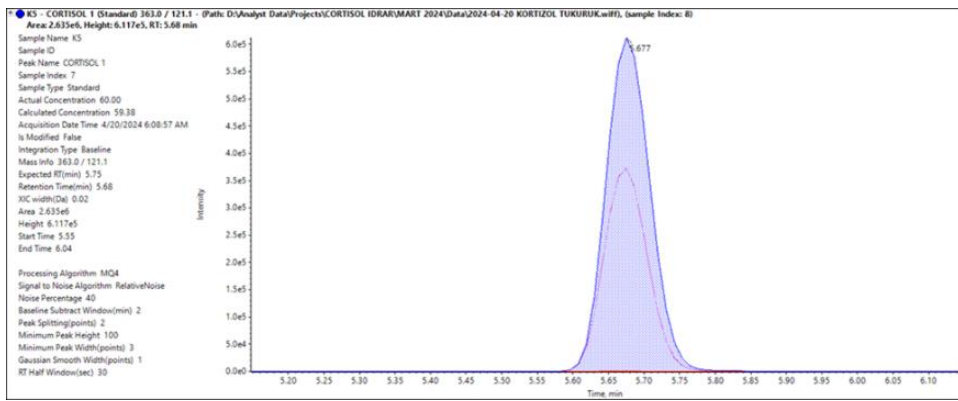
b. Standart-2



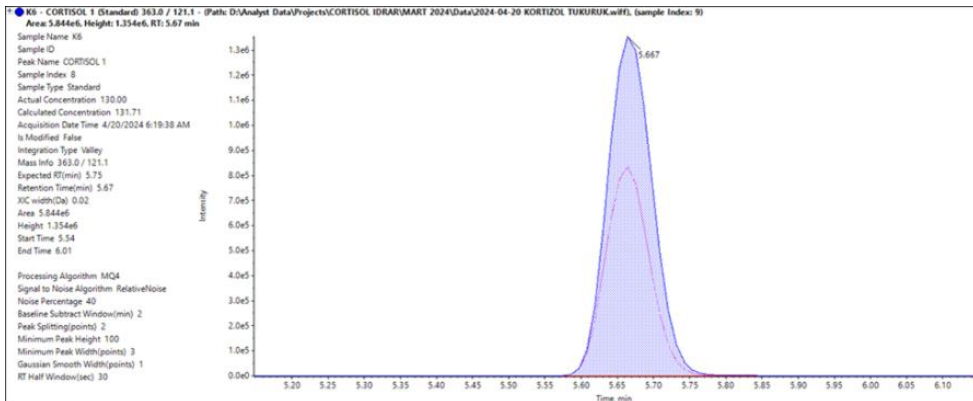
c. Standart-3



d. Standart-4



e. Standart-5



f. Standart-6

Şekil 4.1. a-f: Tükürük kortizolu tandem MS standart kromatogramları.

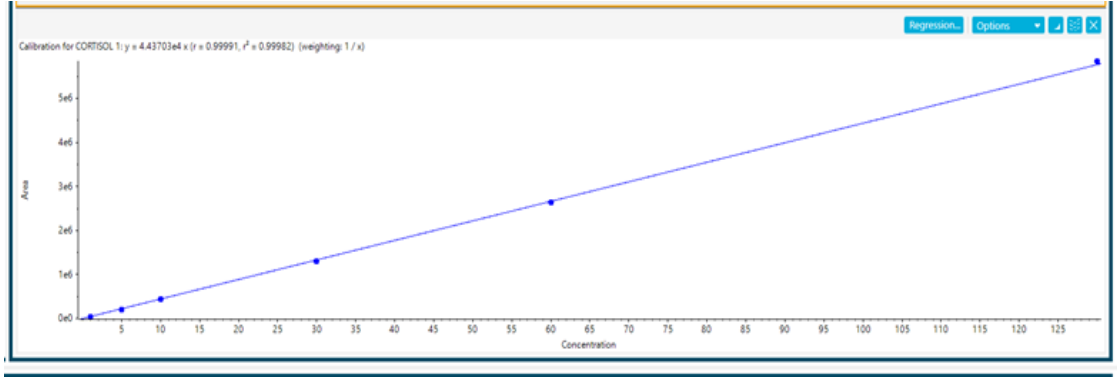
4.2.2. Tükürük Kortizol Kalibrasyon Eğrisi:

Tükürük kortizol kalibrasyon eğrisi Şekil 4.2'te verilmiştir.

$$Y=4,43703e4$$

$$r=99991$$

$$R^2= 99982$$

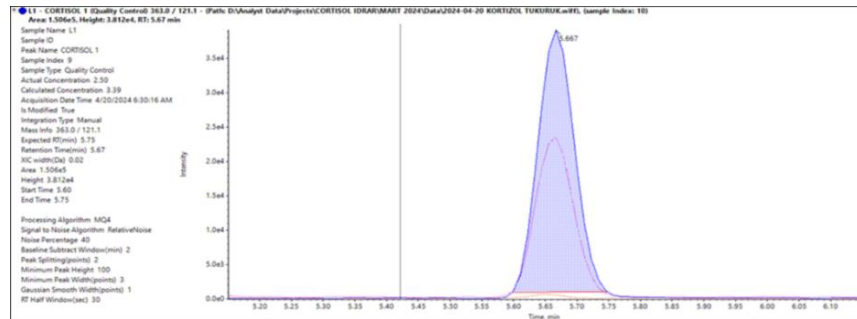


Şekil 4.2. Tükürük kortizol standart grafisi.

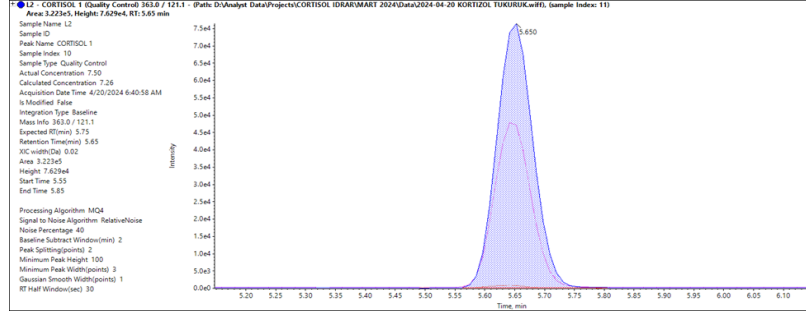
Tükürük kortizol standart grafiği çizildi ve $r = 0,999$ olarak bulundu. Eğim = $4,43703 \times 10^4$ ve kesim değeri 0 idi.

4.2.3. Tükürük Kortizol Kontrol Kromatogramları

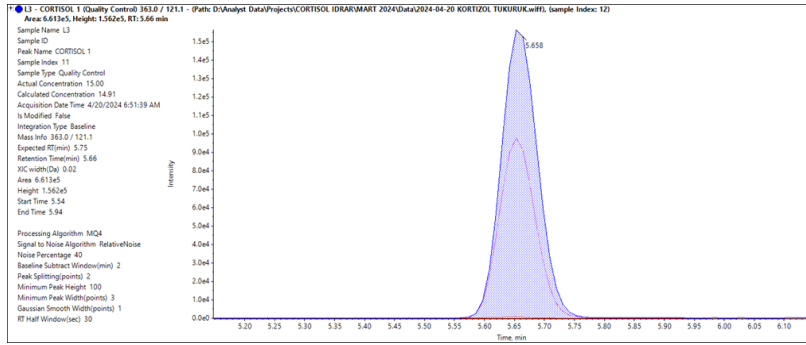
Tükürük kortizolu düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda hazırlanan kontrol kromatogramları Şekil 4.3. a-c' de gösterilmiştir.



a. Kontrol-1.



b. Kontrol-2

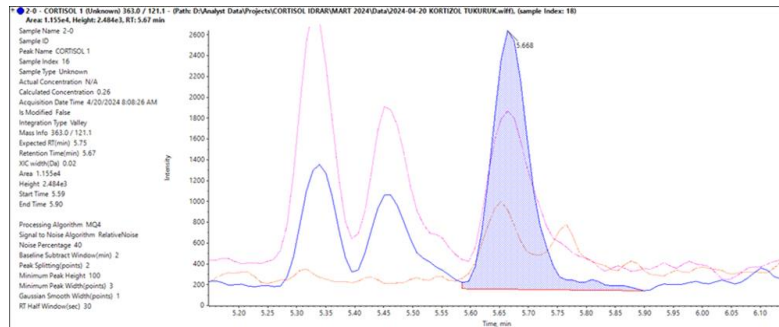


c. Kontrol-3

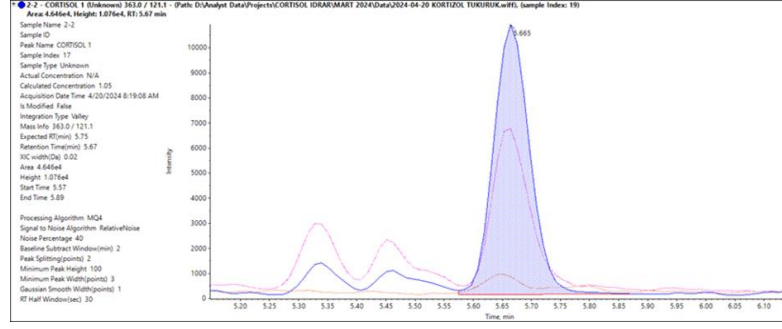
Şekil 4.3. Tükürük kortizol düşük, orta, yüksek kontrol değerleri.

4.2.4. Tükürük Kortizol Kromatogram Örneği

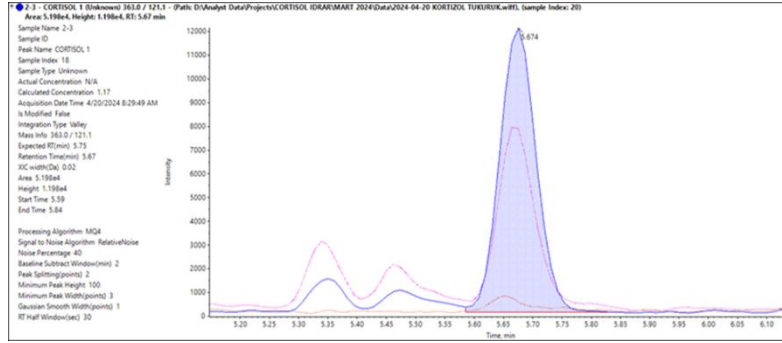
Bir hastaya ait LDT hasta sonucu (0., 20., 30. ve 40. dakikalar) Şekil 4.4 a-d' de gösterilmiştir.



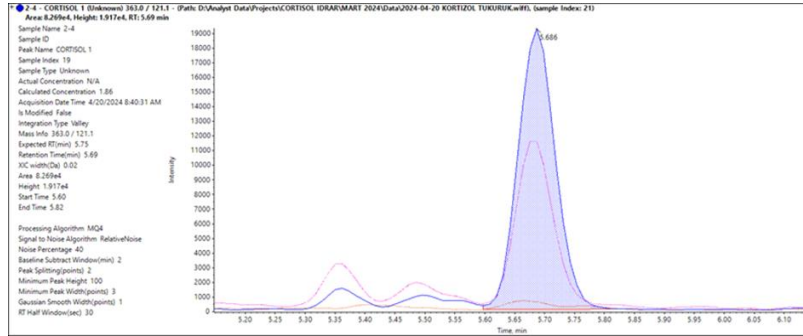
a. 0. Dakika



b. 20. dakika



c. 30. dakika

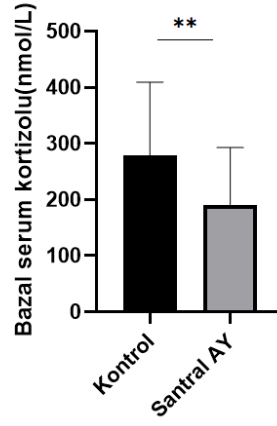


d. 40.dakika

Şekil 4.4. Bir hastanın LDT sırasındaki (0., 20., 30. ve 40. dakikalar) tükürük kortizol sonuçları.

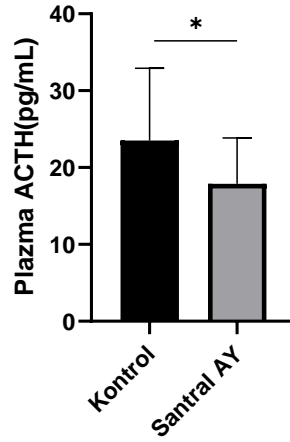
4.3. Bazal Serum Kortizol / Plazma ACTH Konsantrasyonları:

Santral AY tanısı alan ve almayan grupta sabah erken bazal serum kortizolü Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Santral AY tanısı alan bireylerde sabah serum kortizol düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı düşük izlendi ($p = 0,0054$).



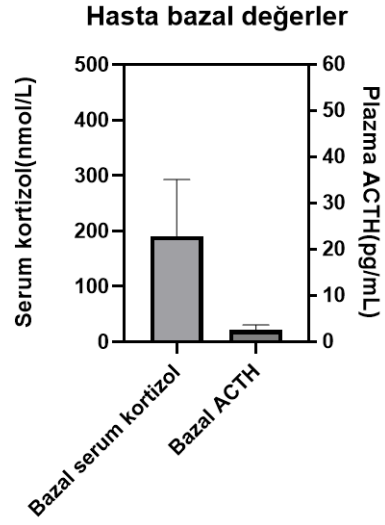
Şekil.4.5. Kontrol ve santral AY grubunda sabah serum kortizolü.

Santral AY tanısı alan ve almayan grupta sabah erken bazal plazma ACTH düzeyleri Şekil 4.6’da gösterilmiştir. Santral AY tanısı alanlarda plazma ACTH kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulundu ($p<0,05$).



Şekil.4.6. Kontrol ve Santral AY grubunda sabah plazma ACTH değerleri.

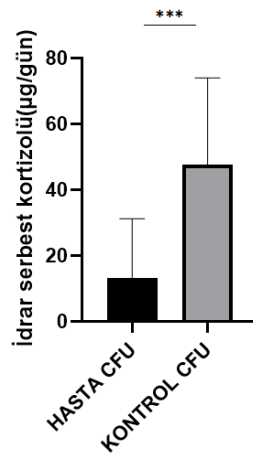
Santral AY grubunda sabah bazal serum kortizolü ve sabah bazal plazma ACTH düzeyleri Şekil 4.7 de birlikte gösterilmektedir.



Şekil 4.7. Santral AY' de bazal serum kortizolü ve bazal ACTH sonuçları.

4.4. İdrar Serbest Kortizolü

24 saatlik idrar serbest kortizol ölçümü adrenal rezervin belirlenmesi açısından önemlidir. Bu çalışmada toplam 63 vakanın 22'sinde (%33) 24 saatlik idrarda serbest kortizol ölçümü yapılabildi. Santral AY grubunda idrar serbest kortizol düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulundu ($p<0,001$) (Şekil 4.8).

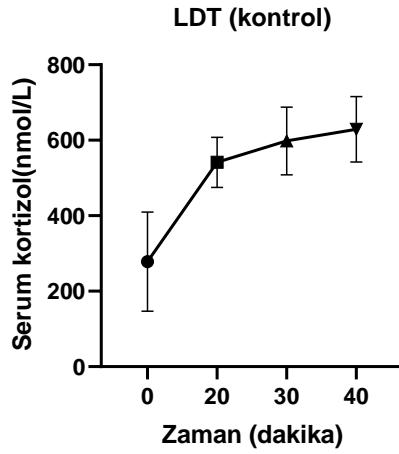


Şekil 4.8. 24 saatlik idrar serbest kortizol değerleri.

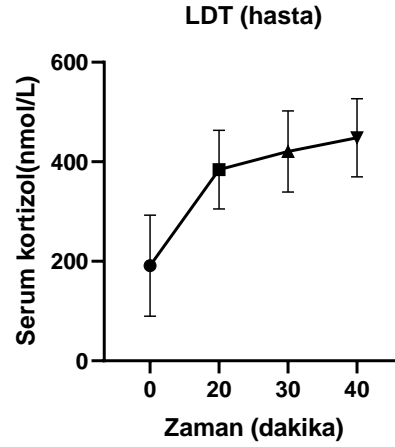
4.5. LDT' ye Serum Kortizol Yanıtı:

LDT' ye serum kortizol yanıtı hem kontrol hem Santral AY grubunda tespit edildi (Şekil 4.9.). Kontrol grubunda normal hipotalamik-hipofizer-adrenal eksenin fonksiyonunun korunduğu görülmektedir; çünkü stimülasyon sonrası 20., 30. ve 40. dakikalarda serum kortizol seviyeleri 550 nmol/L'nin üzerinde bulundu. Santral AY grubunda ise hipotalamik-hipofizer-adrenal eksenin yetersiz işlev gösterdiği görülmektedir; bu grupta serum kortizolü ACTH stimülasyonu sonrası 20., 30. ve 40. dakikalarda 550 nmol/L' nin altında idi.

a.

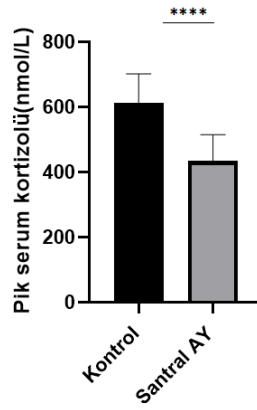


b.



