

1855+

T.C.  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI

Tez Yöneticisi: Doç.Dr. Ali Rıza UYSAL

BAZAL VE ACTH UYARISINDAN SONRA  
TÜKRÜK VE PLAZMA  
KORTİZOL DÜZEYLERİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Günhan GÜRMAN

Ankara, 1990

YetiŖmemde ve tezimin hazırlanmasında emeği geçen bütün hocalarıma  
teŖekkr borç bilirim.

Dr. Günhan GÜRMAN

## İÇİNDEKİLER

GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	2
MATERYAL ve METOD.....	13
SONUÇLAR.....	15
TARTIŞMA.....	20
ÖZET.....	24
KAYNAKLAR.....	25

## GİRİŞ VE AMAÇ

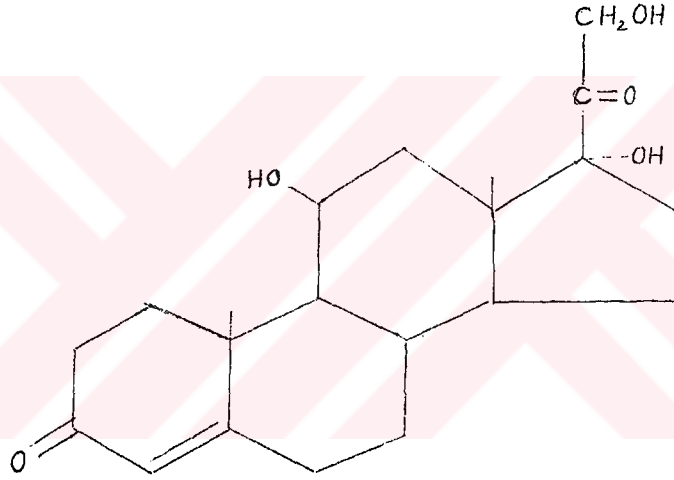
Adrenal korteks fonksiyonunun incelendiği birçok tetkik ve araştırmada, plazma kortizol düzeyi ana parametre kabul edilir. Plazma kortizolünün taşıyıcı proteinlere bağlı olmayan kısmı (serbest kortizol) ise biyolojik aktif Şekil olarak kabul edildiğinden adrenal glukokortikoid aktivite için iyi bir göstergedir. Ancak serbest kortizolün ölçülmesindeki teknik zorluklar rutin olarak kullanılmasını engellemektedir (23).

Muhtelif vücut sıvılarının incelendiği değişik araştırmalarda, tükürükteki kortizol düzeylerinin, plazma serbest kortizol düzeyleri ile paralellik arzettiği tesbit edilmiştir. (6,23,28). Örnek teminindeki kolaylık dahil, pek çok avantaj sağlayabileceğinden, tükürükteki kortizol düzeyi ile ilgili araştırmalar son zamanlarda yoğunlaşmıştır (7,15,18,23,33,34). Birçok özellik açısından birbiri ile çelişen yayınlar olsa da, bu konuya olan ilgi artarak devam etmektedir ve tükürükte kortizol tayini henüz pekçok merkezde kabul gören rutin bir protokol içinde yer almamıştır.

Bu çalışmada aynı metodla ölçülen total plazma ve tükürük kortizolünün, diüurnal salgı ve ACTH stimülasyonuna verilen cevap açısından karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu Şekilde, hipotalamus-hipofiz-adrenal fonksiyonlarının incelenmesinde tükürükte kortizol tayininin yararı değerlendirilecektir.