Şekil 4.9. a. Kontrol ve b. Santral AY grubunda LDT' ye serum kortizol yanıtı.

Toplam 63 bireyin 47'si (%75), 40. dakikada pik serum kortizol seviyelerine ulaşırken, 16'sı (%25) 30. dakikada pik serum kortizol seviyelerine ulaşmıştır. Kontrol grubunda, pik serum kortizol seviyesi 40. dakikada izlenmiş olup, en yüksek değer 40. dakikada 883 nmol/L olarak kaydedilmiş; 30. dakikada ise 763 nmol/L ölçülmüştür. Santral AY grubunda da serum kortizolünün 40. dakikada pik yaptığı bulunmuş ve en yüksek değer 541,6 nmol/L olarak saptanmıştır. 30. dakikada ise en yüksek değer 521 nmol/L ölçülmüştür. Ortalama pik serum kortizolü Santral AY grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düşük izlendi ($p < 0,0001$) (Şekil 4.10).



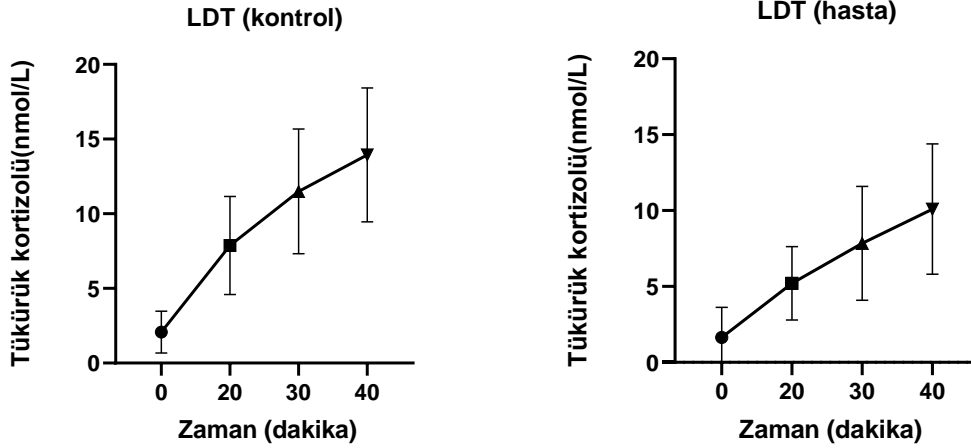
Şekil 4.10. Kontrol ve Santral AY gruplarında ortalama pik serum kortizolü.

4.6. LDT'ye Tükürük Kortizol Yanıtı

Kontrol grubu ve santral AY grubunda LDT'ye tükürük kortizol yanıtı Şekil 4.11'de gösterilmektedir.

a.

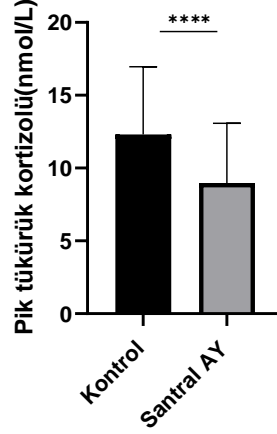
b.



Şekil 4.11.a. Kontrol ve b. santral AY gruplarında LDT'ye tükürük kortizol yanıtı.

Toplam 63 hastanın 57'si (%90), 40. dakikada pik tükürük kortizol seviyelerine ulaşırken, 6'sı (%10) 30. dakikada pik tükürük kortizol seviyelerine ulaşmıştır. Kontrol grubunda tükürük kortizolünün 40. dakikada pik yaptığı izlendi, en yüksek değer 22 nmol/L bulundu, 30. Dakikada 21 nmol/L idi.

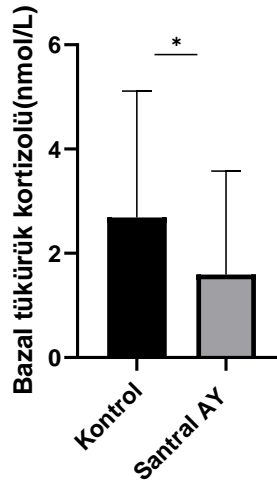
Santral AY grubunda tükürük kortizolu, 40. dakikada pik yaparak 9,8 nmol/L ile en yüksek seviyeye ulaştı. 30. dakikada ise 7,6 nmol/L olarak saptandı. Santral AY grubunda pik tükürük kortizolu kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulundu ($p < 0,0001$). (Şekil 4.14)



Şekil 4.12. Kontrol ve Santral AY grubunun pik tükürük kortizol seviyeleri.

4.7. Bazal Tükürük kortizolu:

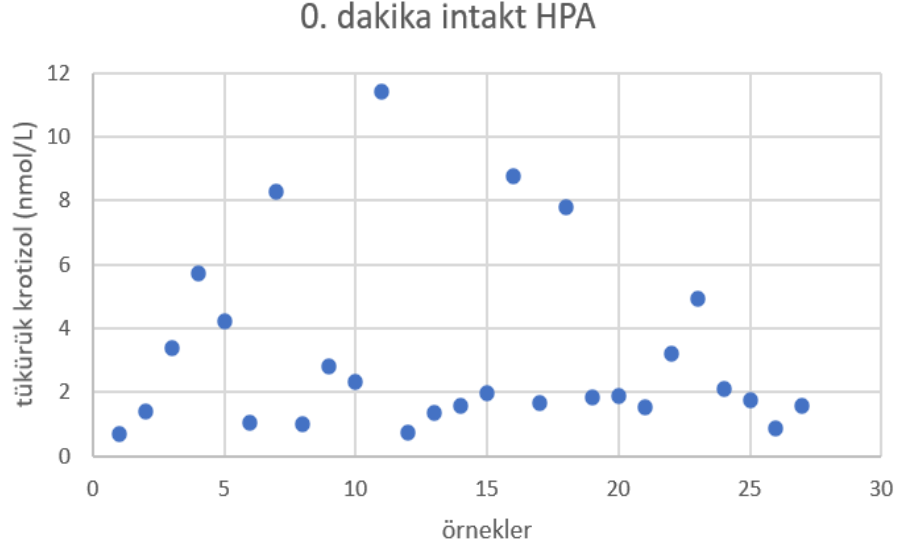
Santral AY ve kontrol grubu arasında bazal tükürük kortizol seviyeleri açısından anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$) (Şekil 4.13).



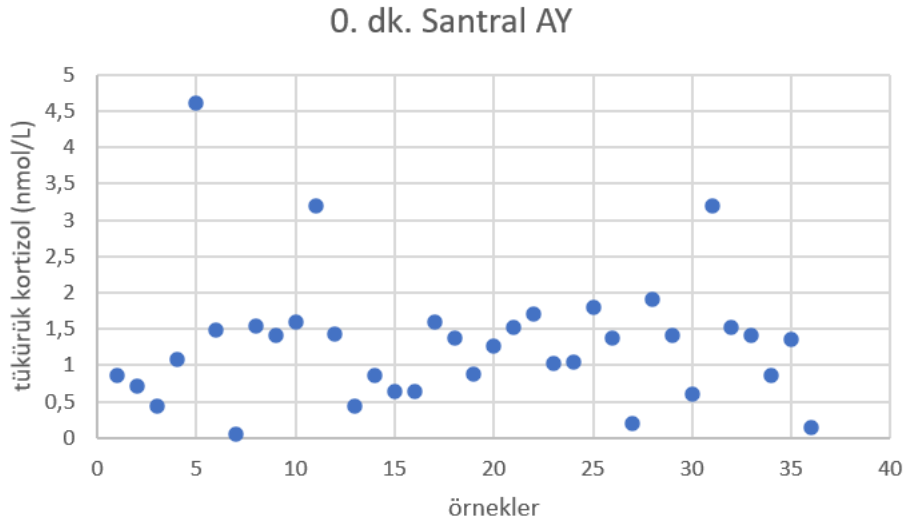
Şekil 4.13. Santral AY ve kontrol grubunda bazal tükürük kortizol seviyeleri.

Kontrol ve Santral AY grubunda bazal tükürük kortizol düzeylerinin dağılımı Şekil 4.14.a ve 4.14.b'de gösterilmektedir. Kontrol grubunda en düşük kortizol düzeyi 0,71

nmol/L olarak bulundu, Santral AY grubunda ise yüksek kortizol düzeyi 4,6 nmol/L olarak belirlendi.



Şekil 4.14. a. Kontrol grubunda bazal kortizol düzeyleri.

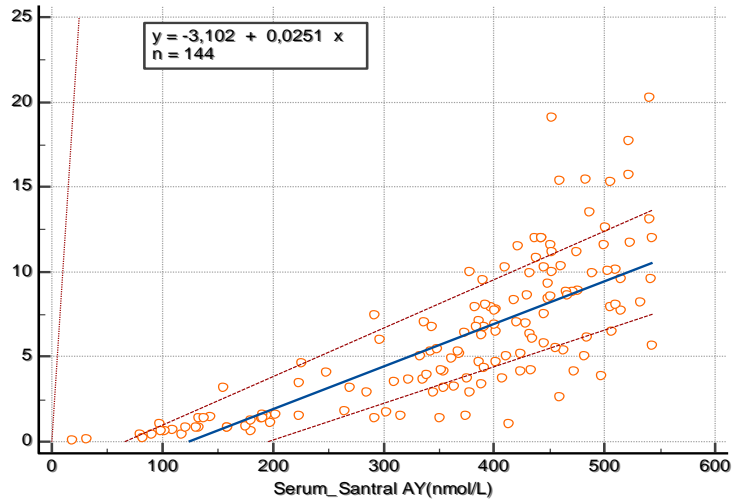


Şekil 4.14. b. Santral AY grubunda bazal kortizol düzeyleri.

4.8. Tükürük ve Serum Kortizolünün Karşılaştırılması

4.8.1. LDT'nin Tüm dakikalarında Tükürük ve Serum Kortizolünün Karşılaştırılması

LDT'nin tüm dakikalarında santral AY hastalarının tükürük ve serum kortizol korelasyonu Şekil 4.15'te gösterilmektedir.



Variable X	Serum_kortizol_Santral_AY
Variable Y	Tükürük_kortizol_Santral_AY

Sample size	144
-------------	-----

	Variable X	Variable Y
Lowest value	18,4828	0,05519
Highest value	543,1723	20,2286
Arithmetic mean	361,1513	6,1101
Median	391,7240	5,4642
Standard deviation	131,9159	4,3349
Standard error of the mean	10,9930	0,3612

Regression Equation

$y = -3,101836 + 0,0251077 x$	
Systematic differences	
Intercept A	-3,1018
95% CI	-4,2302 to -1,8905
Proportional differences	
Slope B	0,02511
95% CI	0,02156 to 0,02858
Random differences	
Residual Standard Deviation (RSD)	2,8036
± 1.96 RSD Interval	-5,4950 to 5,4950
Linear model validity	
Cusum test for linearity	Significant deviation from linearity (P=0,03)

Spearman rank correlation coefficient

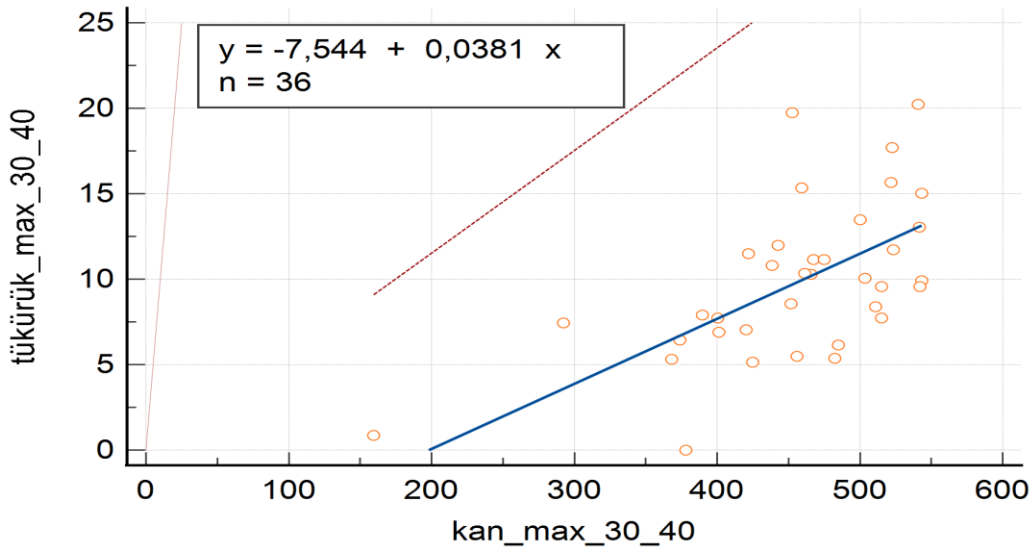
Correlation coefficient	0,825
Significance level	P<0,0001
95% CI	0,765 to 0,871

Şekil 4.15. LDT tüm dakikalarında Santral AY hastalarının tükürük kortizolü ve serum kortizol korelasyonu.

LDT' nin tüm zaman noktalarında (0., 20., 30., ve 40. dakikalar) serum ve tükürük kortizol seviyeleri arasında çok güçlü ve anlamlı korelasyon gözlemlendi. Santral AY grubunun kontrollere göre serum ve tükürük kortizolü arasındaki korelasyon istatistiksel olarak tüm dakikalarda anlamlı idi ($r = 0,82$; $p < 0,0001$; Şekil 4.15). Bu sonuçlar, düşük doz ACTH 'a tüm dakikalarda tükürük kortizol salınımının yeterli olduğu söylenebilir.

4.8.2. LDT Pik Değerlerinde Tükürük ve Serum Kortizol Karşılaştırılması

Santral AY hastalarının sadece pik değerlerdeki tükürük kortizol ve serum kortizolü karşılaştırılması yapıldı; Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Variable X	kan_max_30_40	
Variable Y	tükürük_max_30_40	
Sample size	36	
	Variable X	Variable Y
Lowest value	159,4482	0,0000
Highest value	543,1723	20,2286
Arithmetic mean	455,3332	9,8529
Median	463,5861	9,7417
Standard deviation	78,6401	4,5382
Standard error of the mean	13,1067	0,7564

Regression Equation

$$\hat{y} = -7,543754 + 0,0380737 x$$

Systematic differences

Intercept A	-7,5438
95% CI	-17,3659 to -0,4874

Proportional differences

Slope B	0,03807
95% CI	0,02117 to 0,06006

Random differences

Residual Standard Deviation (RSD)	3,7092
± 1.96 RSD Interval	-7,2700 to 7,2700

Linear model validity

Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0,46)
--------------------------	--

Spearman rank correlation coefficient	0,568
---------------------------------------	-------

Correlation coefficient	
Significance level	P=0,0003
95% CI	0,294 to 0,756

Şekil 4.16. Santral AY hastalarının tükürük kortizol ve serum kortizolü pik değerlerinin karşılaştırılması.

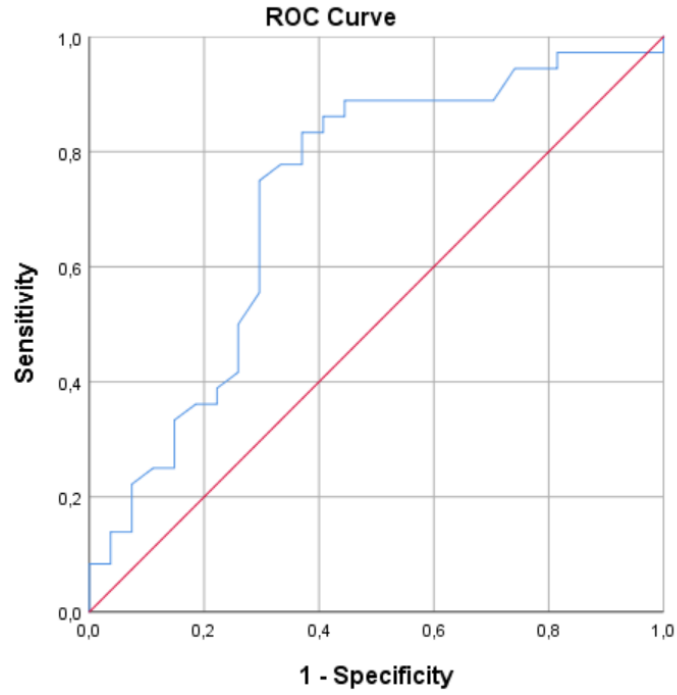
Pik serum ve tükürük kortizol değerleri arasında orta derecede ve anlamlı korelasyon izlendi; sırasıyla korelasyon katsayısı 0,56, eğim 0,03 ve kesme noktası -7,5 bulundu. ($p=0,0003$) (Şekil 4.16).

Bu korelasyon sonuçlarına dayanarak, düşük doz ACTH'ya yeterli tükürük kortizol salınımının olduğu söylenebilir.

4.9. Tükürük Kortizol Ölçümünün Santral AY için Tanısal Doğruluğu

Tükürük kortizolü ölçümünün santral AY için tanısal doğruluğunun tespiti için ROC analizi yapıldı, AUC (eğri altındaki alan), duyarlılık (sensitivite), özgüllük (spesifite), doğruluk, pozitif prediktif değer (PPV) ve negatif prediktif değer (NPV) belirlendi.

Şekil 4.20 a., b., c., d. ve e.'de, LDT'in 0., 20., 30., 40. dakikalar ve pik değerlerinde tükürük kortizolü için ROC eğrisi verilmiştir.



Area Under the Curve

Test Result Variable(s): tükürük_0

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
,721	,068	,003	,588	,855

The test result variable(s): tükürük_0 has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

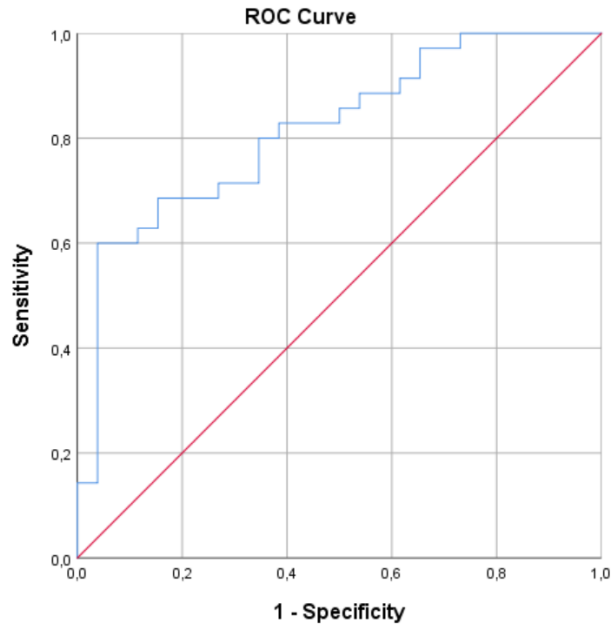
a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

Şekil 4.17.a. LDT 0. Dakikada Tükürük Kortizolu İçin ROC Eğrisi.

Positive if Less Than or Equal To ^a	Sensitivity	Specificity
1,6200	0,830	0,64

Bazal tükürük kortizolu için AUC 0,72 (95% CI: 0,588–0,855) (Şekil 4.20.a) bulundu. Eşik değer %83 duyarlılık ve %64 özgüllük ile 1,62 nmol/L idi. Pozitif prediktif değer %82 ve negatif prediktif değer %87 olarak tespit edildi. Pik tükürük kortizol seviyeleriyle karşılaştırıldığında, bazal tükürük kortizol seviyeleri santral AY tanısı için daha düşük tanısal doğruluğa sahipti.



Area Under the Curve

Test Result Variable(s): tukuruk_kortizol_20

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
,816	,054	,000	,710	,923

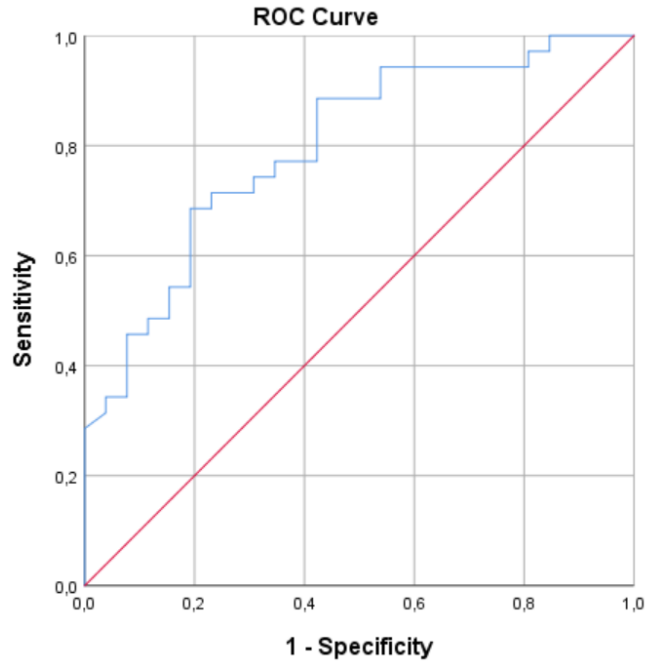
a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

Şekil 4.17.b. LDT 20. dakikada tükürük kortizolü için ROC eğrisi.

Positive if Less Than or Equal To ^a	Sensitivity	Specificity
6,9400	0,800	0,650

20. dakika tükürük kortizol seviyeleri için AUC 0,816 (95% CI: 0,71–0,92) (Şekil 4.20.b) bulundu. Eşik değeri %80 duyarlılık ve %65 özgüllük ile 6,94 nmol/L idi. Pozitif prediktif değeri %79 ve negatif prediktif değeri %80 olarak tespit edildi.



Area Under the Curve

Test Result Variable(s): tukuruk_kortizol30

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
,798	,057	,000	,688	,909

The test result variable(s): tukuruk_kortizol30 has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

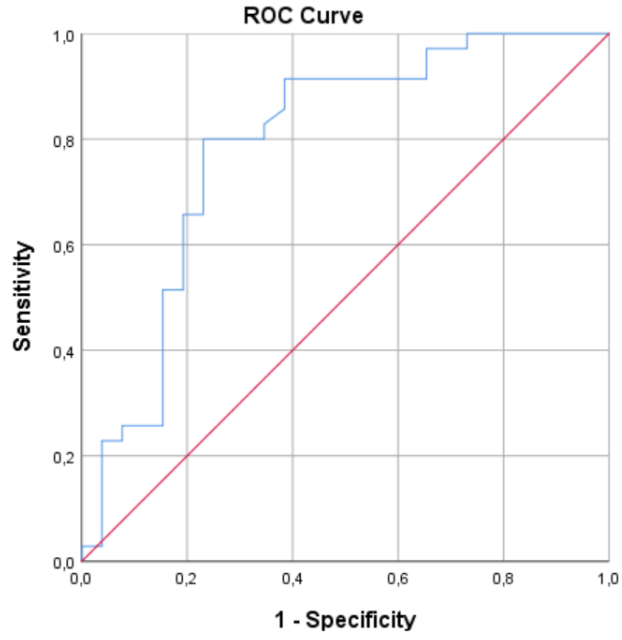
a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

Şekil 4.17.c. LDT 30. dakikada tükürük kortizolu için ROC eğrisi.

Positive if Less Than or Equal To	Sensitivity	Specificity
9,54	0,77	0,65

30. dakika tükürük kortizol seviyeleri için AUC 0,798 idi (95% CI: 0,688–0,909) (Şekil 4.20.c). Eşik değeri %77 duyarlılık ve %65 özgüllük ile 9,54 nmol/L olarak bulundu. Pozitif prediktif değeri %91,4 ve negatif prediktif değeri %78,2 idi.



Area Under the Curve

Test Result Variable(s): tukuruk_kortizol40

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
,790	,063	,000	,666	,913

The test result variable(s): tukuruk_kortizol40 has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

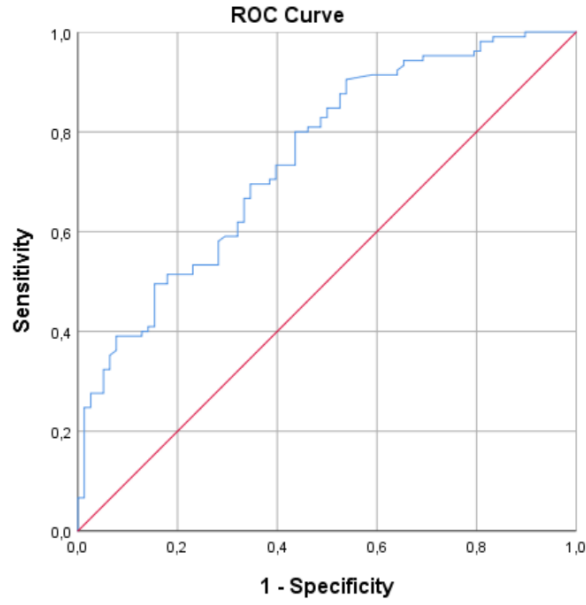
a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

Şekil 4.17.d. LDT 40. dakikada tükürük kortizolu için ROC eğrisi.

Positive if Less Than or Equal To	Sensitivity	Specificity
12,0	0,80	0,769

40. dakika tükürük kortizol seviyeleri için AUC 0,799 idi (95% CI: 0,66–0,91, Şekil 4.20.d). Eşik değeri %80 duyarlılık ve %76 özgüllük ile 12 nmol/L olarak bulundu. Pozitif prediktif değeri %91,4 ve negatif prediktif değeri %86,2 idi.



Area Under the Curve

Test Result Variable(s): TUKURUK_KORTIZOL

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
,748	,036	,000	,677	,818

The test result variable(s): TUKURUK_KORTIZOL has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

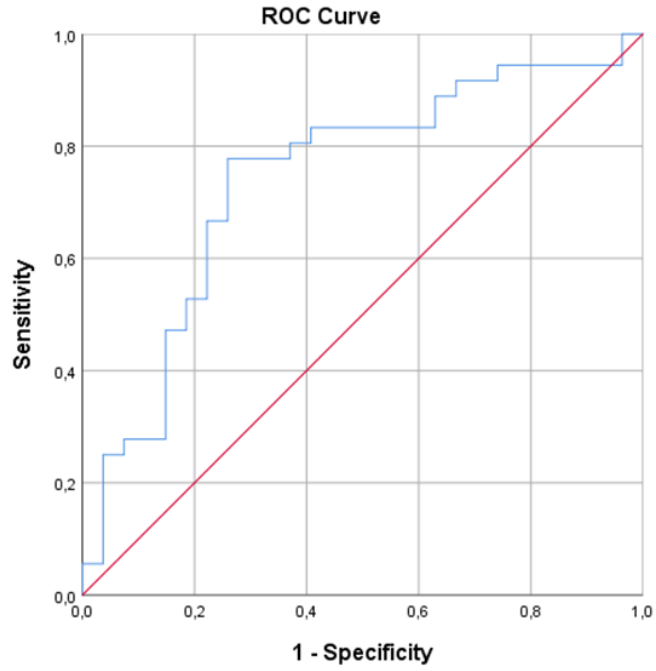
a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

Şekil 4.17.e. LDT tüm dakikalarda tükürük kortizolu için ROC eğrisi.

Positive if Less Than or Equal To ^a	Sensitivity	Specificity
9,59	0,73	0,600

Tüm dakikalarda tükürük kortizol seviyeleri için AUC 0,748 idi (95% CI: 0,677–0,818) (Şekil 4.20.e). Kesim değeri %73 duyarlılık ve %60 özgüllük ile 9,59 nmol/L olarak bulundu.



Area Under the Curve

Test Result Variable(s): tükürük_pik

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
,743	,065	,001	,616	,870

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

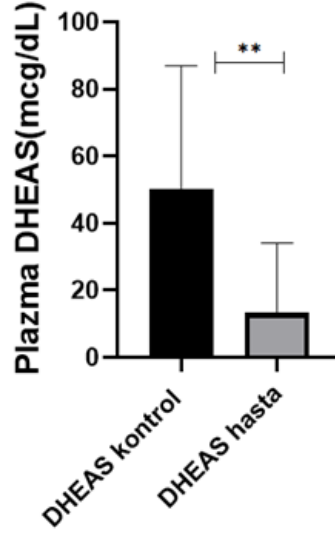
Şekil 4.17.f. LDT pik değerlerde tükürük kortizolü için ROC eğrisi.

Positive if Less Than or Equal To ^a	Sensitivity	Specificity
11.99	0,78	0,74

Pik tükürük kortizolü için ROC analizinde AUC 0,743 olarak bulundu (95% CI: 0,616–0,87) (Şekil 4.20.f). Youden indeksi kullanılarak türetilen pik tükürük kortizol kesim değeri, %78 duyarlılık ve %74 özgüllük ile 11,9 nmol/L idi.

4.10. Plazma DHEA-S Ölçümü

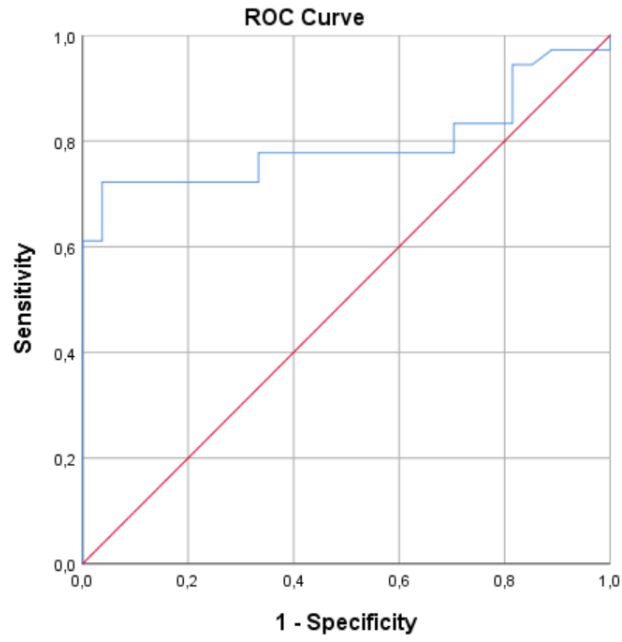
Bu çalışmada kontrol ve santral AY grubunda plazma DHEA-S düzeyleri LC-MS/MS metodu ile ölçüldü. Santral AY grubunda, kontrol grubuna göre plazma DHEA-S düzeylerinde belirgin bir azalma gözlenmektedir ($p<0,01$) (Şekil 4.18). Bu düşüşün adrenal korteksin ACTH stimülasyonuna yeterince yanıt verememesiyle ilişkili olduğu düşünüldü.



Şekil 4.18. Santral AY ve kontrol gruplarında plazma DHEA-S düzeyleri.

4.10.1. Santral AY Tanısı için Plazma DHEA-S'in Tanısal Doğruluğu

Santral adrenal yetmezlik için plazma DHEA-S'in tanısal doğruluğunu saptamak üzere ROC analizi yapıldı.



Area Under the Curve

Test Result Variable(s): DHEAS

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
,796	,059	,000	,679	,912

The test result variable(s): DHEAS has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

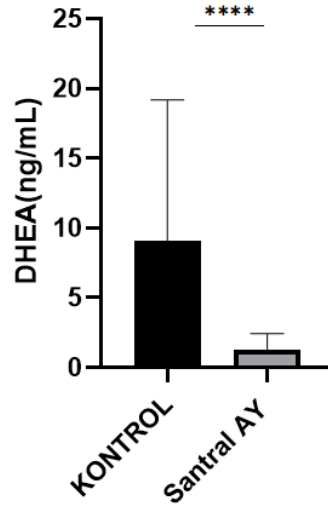
Şekil 4.19. Plazma DHEAS ROC eğrisi.

Positive if Less Than or Equal To a	Sensitivity	Specificity
17,5	0,72	0,96

AUC 0,796 idi (95% CI: 0,679–0,712, Şekil 4.22). Eşik değeri %72 duyarlılık ve %96 özgüllük ile 17,5 µg/dL olarak bulundu.

4.11. Plazma DHEA ölçümü

Santral AY ve kontrol gruplarında plazma DHEA düzeyleri LC-MS/MS yöntemi ile tayin edildi. Santral AY grubunda, plazma DHEA düzeylerinde belirgin bir azalma bulundu ($p<0,0001$) (Şekil 4.20).



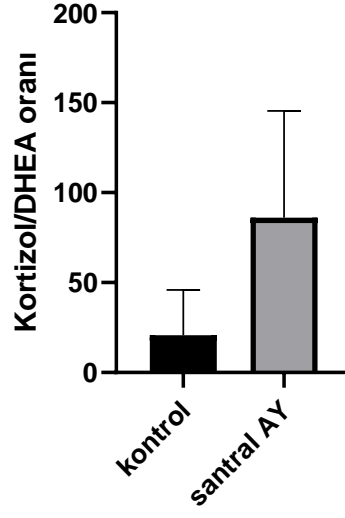
Şekil 4.20. Kontrol ve Santral AY gruplarında plazma DHEA düzeyleri.

Düşük doz ACTH stimülasyonu sonrası santral AY ve HPA intakt grupta bazal kortizol ve pik kortizol ve DHEA seviyeleri Tablo 4.3'te gösterilmiştir. Buna göre ortalama \pm SD, DHEA santral AY grubunda ($1,3 \pm 1,1$ ng/mL) kontrol grubuna göre ($9,1 \pm 10,1$ ng/mL) anlamlı olarak düşüktü.

Tablo 4.3. LDT yapılan iki grupta bazal ve pik kortizol düzeyleri ile DHEA düzeyleri.

	İntakt HPA)	Santral AY	P
Hasta sayısı (n=63)	27	36	
Bazal kortizol (nmol/L) Ort \pm SD	278 \pm 131	191 \pm 101	<0,05
Pik kortizol (nmol/L) Ort \pm SD	641 \pm 91	455 \pm 78	<0,0001
Plazma DHEA (ug/dL) Ort \pm SD	9,1 \pm 10,1	1,3 \pm 1,1	<0,0001

Daha sonra bazal kortizolün DHEA'ya oranı hesaplandı. Santral AY olan grupta bazal kortizolün DHEA'ya molar oranı daha yüksekti ($p<0,05$) (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Bazal kortizolün DHEA'ya molar oranı.