## GENEL BİLGİLER

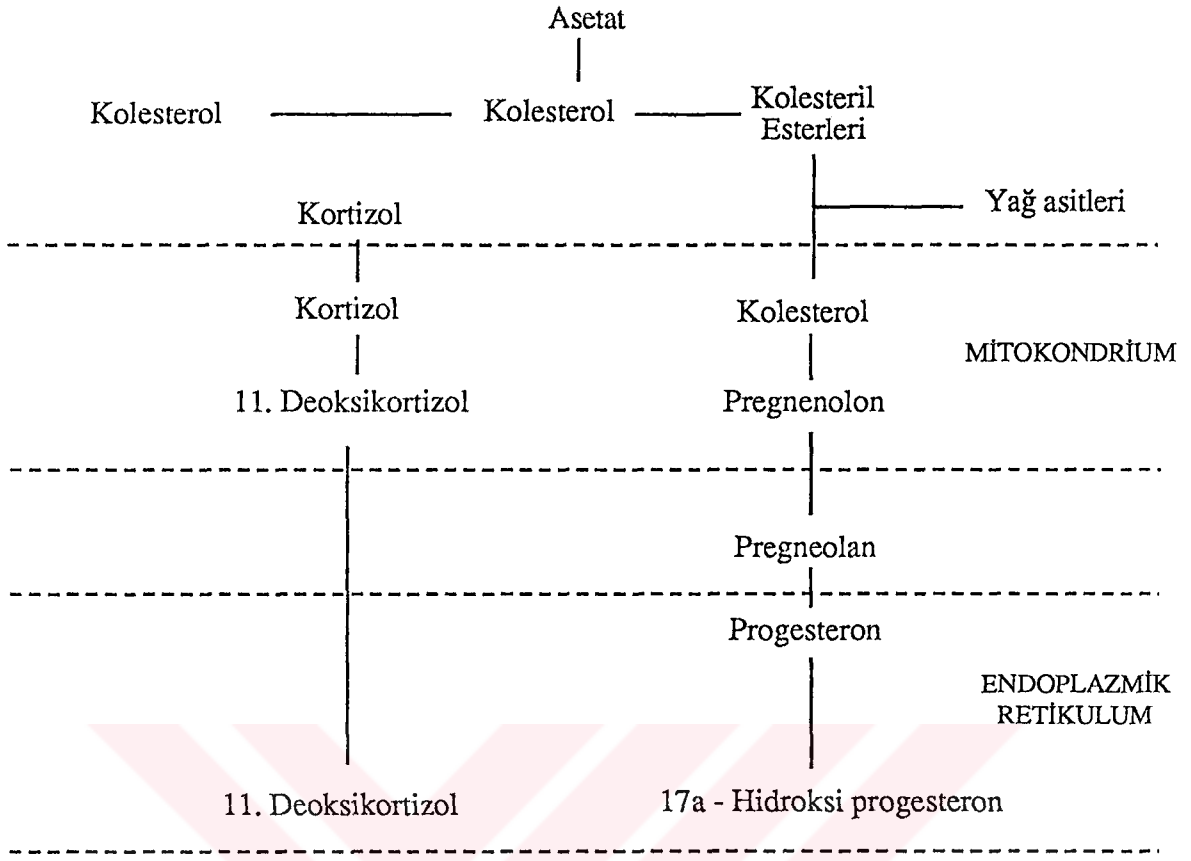
Kortizol adrenal korteksten salgılanır ve insan vücudundaki başlıca ve en etkin glukokortikoidtir (şekil 1). Zona fasikulatada yapılır. Adrenal korteksten salgılanan hormonlara steroid hormonlar denilir (1,12,14).



Şekil 1. Kortizol (F bileşigi)