4.12. LC-MS/MS ile Tükürük Kortizolü Ölçüm Yönteminin Analitik Performansının Değerlendirilmesi

4.12.1. Analitik Ölçüm Limitleri

Kortizol içermeyen numunenin 20 tekrar ölçümü sonucunda ortalama ve standart sapmalar hesaplanmış olup, sonuçlar Tablo 4.4'de gösterilmiştir.

Tablo.4.4. Kör örnekte tükürük kortizolü sonuçları.

	Konsantrasyon (ng/mL)
Ortalama	0,00135
SD	0,00058

LoB değeri, ortalama kör + 1,645 x SD formülü ile hesaplandı ve 0,0023 ng/mL olarak bulundu.

LoD belirlemek için sinyal/gürültü (S/N) oranı kullanılmıştır. Sinyal/gürültü oranının 3 olduğu konsantrasyon seviyesi 0,0034 ng/mL olarak tespit edildi ve bu seviye LoD olarak kabul edildi.

Kantitasyon limiti, sinyal/gürültü (S/N) oranına dayalı olarak belirlenmiştir. Sinyal/gürültü oranının 10 olduğu konsantrasyon seviyesi 0,01 olarak tespit edildi ve kantitasyon limiti (LoQ) olarak kabul edildi.

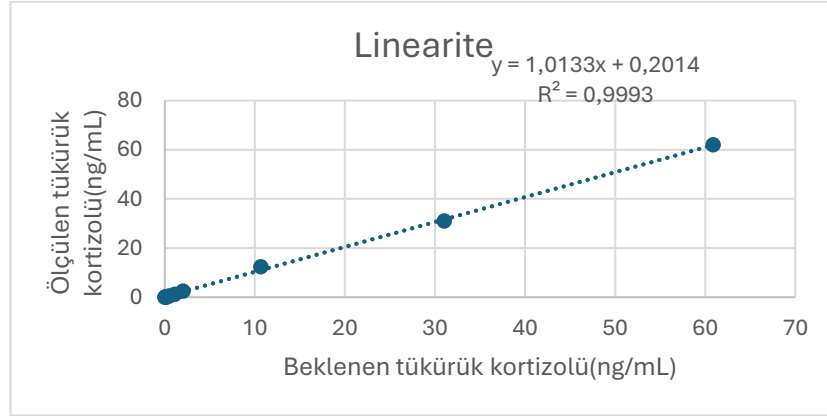
4.12.2. Linearite çalışması

Linearite çalışması için yüksek konsantrasyondaki havuzdan 1/2- 1/4000 oranında seri dilüsyon yapıldı (Tablo 4.5). $r=0,99$ ve $y=1,0133x+0,2014$ bulundu.

Tablo 4.5 Tükürük kortizolu için linearite çalışması sonuçları.

Dilüsyon	Beklenen tükürük kortizolu (ng/mL)	Ölçülen tükürük kortizolu (ng/mL)
0,5	60,9	62
0,25	31,04	31
0,1	10,66	12,4
0,02	2,04	2,48
0,01	1,12	1,24
0,005	0,51	0,62
0,002	0,25	0,24
0,001	0,14	0,12
0,0005	0,068	0,06
0,00025	0,025	0,03

Linearite grafiği Şekil 4.22'de görülmektedir.



Şekil 4.22. Tükürük kortizolu linearite grafiği.

Şekilden de görüldüğü gibi, tükürük kortizol ölçümü 0,03–62 ng/mL aralığında doğrusal bir ilişki göstermektedir.

4.12.3. %Geri elde çalışması

Geri elde çalışması için 5 ng/mL, 30 ng/mL ve 130 ng/mL konsantrasyonlarındaki standart numuneler kontrollere eklendi; %Geri elde, geri kazanılan konsantrasyonun eklenen konsantrasyona oranının 100 ile çarpılması ile saptandı (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Orta kortizol konsantrasyonlarında %geri elde sonuçları.

	Ölçülen (ng/mL)	Beklenen(ng/mL)	%Geri elde
St1(100 µL) + Kontrol(900 µL)	8,7	8,5	102
St2 (100 µL) + Kontrol(900 µL)	9,64	11	88
St3(100 µL) + Kontrol(900 µL)	19,38	21	92

%Geri elde, düşük konsantrasyonda %102, orta konsantrasyonda %88, yüksek konsantrasyonda ise %92 olarak tespit edildi. Oransal hata sırasıyla, -0,01, 0,36 ve 1,04 idi ve kabul edilebilir hatadan düşük bulundu.

4.12.4. İnterferans çalışması

Deksametazon (1 mg/mL) ve kortizon (1 mg/mL) ile yapılan interferans çalışmasında % bias değerleri Tablo 4.7’te verilmiştir.

Tablo 4.7. İnterferans çalışma sonuçları.

		ortalama	% bias
Deksametazon (150 µL)	Spiked örnek	0,554	7,7
	Spiked edilmemiş örnek	0,515	
Kortizon (150 µL)	Spiked örnek	0,67	17,1
	Spiked edilmemiş örnek	0,572	

İnterferans çalışmasında sabit hata Deksametazon için 0.03 ng/mL ve kortizon için 0,09 ng/mL olarak bulundu ve kabul edilebilir hatadan düşük olduğu izlendi.

4.12.5. Tekrarlanabilirlik Çalışması

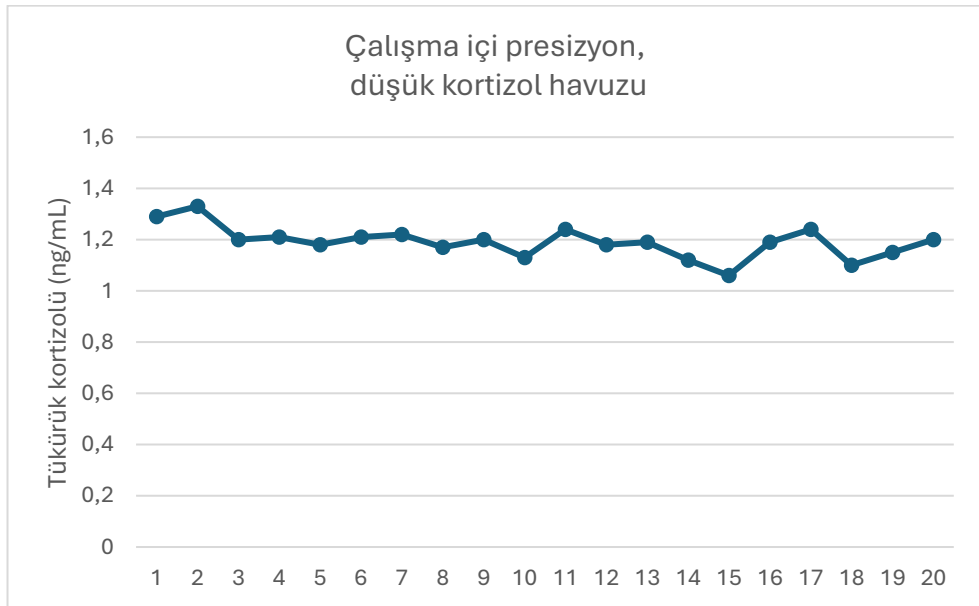
4.12.5.A. Çalışma içi tekrarlanabilirlik: Düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlardaki tükürük havuzlarından her biri için toplamda 20 ardışık ölçüm gerçekleştirildi. Bu ölçümlerden ortalama, SD ve %CV değerleri hesaplandı (Tablo 4.8).

Tablo.4.8. Çalışma içi tekrarlanabilirlik sonuçları.

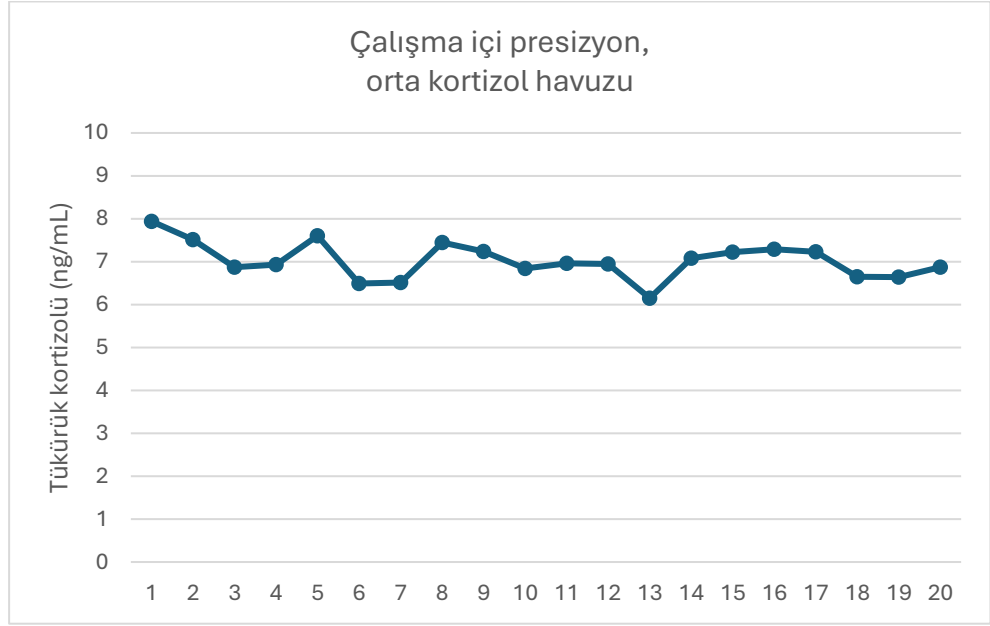
	Ortalama(ng/mL)	SD(ng/mL)	%CV
Düşük kortizol kontrolü	1,18	0,07	6,13
Orta kortizol kontrolü	6,9	0,36	5,29
Yüksek kortizol kontrolü	12,6	0,78	6,2

Çalışma içi tekrarlanabilirlik düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda <%7 olarak bulundu.

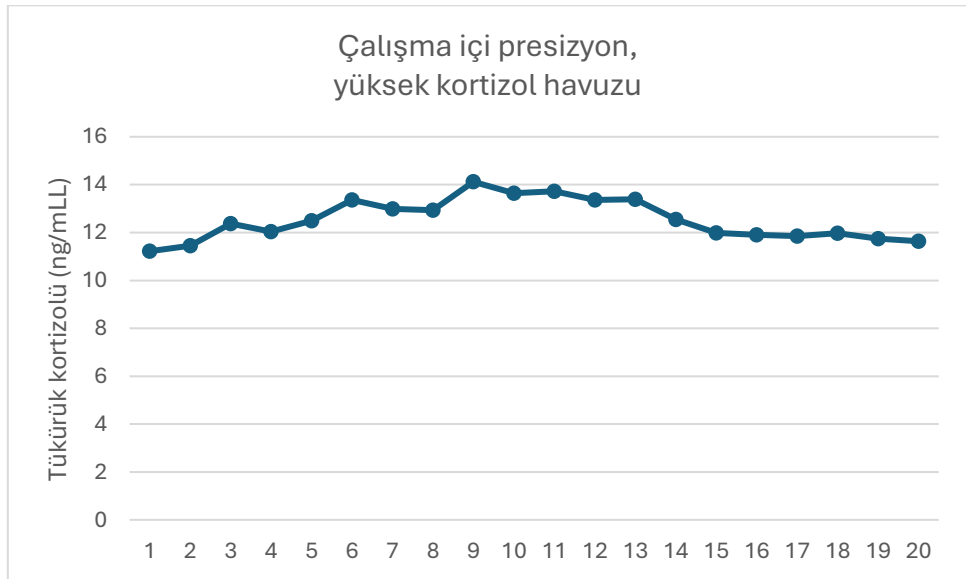
Şekil 4.26 a.b.c'de düşük, orta ve yüksek tükürük havuzunda çalışma içi tekrarlanabilirlik sonuçları gösterilmektedir.



Şekil 4.23.a. Düşük tükürük kortizol havuzunda tekrarlanabilirlik.



Şekil 4.23.b. Orta tükürük kortizol havuzunda tekrarlanabilirlik.



Şekil 4.23.c. Yüksek tükürük kortizol havuzunda tekrarlanabilirlik.

Çalışma içi tekrarlanabilirlik değerlendirmesinde, 2 ng/mL konsantrasyonundaki numune için SD 0,07 ng/mL ve %CV 6,13 olarak bulundu. 8 ng/mL konsantrasyonundaki numune için SD 0,36 ng/mL ve %CV 5,29; 16 ng/mL konsantrasyonundaki numune için ise SD 0,78 ng/mL ve %CV 6,2 olarak saptandı. Westgard tarafından kortizol için izin verilen toplam hata değeri %30 olarak belirtilmiştir.

Düşük konsantrasyon için izin verilen hata değeri $2 \text{ ng/mL} \times 0,3 = 0,6 \text{ ng/mL}$ dir. Bulunan SD 0.07 ng/ml idi. Hesaplanan Random hata (RE) $0,07 \text{ ng/mL} \times 4 = 0,28 \text{ ng/mL}$ olup, izin verilen hata değerinden düşüktür. Bu konsantrasyonda çalışma içi tekrarlanabilirlik kabul edilebilir düzeydedir.

Orta kortizol konsantrasyonu için izin verilen hata değeri $8 \text{ ng/mL} \times 0,3 = 2,4 \text{ ng/mL}$ 'dir. Bulunan SD 0,36'dır. RE $0,36 \times 4 = 1,44 \text{ ng/mL}$ olup, 2,4 ng/mL'nin altındadır. Bu konsantrasyonda, çalışma içi tekrarlanabilirlik kabul edilebilir düzeydedir.

Yüksek kortizol konsantrasyonu için izin verilen hata değeri $16 \text{ ng/mL} \times 0,3 = 4,8 \text{ ng/mL}$ 'dir. Bulunan SD 0.78'dir. RE $0,78 \times 4 = 3,12 \text{ ng/mL}$ olup, 4,8 ng/mL'nin altındadır. Bu konsantrasyonda, çalışma içi tekrarlanabilirlik kabul edilebilir düzeydedir.

4.12.5.B. Günler arası tekrarlanabilirlik

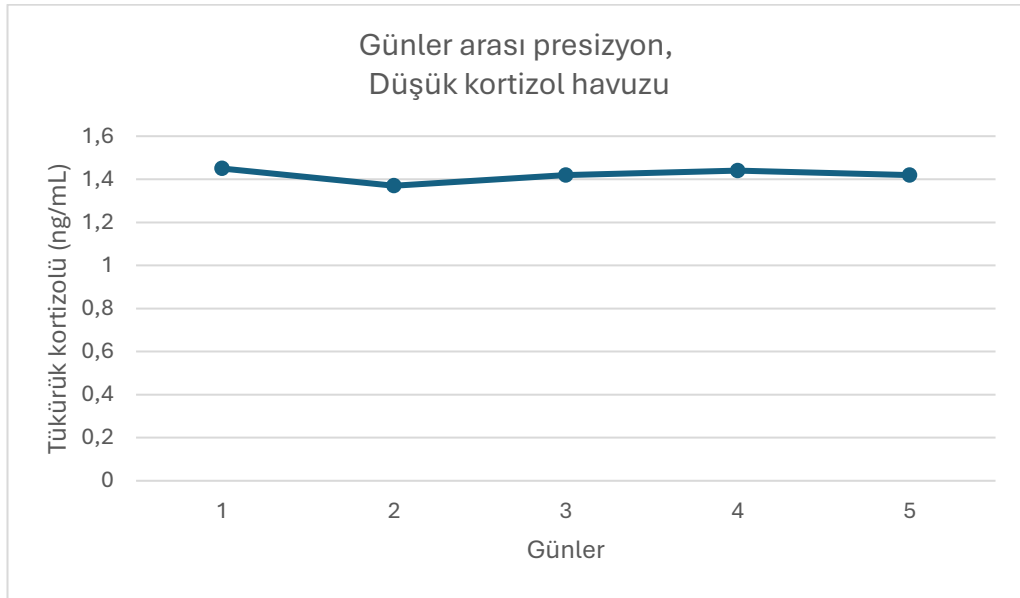
Günler arası tekrarlanabilirliği değerlendirmek amacıyla, düşük, orta ve yüksek konsantrasyona sahip spiked numuneler üzerinde analiz yapılmıştır. Bu numuneler, 5 gün boyunca her gün 4 ardışık ölçüm yapılacak şekilde test edilmiştir. Her bir ölçümün ortalaması ve SD hesaplanmış ve ardından %CV değerleri belirlenmiştir (Tablo 4.9).

Tablo.4.9. Günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları.

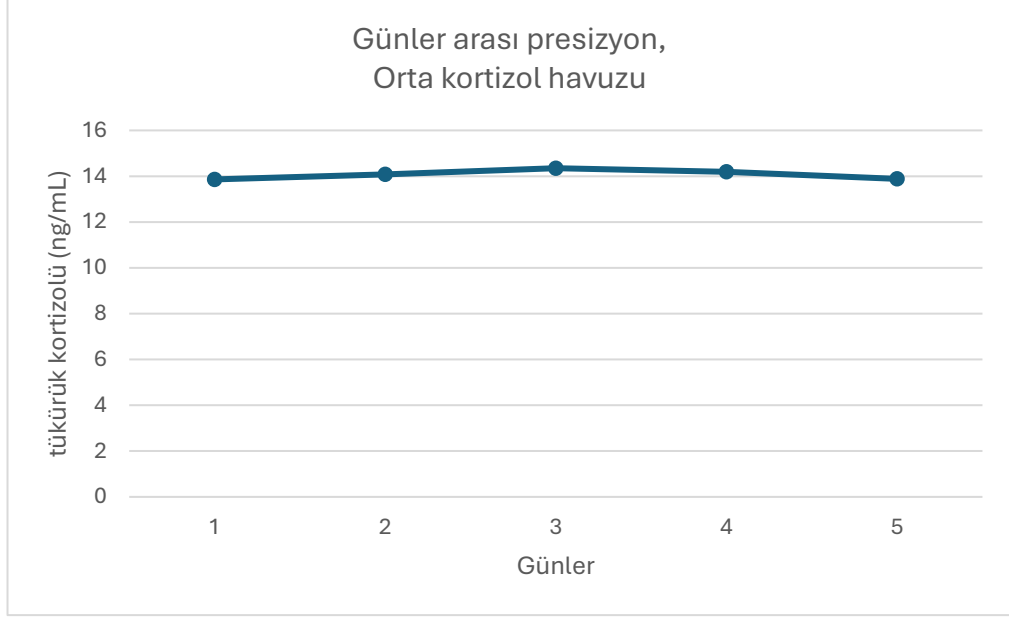
	Ortalama(ng/mL)	SD(ng/mL)	%CV
Düşük kortizol kontrolü	1,41	0,14	5,62
Orta kortizol kontrolü	8,6	0,4	4,7
Yüksek kortizol kontrolü	14	0,46	3,2

Günler arası tekrarlanabilirlik düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda <math><6\%</math> olarak bulundu.

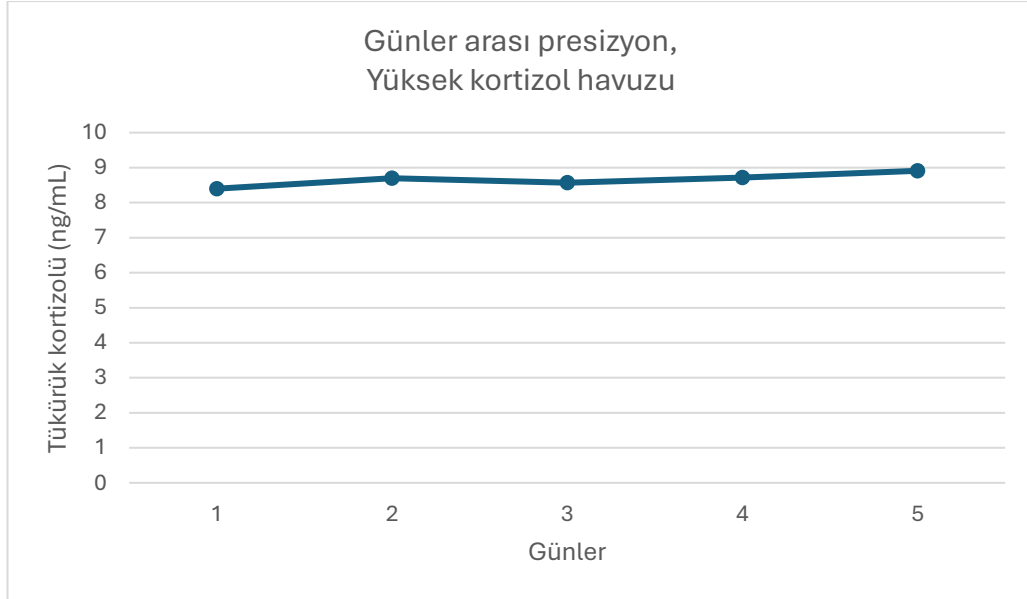
Şekil 4.24. a., b. ve c’de düşük, orta ve yüksek tükürük havuzunda günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 4.24.a. Düşük tükürük kortizol havuzunda günler arası tekrarlanabilirlik.



Şekil 4.24.b. Orta tükürük kortizol havuzunda günler arası tekrarlanabilirlik.



Şekil 4.24.c. Yüksek tükürük kortizol havuzunda günler arası tekrarlanabilirlik.

Düşük konsantrasyon (2 ng/mL) için SD 0,14 ng/mL ve %CV %10 olarak saptandı. İzin verilen hata değeri $2 \text{ ng/mL} \times 0,3 = 0,6 \text{ ng/mL}$ dir. Hesaplanan RE $0,14 \text{ ng/mL} \times$

4 = 0,56 ng/mL olup, izin verilen hata deęerinden dūřuktur. Bu konsantrasyonda çalıřma içi tekrarlanabilirlik kabul edilebilir dūzeydedir.

Orta konsantrasyon (8 ng/mL) için SD 0,4 ng/mL ve %CV %4,7 olarak bulundu. İzin verilen hata deęeri $8 \text{ ng/mL} \times 0,3 = 2,4 \text{ ng/mL}$ dir. Hesaplanan RE ise $0,4 \text{ ng/mL} \times 4 = 1,60 \text{ ng/mL}$ olup, izin verilen hata deęerinden dūřuktur. Bu konsantrasyonda çalıřma içi tekrarlanabilirlik kabul edilebilir dūzeydedir.

Yüksek konsantrasyon (16 ng/mL) için SD 0,46 ng/mL ve %CV, %3,2 olarak bulundu. İzin verilen hata deęeri $16 \text{ ng/mL} \times 0,3 = 4,8 \text{ ng/mL}$ olarak belirlenmiřtir. RE $0,46 \text{ ng/mL} \times 4 = 1,84 \text{ ng/mL}$ olup, izin verilen hata deęerinden dūřuktur. Bu konsantrasyonda çalıřma içi tekrarlanabilirlik kabul edilebilir dūzeydedir.

4.12.6. Taşıma (Carry over)

Carry over deneyi iki gruba ayrıldı ve ölçümler belirtilen sıra ile yapıldı. Grup ortalamaları ve standart sapmalar hesaplandı (Tablo 4.10). Grup ortalamaları arasındaki farkın toplam müsaade edilen hatadan dūřük olup olmadığı değerlendirildi.

Tablo 4.10. Tükürük kortizol ölçümünde taşıma sonuçları.

Örnek	Sonuç(ng/mL)	Grup1 sonuç(ng/mL)	Grup2 sonuç(ng/mL)
Y1	11,81		
Y2	11,54		
D1	1,17		1,17
D2	1,16	1,16	
D3	1,08	1,08	
Y3	12,52		
Y4	11,7		
D4	1,29		1,29
D5	1,33	1,33	
D6	1,17	1,17	
Y5	13,07		
Y6	13,53		
D7	1,31		1,31
D8	1,34	1,34	
D9	1,26	1,26	
Y7	14,17		
Y8	14		
D10	1,37		1,37
D11	1,34	1,34	
D12	1,39	1,39	
Y9	15,94		
Y10	14,86		
D13	1,39		1,39
D14	1,45	1,45	
D15	1,42	1,42	
Ortalama		1,294	1,306
SD		0,122583305	0,086486993

Bias 0,012 ng/mL olarak bulundu; bu değerin kabul edilebilir hatadan düşük olduğu saptandı.

4.12.7. Dondurup Çözmenin Etkisi

Dondurup çözmenin örnek stabilitesine etkisini değerlendirmek için, düşük ve yüksek tükürük havuzları kullanıldı; ilk analiz sonuçları ile don-çöz işleminden sonra elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı ve %bias hesaplandı. Elde edilen bulgular, Tablo 4.11 a ve b'de sunulmuştur.

Tablo 4.11.a. Düşük kortizol havuzunda don-çöz etkisinin değerlendirilmesi.

Düşük kortizol havuzu	İlk sonuç (ng/mL)	1 x don-çöz	2 x don-çöz	3 x don-çöz	4 x don-çöz	% bias
Örnek 1	1,09	1,12				2,75
Örnek 2	1,23		1,33			8,13
Örnek 3	1,2			1,55		29,17
Örnek 4	1,2				1,68	40

Düşük kortizol havuzunda ilk don-çözme sonrası %2,2 bias tespit edildi. İkinci don-çözme sonrası %8,13 bias bulundu. Üçüncü ve dördüncü don-çözme sonrası ise sırasıyla %29,17 ve %40 bias tespit edildi.

Tablo 4.11.b. Yüksek kortizol havuzunda don-çöz etkisinin değerlendirilmesi.

Yüksek kortizol havuzu	İlk sonuç (ng/mL)	1 x don-çöz	2 x don-çöz	3 x don-çöz	4 x don-çöz	% bias
Örnek 1	10,47	10,87				3,82
Örnek 2	11,3		12,4			9,73
Örnek 3	11,45			16,3		42,36
Örnek 4	11,37				16,28	43,18

Yüksek kortizol havuzunda ise ilk don-çözme sonrası %3,82 bias tespit edildi. İkinci don-çözme sonrası %9,73 bias bulundu. Üçüncü ve dördüncü don-çözme sonrası ise sırasıyla %42,36 ve %43,18 bias tespit edildi.

4.12.8. Matriks Etkisi Çalışması

Tükürük kortizol ölçümünde matris etkisini araştırmak için üç farklı konsantrasyondaki (5 ng/mL, 30 ng/mL ve 130 ng/mL) tükürük standartı, iki gruba ayrıldı ve bir gruba ekstraksiyon uygulanırken diğer gruba uygulanmadan kortizol ölçümleri yapıldı. Aşağıdaki formül kullanılarak matris etkisi hesaplandı (Tablo 4.12).

$$\% ME = \left(\frac{\text{Ekstrakte edilen örnek pik alan}}{\text{Ekstrakte edilmeyen örnek pik alanı}} - 1 \right) \times 100$$

Tablo 4.12. Tükürük kortizol ölçümünde matris etkisi.

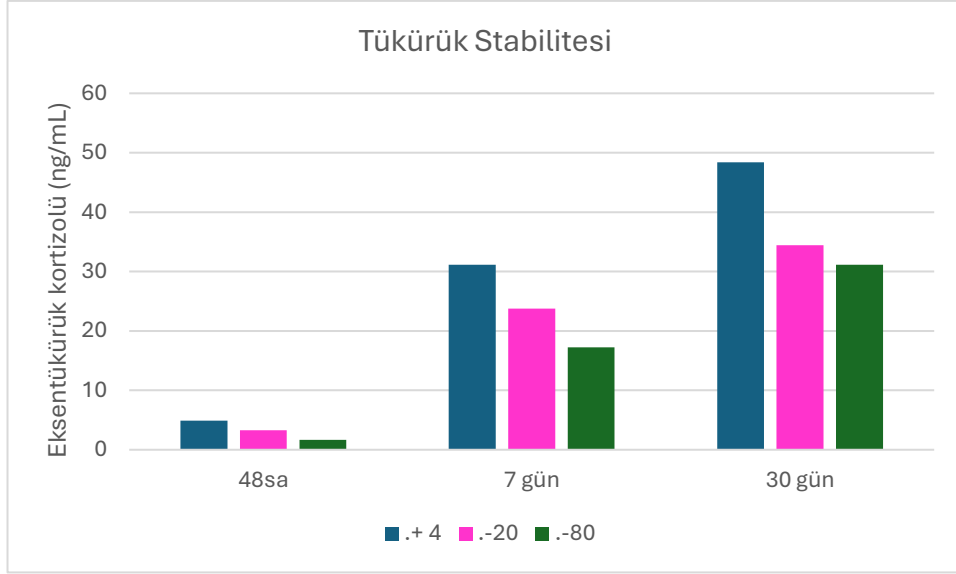
	Pik alanı		%Matriks etkisi
	Ekstrakte edilmeyen	Ekstrakte edilen	
Standart-1	8.862	9.078	2,43
Standart-2	3.712	3.544	-4,52
Standart-3	2.108	2.371	12,4

Matriks etkisi, düşük konsantrasyonda %2,43, orta konsantrasyonda %-4,52, yüksek konsantrasyonda ise %12,4 olarak bulundu. Bu sonuçlar, 5 ng/mL, 30 ng/mL ve 130 ng/mL konsantrasyonlarında önemli bir matriks etkisinin olmadığını göstermektedir.

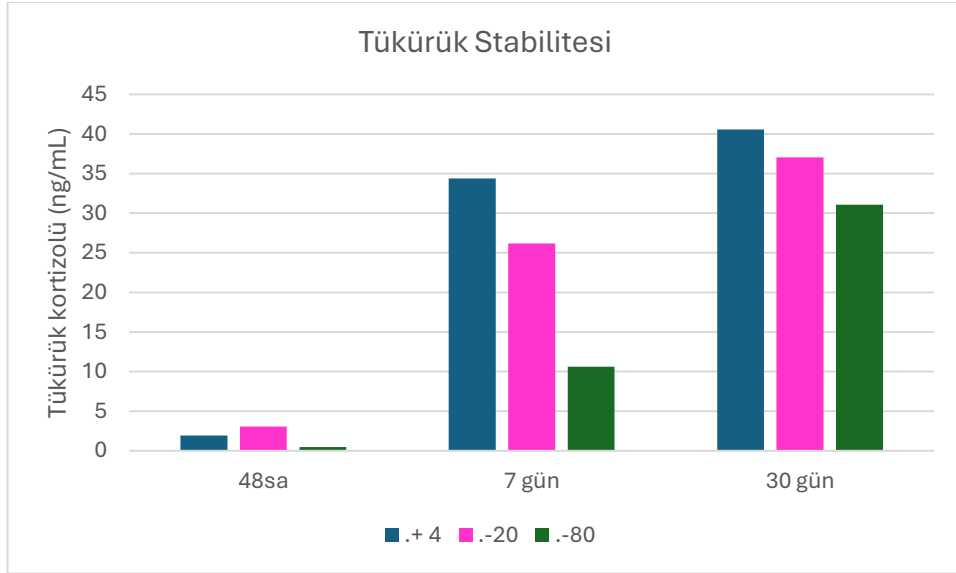
%Matriks etkisi %15'in altında olduğu saptandı.

4.12.9. Örnek Stabilite Çalışması

Örnek stabilite çalışması için düşük ve yüksek konsantrasyondaki tükürük havuzu örnekleri -80°C, -20°C ve 4°C'de saklandı ve 48. Saat, 7. gün ve 30. günde kortizol ölçüldü. Sonuçları ve hesaplanan %bias değerleri Şekil 4.25 a ve b'de sunulmuştur.



Şekil 4.25.a. Düşük tükürük kortizol havuzu için örnek stabilitesinin değerlendirilmesi.



Şekil 4.25.b. Yüksek tükürük kortizol havuzu için örnek stabilitesinin değerlendirilmesi.

Örnek stabilitesi düşük tükürük kortizolü için 4°C’de bias, ilk 48 saatte %5 iken, 7. günde %31 ve 30. günde %48 olarak saptandı; , -20°C’de bias, ilk 48 saatte %3 iken, 7. günde %23 ve 30. günde %34 olarak bulundu., -80°C’de ortalama bias, ilk 48 saatte %1,6 iken, 7. günde %17 ve 30. günde %31 olarak saptandı.

Benzer şekilde, örnek stabilitesi yüksek tükürük kortizolü için, 4°C’de bias, ilk 48 saatte %2,8 iken, 7. günde %34 ve 30. günde %40 idi. , -20°C’de bias ilk 48 saatte %2,5 iken, 7. günde %26 ve 3. günde %37 olarak bulundu., -80°C’de ortalama bias ilk 48 saatte %0,4 iken, 7. günde %10 ve 30. günde %31 olarak saptandı.

Bu sonuçlar, tükürük örneklerinde kortizol ölçümünün örnek toplanmasından itibaren ilk 48 saat içinde yapılması gerektiğini göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Santral AY yaşamı tehdit eden bir hastalıktır ve ACTH üretimi yetersiz olduğunda ve düşük kortizol seviyelerine yol açtığına ortaya çıkar. Kortikosteroidler stres ve inflamatuvar koşullar altında birçok metabolik yanıt için hayati önem taşıdığından, santral AY'nin erken tanısı ve hızlı tedavisi hayati önem taşır. Ancak, santral AY tanısı kolay değildir. Ayrıca santral AY'nin doğru tanımlanması, yanlış tedavilerin ve komorbiditelerin önlenmesi açısından da önemlidir.

Klinik kılavuzlara göre sabah bazal kortizol ölçümü ilk basamak testidir; ancak altın standart, provokatif testlerdir. En yaygın kullanılan test ACTH stimülasyon testidir. Bu çalışmada, düşük doz ACTH testi uygulanan 1-18 yaş arası şüpheli santral AY hastalarının kesin tanısında, tükürük kortizol ölçümü için hassas ve spesifik kütle spektrometre metodu geliştirildi laboratuvara kazandırıldı ve analitik doğrulaması yapıldı.

Düşük doz ACTH testi (LDT), özellikle çocuklar için kolay ve güvenilir bir testtir. Endokrinoloji polikliniklerinde düşük ve yüksek doz ACTH testi HPA eksenini değerlendirmede yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan önceki metanaliz ve çalışmalar (44,45), yüksek (250 µg) ve düşük (1 µg) doz ACTH stimülasyon testlerinin benzer tanısal doğruluğa sahip olduğunu bildirmiş olsa da Ceccato ve arkadaşları, yüksek doz ACTH kullanıldığında adrenal yanıtın korunabileceğini ve yanlış negatif sonuçlara neden olabileceğini belirttiler (46). Kazlauskaitė ve arkadaşları 1966-2006 yıllarını kapsayan bir meta-analizde düşük ve standart doz ACTH testlerinin tanısal doğruluğunu karşılaştırdılar ve AUC'yi sırasıyla 0.92 (95% CI, 0.89–0.94) ve 0.79 (95% CI, 0.74–0.84) olarak buldular; buna göre düşük doz ACTH testinin AY tanısında daha üstün olduğunu bildirdiler (47). Hastanemizde çocuk hastalara LDT uygulanmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada LDT yapılan çocuk hastaların 0., 20., 30. ve 40. dakikalardaki tükürük kortizol yanıtı değerlendirildi. Pik serum kortizolü <19.8 µg/dL (546 nmol/L) olan hastalar AY olarak tanımlandı.

Tükürük kolay toplanabilen bir biyolojik materyaldir. Tükürük kortizolü, dolaşımdaki kortizolün %5-8 oranındaki serbest fraksiyonunu yansıtır (48,55). Tükürük kortizolü serum CBG konsantrasyonundan etkilenmez (49, 50). Bu nedenle özellikle çocuklar, yaşlı ve kan örneği alınması zor hastalar için ve ayrıca kortizol bağlayıcı proteinini etkileyen ilaç kullanan hastalar için uygun bir materyaldir. Örnekler oda sıcaklığında haftalarca stabil kalabilir (51) ve kortizol konsantrasyonu tükürük akış hızından bağımsızdır (52,53,54). Bu sebeplerle, bu çalışmada çocuk hastalardan tükürük örnekleri prosedüre uygun şekilde alınarak kortizol ölçümünde kullanıldı.

Çalışmamızda HPA eksenini değerlendirmek için ilk olarak kontrol ve santral AY grubunda sabah erken serum kortizolü ölçüldü ve santral AY grubunda anlamlı düşük olduğu saptandı. ($p<0,001$). Bazal plazma ACTH düzeylerinin santral AY grubunda beklendiği şekilde anlamlı derecede düşük olduğu bulundu ($p<0,0054$). Bunun yanı sıra, 24 saatlik idrar serbest kortizolünün anlamlı derecede düşük olması da rezervlerin yetersiz olduğunu gösterdi ($p<0,001$).

Bu çalışmada tükürük kortizol ölçümü için sensitif bir LC-MS/MS metodu geliştirildi ve LDT'ye tükürük kortizol pikinin hasta ve kontrol grubunun >95 'inde 40. dakikada olduğu saptandı; kalanlarda ise 30. dakikada izlendi. Sadece hasta grupta, 3 hastada 20. dakikada tükürük kortizol piki saptandı.

Santral AY tanısı için ACTH testi yapılan hastalarda, kütle spektrometresi ile tükürük kortizol yanıtını değerlendiren az sayıda çalışma literatürde bildirilmiştir: Perogamvros ve arkadaşları, yüksek (250 μg) doz ACTH testi uygulanan hastalarda (konjenital adrenal hiperplazisi olan, kronik glukokortikoid tedavisi alan, hipofiz veya adrenal cerrahisi geçiren) tükürük kortizol ölçümünün yüksek seçicilik ve duyarlılığa sahip olduğunu bildirdiler (56). El-Farhan ve arkadaşları, standart (250 μg) doz ACTH testi uyguladıkları hastalarda tükürük kortizolünü GC-MS ile ölçtüler ve avantajlarını göz önüne alarak santral AY tanısı için önerdiler (57). Bir diğer çalışmada AY tanısı için standart (250 μg) ve düşük (1 μg) doz ACTH testlerinde tükürük ve serum kortizol pikinin 60. dakikada olduğu bildirildi (58). Bu bulgular, bizim sonuçlarımız ile uyumludur.

Çalışmamızda ayrıca LDT'ye tükürük kortizolü ile serum kortizolü ile arasındaki uyum araştırıldı. LDT'nin tüm dakikalarında tükürük kortizolü ile serum kortizolü arasında güçlü bir korelasyon bulundu ($r=0,83$, $p<0,001$); pik değerlerde ise orta derecede bir korelasyon saptandı ($r=0,65$, $p<0,001$). Kim ve arkadaşları, tükürük kortizolü ile yüksek doz (250 µg) stimülasyon sonrası ve bazal serum kortizolü arasında anlamlı korelasyon bildirdiler; r^2 değerleri sırasıyla 0,75 ve 0,53 ($p<0,001$) idi (59). Bir başka çalışmada, LDT uyguladıkları tükürük kortizolü ile serum kortizolü arasında eksponansiyel modelde lineer modele göre daha yüksek korelasyon olduğu gösterildi (sırasıyla $r^2 = 0,83$ ve $r^2 = 0,64$, $p<0,0001$) (56).

Elder ve arkadaşları, yüksek ve düşük doz Synacthen uygulaması sonrası 60. dakikada güçlü bir korelasyon bildirdiler ($r = 0,89$, $p<0,001$) (58). Bir diğer çalışmada, Tan ve arkadaşları, yüksek (250 µg) doz stimülasyonun ardından tükürük kortizolü ile serum kortizolü arasında güçlü korelasyon saptadılar ve tüm zaman noktalarında, pik düzeyde ve 60. dakikada r^2 değerlerini sırasıyla 0,74, 0,72 ve 0,72 buldular ($p<0,001$) (60). Tüm bu bulgular, bizim sonuçlarımızla uyumludur.

Bu çalışmada, tükürük kortizol ölçümünün tanısal doğruluğunu değerlendirmek üzere LDT'nin 0.,20.,30. ve 40. dakikaları, pik düzeylerde ve tüm dakikalar için ROC analizi yapıldı. 40. dakika tükürük kortizol seviyeleri için AUC 0,82 (95% CI, 0,71–0,93) iken, pik düzeylerde 0,74 olarak bulundu (95% CI: 0,616–0,87). Youden indeksi kullanılarak türetilen kesim değeri ilkinde 12 nmol/L (%82 duyarlılık ve %77 özgüllük) ve pik düzeyde 11,99 nmol/L (%78 duyarlılık ve %74 özgüllük) olarak saptandı. Hem 40. dakikada hem de pik kortizol seviyeleri için elde edilen kesim değerinin çok yakın (12 nmol/L) olduğu görülmektedir. Bu bulgular hipotalamus-hipofiz-adrenal eksenini değerlendirmede tükürük kortizolünün tandem MS ile ölçümünün yüksek tanısal doğruluğa sahip olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda, LDT'nin 40. dakikasında elde edilen 12,0 nmol/L tükürük kortizol kesim değeri santral AY tanısı için yüksek tanısal duyarlılık ve özgüllük gösterdi. Cornes ve arkadaşları, AY şüphesi olan ve 250 µg ACTH verilen erişkin hastalarda, 550 nmol/L'lik pik serum kortizol değerini kullanarak AY'yi tanımladılar ve 40. dakikada tükürük kortizolü için kesim değerini 15 nmol/L olarak bildirdiler (61). Bir

başka çalışmada, Langelaan ve arkadaşları, AY şüphesi olan ve intravenöz yüksek (250 µg) doz ACTH uygulaması yapılan 129 hastada, AY tanısını 550 nmol/L pik serum kortizol değerlerine göre koydular ve AY tanısı için 60. dakikada tükürük kortizolü kesim değerini 15,6 nmol/L olarak bildirdiler (55).

Bir diğer çalışmada, 250 µg Synacthen testi sırasında serum ve tükürük kortizol seviyeleri arasında, 550 nmol/L serum kortizol kesim değeri alınarak, iyi bir korelasyon olduğu gösterildi ve AY tanısı için 60. dakikada 16,0 nmol/L'lik bir tükürük kortizol kesim değeri önerildi (60). AY şüphesi olan ve 250 µg ACTH verilen 120 hastayı içeren bir başka çalışmada, pik serum kortizol değeri >496,8 nmol/L olanlar AY olarak tanımlandı ve tükürük kortizolü için 13,2 nmol/L'lik bir kesim değeri bildirildi; duyarlılık %90,7 idi (59).

Bu çalışmalardaki kesim değerlerinin bizim tespit ettiğimiz değere yakın ancak biraz daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu farklılığın nedeni, bu çalışmaların tümünde yüksek doz ACTH testi uygulanması olabilir. Ayrıca tükürük kortizol ölçüm yöntemlerindeki farklılıklar ya da AY tanımlarındaki farklılıklar da bir başka neden olabilir.

Bu çalışma gösterdi ki, LDT'nin 40. dakikasında tükürük kortizolünün 12,0 nmol/L'den büyük olması, santral AY'yi dışlamak için yeterli olabilir. Bu kesim değerinin kullanılması, şüpheli AY vakalarında gereksiz tedavilerin önlenmesi açısından da önemli olabilir.

Ayrıca, elde edilen veriler göz önüne alındığında, LDT sırasında sadece bazal ve 40. dakikadaki tükürük kortizol düzeylerinin ölçümünün, daha hızlı ve kolay santral AY tanısı konmasında etkin olabileceği düşünülebilir.

Bu çalışmanın önemli hedeflerinden biri, tandem MS ile tükürük kortizol ölçümünün analitik performansının değerlendirilmesiydi ve CLSI kurallarına uygun olarak gerçekleştirildi.

Linearite çalışmasında yüksek tükürük havuzu ile hazırladığımız standart ile linear aralığın 0,03- 62 ng/mL olduğunu tespit ettik. Korelasyon katsayısını 0,99 bulduk. S/N oranının 3 olduğu konsantrasyonu tayin limiti (LoD) olarak belirledik (0,0034 ng/mL). Kantitasyon limiti (LoQ) olarak ise S/N oranının 10 olduğu konsantrasyonu aldık (0,01 ng/mL). Böylece tükürük kortizolü için alt ölçüm limitlerini tespit ettik.

Metot kesinliğini saptamak için tekrarlanabilirlik çalışmaları yapıldı. Bu çalışmalar lineer aralıkta, düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlardaki tükürük havuzları kullanılarak yapıldı. Çalışma içi tekrarlanabilirlik için %CV değeri düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda sırasıyla %6,1, %5,2 ve %6,2 olarak hesaplandı. Günler arası tekrarlanabilirlik için %CV, aynı konsantrasyonlarda %5,6, %4,7 ve %3,2 olarak hesaplandı. Hem çalışma içi hem de günler arası tekrarlanabilirliğin kabul edilebilir hatadan düşük olduğu saptandı.

Son konsantrasyonu lineer aralığı kapsayacak şekilde düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlardaki tükürük havuzu ile geri elde çalışması yapıldı ve %geri elde sırasıyla %102, %88 ve %92 bulundu. Oransal hata sırasıyla -0,01, 0,36 ve 1,04 olarak tespit edildi ve tümünün kabul edilebilir hatadan düşük olduğu saptandı.

Deksametazon ve kortizon ile yapılan interferans çalışmasında ise bias, sırasıyla, %7 ve %17 olarak bulundu. Sabit hata Deksametazon için 0,039 ng/mL ve kortizon için 0,098 ng/mL olarak hesaplandı ve kabul edilebilir hatadan düşük olduğu tespit edildi.

Kütle spektrometrik ölçümde, ekstrakte edilmiş tükürük örneklerinin ölçüm sırasında birbirini etkileyip etkilemediğini saptamak için yapılan 'carry over' çalışmasında, bias 0,012 ng/mL olarak tespit edildi ve kabul edilebilir hatanın altında bulundu. Yani, hasta sonuçlarını etkileyecek ölçüde bir taşıma etkisi saptanmadı.

Dondurup çözürmenin örnek stabilitesine etkisini incelemek için düşük ve yüksek konsantrasyondaki tükürük havuzu ile 4 defa don-çöz yapıldı. Bias düşük konsantrasyonda %2,7, %8,1; %29,1 ve %40 iken, yüksek konsantrasyonda %3,8, %9,7, %42 ve %43 olarak saptandı. Bias değerleri %10'un altında olduğu için, tükürük örneklerinin en fazla 2 defa don-çöz yapılması önerilir.

Düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlardaki tükürük havuzunda matriks etkisi sırasıyla %2,3, %-4,57 ve %12,4 olarak bulundu; %Matriks etkisi %15'in altında olduğu saptandı, bu da aktif karbonla muamele edilmiş insan tükürük örneğinden yapılan kortizol ölçümünün güvenilirliğini ve doğruluğunu desteklemektedir.

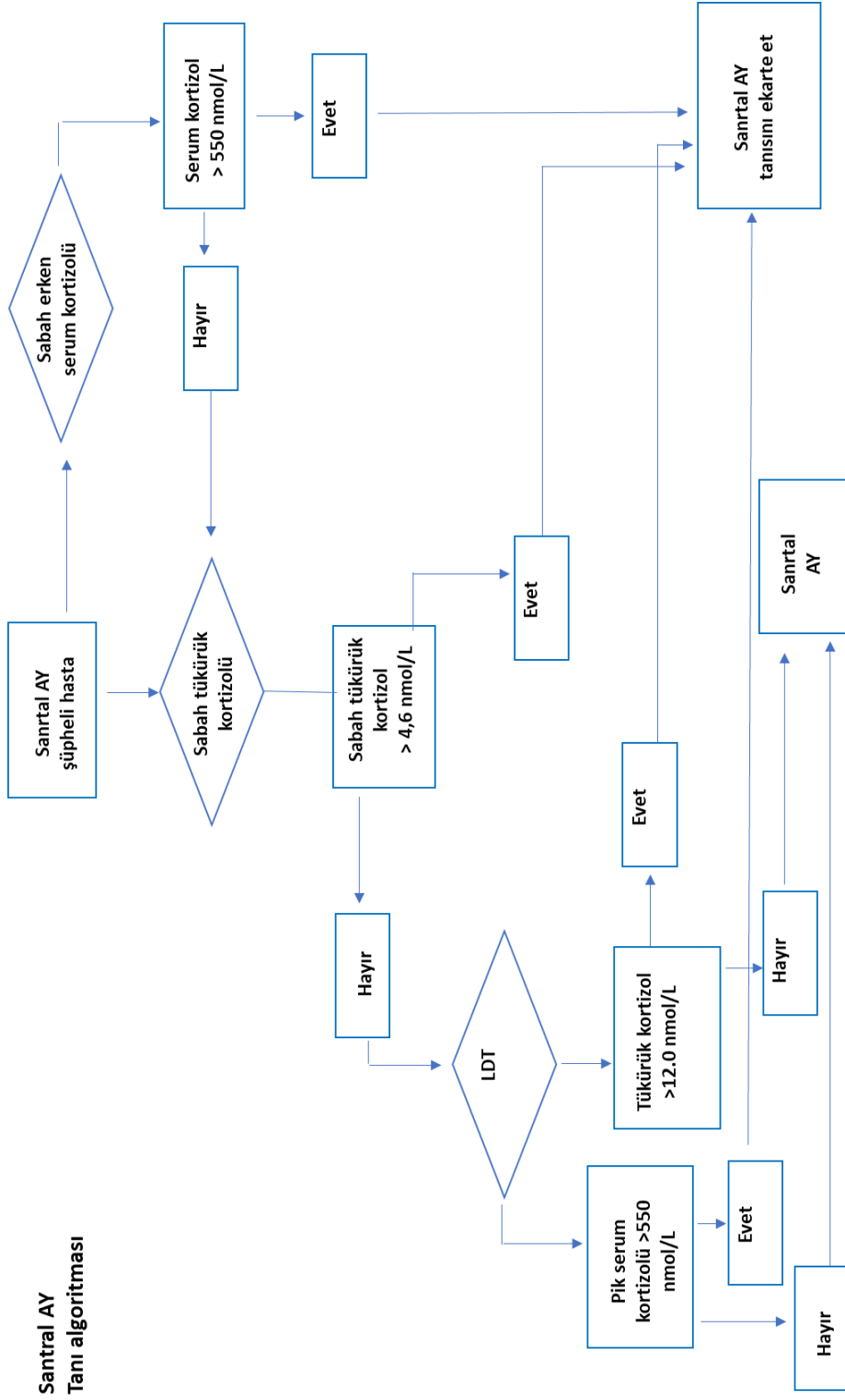
Stabilite çalışmasında, düşük ve yüksek tükürük kontrol örnekleri -80°C, -20°C ve 4°C'de saklandı ve 48. saat, 7. gün ve 30. günde kortizol düzeyleri ölçüldü. Düşük kontrolde 48. saatte -80°C'de bias %1,6, -20°C'de %3 ve 4°C'de %5 iken, 30. günde bias sırasıyla %31, %34 ve %48 bulundu. Yüksek kontrol için de benzer sonuçlar izlendi. Bu sonuçlar, tükürük örneklerinde kortizolün ilk 48. saatte ölçülmesi gerektiğini, saklanması gerekli olan durumlarda mutlaka -80°C'de saklanması gerektiğini göstermektedir.

Elde edilen bütün bu kanıtlar LC-MS/MS tükürük kortizol yönteminin analitik performansının yeterli olduğunu ve rutin klinik laboratuvarlarda güvenilir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

Bu kohort, pik tükürük kortizol (40.dakika) seviyelerinin AY tanısı için yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğunu göstermektedir.

İlginç bir şekilde, erken sabah tükürük kortizol düzeyleri santral AY grubunda ve kontrol grubunda anlamlı farklılık göstermiş olup yüksek bir tanısal duyarlılığa (%76) sahipti. Bu nedenle, sabah erken saatlerde yapılan tükürük kortizol ölçümü, ACTH testine ihtiyaç olup olmadığını belirlemede önemli bir rol oynayabilir.

Elde edilen kanıtlara göre, hassas ve özgül LC-MS/MS metodu ile tükürük kortizol ölçümünün HPA eksenini değerlendirmede çocuklarda serum kortizolüne iyi bir alternatif olabileceği ileri sürülebilir. Bu bağlamda, yeni bir algoritma öneriyoruz (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. HPA eksenini değerlendirmede algoritma.

Kısaca, bir çocuk hastada santral AY şüphesi varsa, sabah erken bazal serum kortizol ölçümü ilk basamak test olarak uygulanmalıdır. Eğer bazal serum kortizol seviyesi 550 nmol/L'nin üzerinde ise santral AY tanısından uzaklaşılabilir. Ancak bu eşik değerin altında bir serum kortizol düzeyi saptanırsa, sabah erken tükürük kortizol ölçümü yapılabilir. Eğer sabah tükürük kortizol seviyesi 4,6 nmol/L'nin üzerinde ise santral AY tanısından uzaklaşılır. Bu düzeyin altında tükürük kortizol ölçümü bulunursa, ACTH stimülasyon testi yapılmalıdır. ACTH stimülasyon testi sonucunda pik serum veya tükürük kortizol konsantrasyonları tanıyı belirleyecektir.

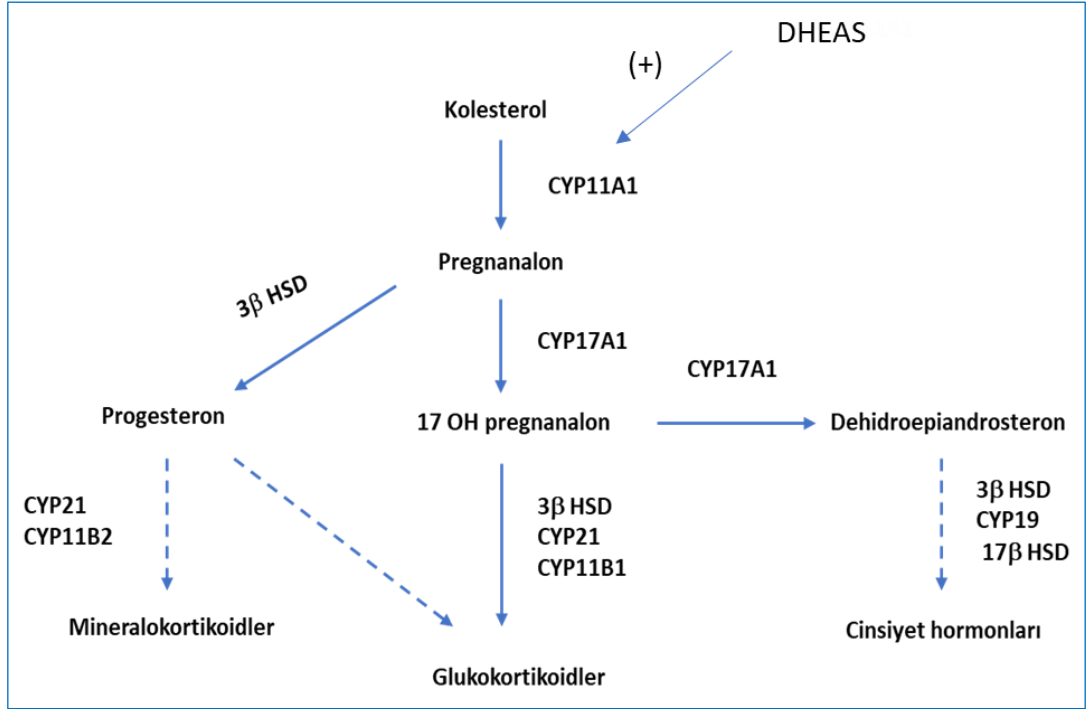
Ayrıca, bazal tükürük kortizol ölçümü, ACTH stimülasyon testi için hastaları belirlemek amacıyla da kullanılabilir.

Plazma (veya tükürük) kortizolü eşik değerin altında olan hastalara kılavuzlara göre ACTH stimülasyon testi uygulanır (62).

Bu çalışmadaki bir diğer hipotez “plazma DHEA ve DHEA-S konsantrasyonunun düşüklüğü erken dönem santral AY tanısı için önemlidir” hipotezi idi.

Bu çalışmada, HPA eksenini sağlam grupta ve santral AY grubunda bazal plazma DHEA ve DHEA-S konsantrasyonları tandem MS yöntemiyle tayin edildi. Analitik aralık sırasıyla, 15-85,290 µg/dL ve 0,1-500 ng/mL idi. Ölçüm sensitivitesi ise 1,5 ng/mL ve 0,1 ng/mL idi. Her iki grup arasında bazal DHEA-S ve DHEA düzeyleri arasında anlamlı fark olup olmadığı araştırıldı ve ayrıca plazma DHEA-S'nin santral AY erken tanısında tanısal doğruluğu araştırıldı.

DHEA-S, dolaşımdaki en yüksek konsantrasyona sahip steroid hormondur ve genellikle 20-30 yaşları arasında en yüksek seviyesine ulaşır; yaşla birlikte azalır. Neunzig ve arkadaşları, DHEA-S'in steroid hormon sentezinin ilk basamağını stimüle ettiğini gösterdi.



Şekil 5.2 Steroid hormon sentezi.

CYP11A1, kolesterolün pregnanolona dönüşümünü sağlayan ve steroid sentezinde hız kısıtlayıcı basamak olan önemli bir enzimdir. Bu nedenle, steroid sentezinin regülasyonu için hedef enzimdir (63).

Adrenal androjenler, başlıca ACTH'nin regülasyonu ile zona retikulariste sentezlenirler. Bu nedenle, adrenal androjen ölçümü HPA aksının bütünlüğünü değerlendirmede alternatif bir yöntem olabilir.

Önceki çalışmalarda, DHEA-S ölçümünün santral AY tanımlanmasında önemli olabileceği bildirildi (64). 1987'de Yamaci ve arkadaşları 84 santral AY hastasında serum DHEA-S düzeylerinin %95'inde düşük olduğunu saptadılar. Sekonder AY olan hastalarda serum DHEA-S seviyelerinin azalmasının kortizol seviyelerine göre daha fazla olduğunu buldular. Araştırmacılar, serum DHEA-S düşmesinin sekonder AY'de yetersiz ACTH salgılanmasını yansıttığını ileri sürdüler ve serum DHEA-S ve kortizolün eş zamanlı ölçümünün sekonder AY tanısı için yararlı olacağını ileri sürdüler.

Amaretti ve arkadaşları, 24 hipopituitarik hastada düşük (1 µg) doz ve standart (250 µg) doz ACTH stimülasyonu sonrası serum kortizol, DHEA ve aldosteron yanıtlarını incelediler. Santral AY olan hastalarda, kontrollere göre serum kortizol ve DHEA düzeylerinin düşük olduğunu gözlemlediler ve bunun, kortikotropin eksikliğinden kaynaklanan adrenal fonksiyon bozukluğu olduğunu bildirdiler. Aynı çalışmada, aldosteron düzeylerinde bir değişiklik gözlenmedi.

DHEA ve DHEA-S, adrenal korteksin zona retikularisinde çocukluk döneminde sentezlenir ve ilk kez 1943 yılında idrarda 17-keto steroidler olarak Talbot tarafından tespit edilmiştir. Adrenarş, hayatın ilk beş yılında başlayan bir süreçtir (65).

DHEA sentez ve metabolizması, 17,20-liyaz, 17-α hidroksilaz, 3 beta-hidroksisteroid dehidrogenaz 2 (3β-HSD2) ve DHEA-sülfotransferaz enzimleri ile düzenlenir. İlk iki enzim, steroidogenezi adrenarş süresince artırır. 17,20-liyaz, androjen üretimi için gereklidir. Yaklaşık 40 yıl önce, kortizolün adrenarşın başlaması ile ilişkili olduğu hipotezi ortaya atıldı. Kahri ve arkadaşları, 1989 yılında primer adrenal kortikal hücre kültürlerinde yüksek doz kortizol ile muamele edilmesinin androjen sentezini artırdığını gösterdiler (66).

Bu çalışmada, bazal plazma DHEA-S konsantrasyonunun santral AY grubunda HPA sağlam gruba göre anlamlı derecede düşük olduğu saptandı (p<0,001).

Santral AY varlığında serum DHEA düzeylerinin düşük olduğu ve bunun santral AY tanısında önemli bir rol oynayabileceği bildiren başka çalışmalar da mevcuttur. Kassem ve arkadaşları, santral AY tanısında serum DHEA-S ve DHEA düzeylerinin önemli rolünü vurguladılar. Ayrıca, araştırmacılar, yaş ve cinsiyet uyumlu serum DHEA ve DHEA-S düzeylerinin, sağlam adrenal korteks fonksiyonunun bir göstergesi olabileceğini ileri sürdüler (67).

Fischi ve arkadaşları, yaş ve cinsiyet uyumlu Z-skoru kullanarak serum DHEA-S değerlerinin HPA fonksiyonunu yansıtmadaki etkinliğini araştırdılar. HPA fonksiyonu normal olmayan bireylerde düşük DHEA-S Z-skoru bildirdiler. Hipofiz tümörü olan hastalar ve gençlerde DHEA-S Z-skorunun, HPA ekseninin bütünlüğünün değerlendirilmesinde kullanılabileceğini önerdiler (68).

2003 yılında yapılan bir çalışmada, LDT yapılan santral AY hastalarında normal kortizol yanıtına rağmen düşük plazma DHEA düzeyleri saptandı. Aynı çalışmada, yaş ve cinsiyet uyumlu DHEA-S düzeylerinin santral AY'yi ekarte etmede %100 duyarlılığa sahip olduğu bildirildi (64).

Çalışmamızda ayrıca LDT yapılan çocuklarda bazal plazma DHEA-S'in tanısal doğruluğunu saptamak için ROC analizi gerçekleştirdik ve AUC değerini 0,80 (CI 0,679-0,912) tespit ettik. Böylece, bu çalışmadaki verilere göre, %77 duyarlılık ve %92 özgüllüğe sahip 17,5 µg/dL bir kesim değeri belirledik.

2003 yılında Nasrallah ve arkadaşları, anormal HPA eksenine sahip grupta düşük DHEA-S düzeyleri belirlediler ve düşük serum DHEA-S düzeylerinin sağlam olmayan HPA eksenini yansıttığını ileri sürdüler (69). Tanısal doğruluk çalışmasında AUC değerini 0,98 (CI 0,962-1,00) olarak belirlediler ve 19,6 µg/dL kesim değeri önerdiler. Bu çalışmada tespit edilen kesim değeri bizim bulduğumuz değere yakın olduğu görülmektedir.

Ayrıca, bu çalışmada bazal plazma DHEA düzeylerinin santral AY grubunda kontrollere göre anlamlı olarak düşük olduğu tespit edildi ($p<0,001$).

Klinik uygulamalarda kardiyoloji ve diğer kliniklerde kronik hastalıkların tanı ve takibi için kortizol/DHEA oranı önerilmiş ve kullanılmıştır (70,71); bu oran “molar kortizol oranı” olarak da ifade edilmektedir.

Kassem ve arkadaşları, santral AY hastalarında bazal ve stimüle edilmiş serum DHEA ve kortizol düzeylerini değerlendirmek için molar kortizol/DHEA oranını önerdiler. Araştırmacılar, HPA eksenini sağlam olan bireylerde bu oranın düşük olduğunu, ancak AY varlığında oranın yükseldiğini ve düşük doz ACTH stimülasyon testi (LDT) sonrasında daha da anlamlı bir artış gösterdiğini belirttiler (67).

Biz de çalışmamızda bazal plazma DHEA düzeylerini tayin ettikten sonra bazal kortizol/DHEA oranını hesapladık. Bu oranın HPA eksenini sağlam olan bireylerde düşük olduğunu, ancak santral AY grubunda anlamlı derecede yüksek olduğunu gözlemledik ($p<0,001$). Çalışmamızda düşük doz ACTH testinin 20., 30. ve 40.

dakikalarında DHEA ölçümü yapılmadığı için stimülasyon sonrası kortizol/DHEA oranı belirlenmedi.

HPA eksenini sağlam değilse, bu oran bazal değerlere göre yüksek olacak ve ACTH stimülasyonu sonrası bu yükseklik daha da artacaktır. Bu oranın kullanımı, HPA fonksiyonunu değerlendirmede basit ve kullanışlı bir yöntem olabilir, tıpkı daha önce, kronik hastalıkların takibinde olduğu gibi. Ayrıca, bu oran adrenal rezervin belirlenmesinde de önemli olabilir (72).

Benzer bulgular primer adrenal yetmezlikte de gözlemlendi. Zira, adrenal androjenler glukokortikoidlerden daha önce azalmaktadır (73,74).

Topor ve ark. fizyolojik konsantrasyonlarda kortizolün DHEA sekresyonunu stimüle ettiğini insan adrenokortikal hücrelerinde *in vitro* olarak göstermişlerdir. Bu artış doz bağımlıdır; yani AY durumunda azalmış kortizol sekresyonu, 3 beta- hidroksteroid dehidrogenaz (3 β - HSD2) aktivitesini artırır ve sonuç olarak DHEA sekresyonunu düşürür (75).

Santral AY durumunda, ortalama bazal ve LDT sonrası serum DHEA düzeyleri düşüktür; DHEA-S düzeyleri de benzer şekilde düşüktür. Kassem ve arkadaşları, yaş ve cinsiyet uyumlu normal serum DHEA ve DHEA-S düzeylerinin sağlam HPA ekseninin fonksiyonunu gösterdiğini bildirdiler.

DHEA ve DHEA-S, adrenal kortekste kortizol ile senkronize olarak salgılanır. Sağlıklı bireylerde, Cosyntropin uygulaması serum kortizol ve DHEA düzeylerini eş zamanlı olarak artırır ve bu artış doz bağımlıdır. (76, 77). DHEA-S'in yarı ömrü 20 saattir ve diurnal ritmden etkilenmez. DHEA'nın yarı ömrü ise 1-3 saattir ve kortizolden çok daha az diurnal ritm gösterir (78, 79, 80).

Santral AY şüphesiyle LDT uygulanan hastalarda plazma DHEA ölçümü, santral AY tanısına yardımcı olabilir. Çalışmamızın sonuçları, bazal plazma DHEA ölçümünün ve kortizol/DHEA oranının, LDT uygulanan çocuk hastalarda santral AY'nin tanımlanmasında etkin olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu veriler, DHEA ve DHEA-S'in HPA eksenini değerlendirmede önemli olduğunu ve santral AY düşünülen çocuklarda laboratuvar istemlerine eklenebileceğini göstermektedir.

Bu çalışmanın güçlü yönlerinden biri, tükürük kortizolünün altın standart olan yüksek duyarlılıklı tandem MS metodu ile ölçülmüş olmasıdır. Bu sayede immünölçümlerle kortizol ölçümünü interfere edebilecek olaylar ekarte edilmiştir.

Çalışmanın diğer bir güçlü yanı, plazma DHEA ve DHEA-S düzeylerinin her iki grupta da ölçülmesi ve böylece santral AY tanısındaki rollerinin belirlenmesidir. Santral AY, düşük doz ACTH'ye göre tanımlanmıştır. Klinik kılavuzlara göre, LDT'nin 30. veya 40. dakikasında 550 nmol/L'den düşük bazal serum kortizol düzeyleri santral AY olarak tanımlanmıştır.

Bir diğer güçlü yönü ise tükürük örneklerinin güvenilir bir yöntemle toplanmış olmasıdır. Önceki bir çalışmada, güvenilir ve uygun bir aparat ile tükürük toplamanın daha yüksek prediktif etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (81).

Çalışmaya dahil edilen hasta sayısının beklenenden daha az olması çalışmamızın en önemli sınırlamasıdır; bu durum, prospektif çalışma süresi ile ilişkilidir. Diğer bir sınırlama ise, 63 çocuğun tümünde 24 saatlik idrar toplanamaması ve bu nedenle idrar serbest kortizol ölçümünün tüm hastalarda yapılamamasıdır. İdrar serbest kortizolü, adrenal rezervi değerlendirmede önemli bir göstergedir.

Bu çalışmanın önemli bir çıktısı, kütle spektrometrisi kullanılarak tükürük kortizol ölçümünün klinik bir test olarak rutin çalışmaya sunulmasıdır. Böylece, hastalarda, özellikle çocuklarda, daha hızlı, kolay ve yüksek doğrulukla santral AY tanısı konması sağlanabilir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada, tükürük kortizol ölçümü için yüksek seçicilik ve özgüllüğe sahip bir kütle spektrometri yöntemi geliştirildi ve analitik olarak doğrulandı. Elde edilen sonuçlara göre, tükürük kortizolü için 40. dakikada 12,0 nmol/L eşik değeri belirlenmiş olup, bu değer yanlış pozitif sonuçları azaltmak için uygun bir değerdir.

Santral AY den şüphelenilen ve LDT yapılan hastalarda serum kortizol ölçümüne alternatif bir yöntem olarak tükürük kortizol ölçümü kullanılabilir.

Tükürük hem kolay toplanabilen hem de serbest kortizol düzeyini daha iyi yansıtan bir biyolojik örnektir. Bazal tükürük kortizol ölçümü, LDT'nin uygulanıp uygulanmaması kararında önemli bir rol oynayabilir ve LDT'nin doğruluğunu artırabilir. Bu avantajlar göz önüne alındığında, çocuklarda ve serumda kortizol bağlayıcı proteinin etkilenmiş olduğu hastalarda tükürük kortizol ölçümünün klinikte kullanımını daha uygun olabilir.

Bu çalışmada elde edilen kanıtlara göre, santral AY tanısı için tükürük kortizolünün de dahil olduğu yeni bir algoritma öneriyoruz.

Ayrıca, bu çalışma bazal plazma DHEA ve DHEA-S ölçümünün HPA eksenini değerlendirmede önemli olduğunu gösterdi; o nedenle santral AY düşünülen çocuklarda tanısal algoritmaya eklenebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Walter L. Miller, Steroid hormone synthesis in mitochondria ,Molecular and Cellular Endocrinology, 379 (2013) 62–73
2. Laura A. Martin, Mitochondrial cholesterol: mechanisms of import and effects on mitochondrial function , J Bioenerg Biomembr (2016) 48:137–151
3. Muhammad Dimas Aditya Ari and Jenny Sunariani, THE ROLE OF ACUTE STRESS ON THE SENSATION AND TASTE CELLS STRUCTURE INTEGRITY THROUGH INTERLEUKIN-10 AND TUMOR NECROSIS FACTOR SIGNALING, Biochem. Cell. Arch. Vol. 20, Supplement 1, pp. 2775-2783, 2020
4. M.E. Rhodes, Adrenocorticotrophic Hormone, Stress: Neuroendocrinology and Neurobiology© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved
5. Daniela Nisticò, Pediatric Adrenal Insufficiency: Challenges and Solutions, Therapeutics and Clinical Risk Management 2022:18 47–60
6. RJ Auchus, Adrenal Gland, Encyclopedia of the Neurological Sciences, Volume 1 61 doi:10.1016/B978-0-12-385157-4.01205-7
7. Ashley B. Grossman, The Diagnosis and Management of Central Hypoadrenalism, J Clin Endocrinol Metab, November 2010, 95(11):4855–4863
8. L A Trevino, Adrenal Glands, The University of Texas at Arlington, Arlington, TX, USA , 2012 Elsevier Inc. All rights reserved
9. Ellaine Salvador, Glucocorticoids and endothelial cell barrier function , Cell Tissue Res DOI 10.1007/s00441-013-1762-z
10. Nadia El-Farhan, Measuring cortisol in serum, urine and saliva– are our assays good enough? Annals of Clinical Biochemistry 2017, Vol. 54(3) 308–322
11. Michaela Dušková, Salivary Steroids and Diagnostic Tests for Adrenal Insufficiency, Prague Medical Report / Vol. 117 (2016) No. 1, p. 18–33
12. Charlotte J. Elder, Use of salivary cortisol and cortisone in the high- and low- dose synacthen test, Clinical Endocrinology. 2018;88:772–778
13. Paz de Miguel Novoa ,Guidelines for diagnosis and treatment of adrenal insufficiency in adults, Endocrinol Nutr. 2014;61(Supl. 1):1-34

14. Filippo Ceccato* and Carla Scaroni, Central adrenal insufficiency: open issues regarding diagnosis and glucocorticoid treatment, *Clin Chem Lab Med* 2019; 57(8): 1125–1135)
15. Julie Park, The diagnosis and treatment of adrenal insufficiency during childhood and adolescence, : Park J, Didi M, Blair J. *Arch Dis Child* 2016;101:860–865
16. Eystein S Husebye, Simon H Pearce, Nils P Krone, Olle Kämpe, Adrenal insufficiency, *Lancet* 2021; 397: 613–29
17. R.K.Crowley,CentralHypoadrenalism, *JClinEndocrinolMetab*,November2014,99(11):4027–4036 doi: 10.1210/jc.2014-2476
18. Hershel Raff, Utility of Salivary Cortisol Measurements in Cushing’s Syndrome and Adrenal Insufficiency, *J Clin Endocrinol Metab*, October 2009, 94(10):3647–3655
19. European Society of Endocrinology and Endocrine Society Joint Clinical Guideline: Diagnosis and Therapy of Glucocorticoid-induced Adrenal Insufficiency, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2024, 109, 1657–1683 <https://doi.org/10.1210/clinem/dgae250> Advance access publication 10 May 2024
20. S. J. Hurel, The short Synacthen and insulin stress tests in the assessment of the hypothalamic±pituitary±adrenal axis, *Clinical Endocrinology* (1996) 44, 141±146
21. Liliana N. Contreras, A new less-invasive and more informative low-dose ACTH test: salivary steroids in response to intramuscular corticotrophin *Clinical Endocrinology* (2004) 61, 675–682
22. ADRENAL VE GONADAL HASTALIKLAR KILAVUZU © Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği • 2022
23. Rasa Kazlauskaite ,Corticotropin Tests for Hypothalamic-Pituitary Adrenal Insufficiency: A Metaanalysis, *J Clin Endocrinol Metab*, November 2008, 93(11):4245–4253
24. R. Anantharaman,The 1 µg cosyntropin test in normal individuals: A reappraisal, *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism / Jul-Aug 2013 / Vol 17 | Issue 4*
25. Sasigarn A. Bowden, Pediatric Adrenal Insufficiency: Diagnosis, Management, and New Therapies, *International Journal of Pediatrics*,Volume 2018, Article ID 1739831, 8 pages
26. Benn A M L, Thomson W M ,Saliva: An Overview, Peer-reviewed paper: submitted February 2014; accepted July 2014
27. Helen Whelton ,Introduction: the anatomy and physiology of salivary glands
28. Heller, L. C., & Heller, M. M. (2018). Salivary Gland Function and Dysfunction: Overview and Diagnostics. *Frontiers in Oral Health*, 3, 3.

29. Syed N. Alvi and Muhammad M. Hammami, A Simple Ultraperformance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Measurement of Cortisol Level in Human Saliva, *International Journal of Analytical Chemistry* Volume 2019, Article ID 4909352, 8 pages
30. Ilias Perogamvros, Measurement of salivary cortisol with liquid chromatography tandem mass spectrometry in patients undergoing dynamic endocrine testing, *Clinical Endocrinology* (2010) 72, 17–21, doi: 10.1111/j.1365-2265.2009.03582.x
31. Charlotte J. Elder¹ | Use of salivary cortisol and cortisone in the high- and low-dose synacthen test, *Clinical Endocrinology*. 2018;88:772–778
32. Yoon Ji Kim, Stimulated Salivary Cortisol as a Noninvasive Diagnostic Tool for Adrenal Insufficiency, *Endocrinol Metab* 2020;35:628-635
33. Beynon, J. H. (1981). The history of mass spectrometry and the search for zero. *Biological Mass Spectrometry*, 8(9), 380–383. doi:10.1002/bms.1200080906
34. CS Ho, CWK Lam, *Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications*, *Clin Biochem Rev* Vol 24 February 2003
35. *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, LibreTexts, <https://chem.libretexts.org/@go/page/320>
36. Shibdas Banerjee and Shyamalava Mazumdar, *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyt*, Hindawi Publishing Corporation *International Journal of Analytical Chemistry*, Volume 2012, Article ID 282574, 40 pages
37. W. Clarke *MASS SPECTROMETRY IN THE CLINICAL LABORATORY: DETERMINING THE NEED AND AVOIDING PITFALLS*, *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800871-3.00001-8> Copyright © 2017 Elsevier Inc
38. Shiyi Chen a, Recent advancements in nanoelectrospray ionization interface and coupled devices, *Journal of Chromatography Open* 2 (2022) 100064
39. Giorgio Famiglioni, The history of electron ionization in LC-MS, from the early days to modern technologies: A review, *Analytica Chimica Acta* 1167 (2021) 338350
40. Edvaldo Vasconcelos Soares Maciel, Electron ionization mass spectrometry: Quo vadis, *Electrophoresis* 2022;43:1587–1600
41. Edmond de Hoffman, *Mass Spectrometry Principles and Applications*, Third Edition

42. Patrik Ek, *Mass Spectrometry with Electrospray Ionization from an Adjustable Gap*, Printed by US-AB, Stockholm, 2008
43. Semra Cetinkaya, Diagnostic Value of Salivary Cortisol in Children with Abnormal Adrenal Cortex Functions. *HORMONE RESEARCH, Horm Res* 2007;67:301–306 DOI: 10.1159/000100363
44. Ospina NG. ACTH Stimulation Tests for the Diagnosis of Adrenal Insufficiency: Systematic Review and Meta-Analysis *J Clin Endocrinol Metab* 101: 427–434, 2016
45. Dekkers O.M, Comparison of the cortisol responses to testing with two doses of ACTH in patients with suspected adrenal insufficiency *European Journal of Endocrinology*, Volume 164, Issue 1, Jan 2011, Pages 83–87,
46. Ceccato F et al. Low-dose short synacthen test with salivary cortisol in patients with suspected central adrenal insufficiency. *Endocrine Connections* (2021) 10, 1189–1199.
47. Kazlauskaite R et al. Corticotropin Tests for Hypothalamic-Pituitary Adrenal Insufficiency: A Metaanalysis. *J Clin Endocrinol Metab*, November 2008, 93(11):4245–4253
48. Rauscheker M, Abraham SB, Abel S, et al. Cosyntropin-stimulated serum free cortisol in healthy, adrenally insufficient, and mildly cirrhotic populations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(3): 1075-1081.
49. Gozansky WS, Lynn JS, Laudenslager ML, Kohrt WM. Salivary cortisol determined by enzyme immunoassay is preferable to serum total cortisol for assessment of dynamic hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005;63(3):336-341.
50. Vining RF, McGinley RA, et al. Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. *Ann Clin Biochem*. 1983;20(6):329-335.
51. Toone RJ, Peacock OJ, Smith AA, et al. Measurement of steroid hormones in saliva: effects of sample storage condition. *Scand J Clin Lab Invest*. 2013;73(8):615-621.
52. El-Farhan N, Rees DA & Evans C. Measuring cortisol in serum, urine and saliva - are our assays good enough? *Annals of Clinical Biochemistry* 2017 54 308–322.
53. Raff H. Utility of salivary cortisol measurements in Cushing's syndrome and adrenal insufficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2009 94 3647–3655.

54. Marcus-Perlman Y, Tordjman K, Greenman Y, Limor R, Shenkerman G, Osher E & Stern N. Low-dose ACTH (1 µg) salivary test: a potential alternative to the classical blood test. *Clinical Endocrinology* 2006 64 215–218.
55. Langelaan MLP, Kisters JMH, Oosterwerff MM & Boer AK. Salivary cortisol in the diagnosis of adrenal insufficiency: cost efficient and patient friendly. *Endocrine Connections* 2018 7 560–566.
56. Perogamvros I, Owen LJ, Keevil BG, Brabant G, Trainer PJ. Measurement of salivary cortisol with liquid chromatography- tandem mass spectrometry in patients undergoing dynamic endocrine testing. *Clin Endocrinol.* 2010;72(1):17-21.
57. El-Farhan N, Pickett A, Ducroq D, et al. Method-specific serum cortisol responses to the adrenocorticotrophin test: comparison of gas chromatography-mass spectrometry and five automated immunoassays. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2013;78(5):673-680.
58. Elder CJ, Harrison RF, Cross AS, et al. Use of salivary cortisol and cortisone in the high- and low-dose Synacthen test. *Clin Endocrinol.* 2018;88(6):772-778.
59. Kim YJ, Kim JH, Hong AR, Park KS, Kim SW, Shin CS & Kim SY. Stimulated salivary cortisol as a noninvasive diagnostic tool for adrenal insufficiency. *Endocrinology and Metabolism* 2020 35 628–635.
60. Tan et al. Expanding the use of salivary cortisol as a non-invasive outpatient test in the dynamic evaluation of suspected adrenal insufficiency. *Endocrine Connections* (2023) 12, e230004.
61. Cornes MP, Ashby HL, Khalid Y, Buch HN, Ford C & Gama R. Salivary cortisol and cortisone responses to tetracosactrin (synacthen). *Annals of Clinical Biochemistry* 2015 52 606–610.
62. Bornstein SR, Allolio B, Arlt W, Barthel A, Don-Wauchope A, Hammer GD, Husebye ES, Merke DP, Murad MH, Stratakis CA, et al. Diagnosis and treatment of primary adrenal insufficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2016 101 364–389.
63. Dehydroepiandrosterone Sulfate (DHEAS) Stimulates the First Step in the Biosynthesis of Steroid Hormones. *PLoS One.* 2014 Feb 21;9(2):e89727. doi: 10.1371/journal.pone.0089727. eCollection 2014.
64. Nasrallah MP, Arafah BM 2003 The value of dehydroepiandrosterone sulfate measurements in the assessment of adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5293–5298

65. Talbot, NB. M.D. et al. Excretion Of 17-Keto Steroids By Normal And By Abnormal Children. *Am J Dis Child*. 1943;65(3):364-375.
doi:10.1001/archpedi.1943.02010150012002
66. Kahri et al. Different Biological Action Of Corticosteroids, Corticosterone And Cortisol, As A Base Of Zonal Function Of Adrenal Cortex . *Acta Endocrinologica*, Volume 91, Issue 2, Jun 1979, Pages 329–337
67. Kassem et al. Measurements of Serum DHEA and DHEA Sulphate Levels Improve the Accuracy of the Low-Dose Cosyntropin Test in the Diagnosis of Central Adrenal Insufficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 97, Issue 10, 1 October 2012,
68. Fischli S, Jenni S, Allemann S, Zwahlen M, Diem P, Christ ER, Stettler C 2008 Dehydroepiandrosterone sulfate in the assessment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Clin Endocrinol Metab* 93:539–542
69. Nasrallah MP, Arafah BM 2003 The value of dehydroepiandrosterone sulfate measurements in the assessment of adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5293–5298
70. Okonko DO, Crosato M, Kalra PR, Cicoira M, John M, Doehner W, Coats AJ, Poole-Wilson PA, Anker SD 2005 Association of deranged adrenal steroid metabolism with anemia in chronic heart failure. *Am J Cardiol* 96:101–103
71. Lephart ED, Baxter CR, Parker Jr CR 1987 Effect of burn trauma on adrenal and testicular steroid hormone production. *J Clin Endocrinol Metab* 64:842–848
72. Parker CR, Baxter Jr CR 1985 Divergence in adrenal secretory pattern after thermal injury in adult patients. *J Trauma* 25:508–510
73. Laureti S, Arvat E, Candeloro P, Di Vito L, Ghigo E, Santeusanio F, Falorni A 2000 Low dose (1 g) ACTH test in the evaluation of adrenal dysfunction in pre-clinical Addison's disease. *Clin Endocrinol* 53:107–115
74. Laureti S, Candeloro P, Aglietti MC, Giordano R, Arvat E, Ghigo E, Santeusanio F, Falorni A 2002 Dehydroepiandrosterone, 17 α -hydroxyprogesterone and aldosterone responses to the Low dose (1 g) ACTH test in subjects with preclinical Adrenal autoimmunity. *Clin Endocrinol* 57:677–683
75. Topor LS, Asai M, Dunn J, Majzoub JA 2011 Cortisol stimulates secretion of dehydroepiandrosterone in human adrenocortical cells through inhibition of 3-HSD2. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E31–E39

76. Rosenfeld RS, Hellman L, Gallagher TF 1972 Metabolism and interconversion of dehydroisoandrosterone and dehydroisoandrosterone sulfate. *J Clin Endocrinol Metab* 35:187–193
77. Arvat E, Di Vito L, Lanfranco F, Maccario M, Baffoni C, Rossetto R, Aimaretti G, Camanni F, Ghigo E 2000 Stimulatory effect of adrenocorticotropin on cortisol, aldosterone, and dehydroepiandrosterone secretion in normal humans: dose-response study. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3141–3146
78. Kroboth PD, Salek FS, Pittenger AL, Fabian TJ, Frye RF 1999 DHEA and DHEAS: a review. *J Clin Pharmacol* 39:327–348
79. Migeon C, Keller A, Lawrence B, Shepard T 1957 Dehydroepiandrosterone and androsterone levels in human plasma. Effect of age and sex; day-to-day and diurnal variations. *J Clin Endocrinol Metab* 50:286–296
80. Rosenfeld RS, Rosenberg BJ, Fukushima DK, Hellman L 1975 24 Hour secretory pattern of dehydroisoandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate. *J Clin Endocrinol Metab* 40:850–855
81. Poll EM, Kreitschmann-Andermahr I, Langejuergen Y, Stanzel S, Gilsbach JM, Gressner A & Yagmur E. Saliva collection method affects predictability of serum cortisol. *Clinica Chimica Acta* 2007 382 15–19. (<https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.03.009>)