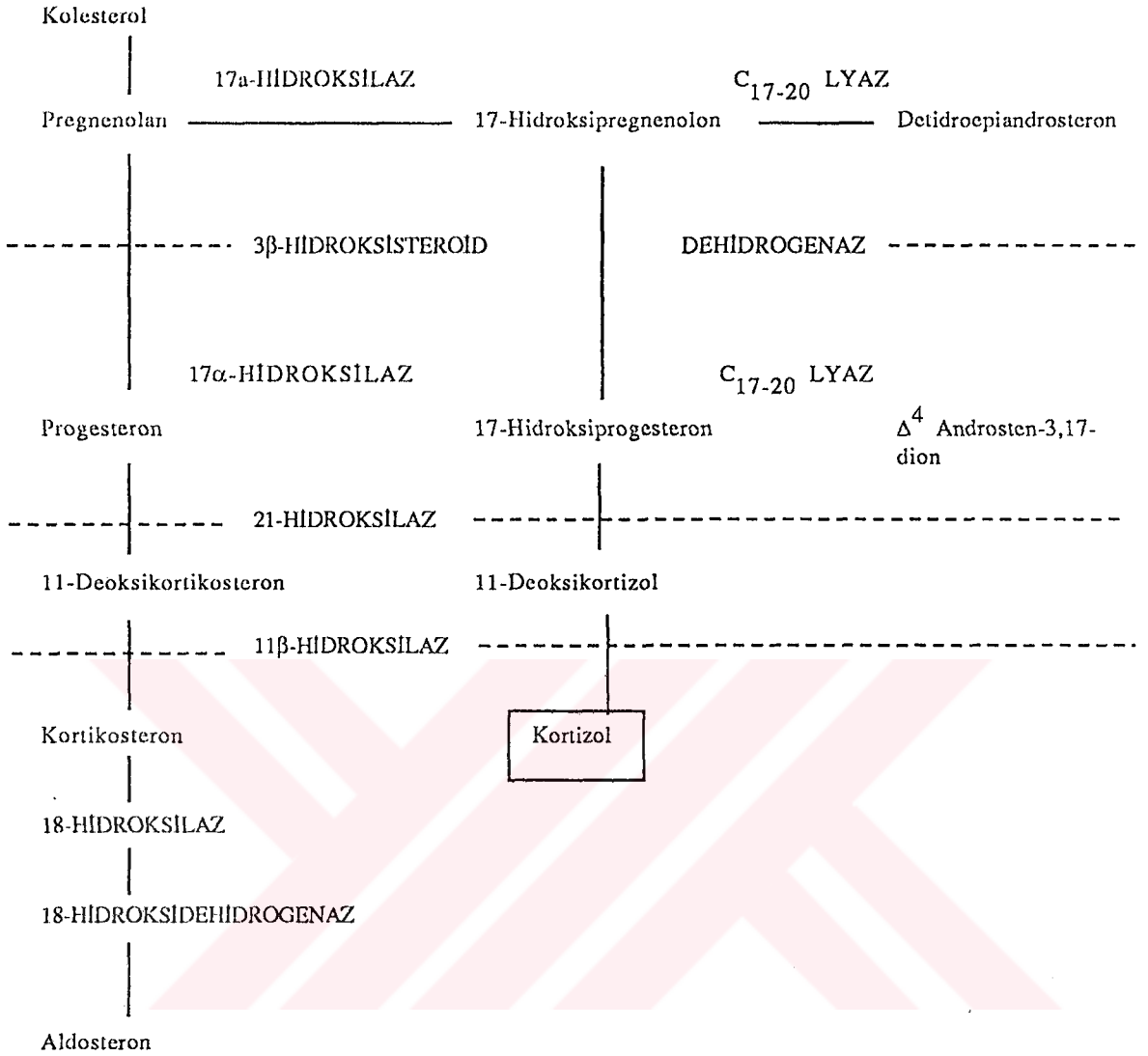
(11 $\beta$ .17 $\alpha$ ,21-Trihydroxy-4-pregnene-3,20-dione)

Memelilerdeki tüm steroid hormonların sentezi kolesterolden başlar. Adrenal bezin, ACTH (veya CAMP) ile stimülasyonu altında esteraz aktive olur ve oluşan serbest kolesterol mitokondriuma nakledilir. Kolesterolün yan zincirinin bir seri oksidasyon sonucu yıkılmasıyla pregnenolon meydana gelir (1,12,14). Adrenal steroidogenez endoplazmik retikulumda da bir dizi reaksiyonla devam eder (şekil 2).



Şekil 2. Kortizol biyosentezi.

Pregnenolonun teşekkülünden sonra, bir dehidrogenaz enzimi ile progesteron veya 17. hidrosilaz enzimi ile 17. hidroksipregnenolon meydana gelir. Her ikisi de moleküler oksijen ve NADPH gerektiren oksijenazlar ve dehidrogenazlarla değişik hormonlara dönüşürler (şekil 3). Kortizol sentezi,  $C_{17}$ ,  $C_{21}$  ve  $C_{11}$  pozisyonlarına etkili 3 hidroksilazı gerektirir.  $C_{11}$  hidroksilasyon diğerlerine göre daha yavaştır.  $17\alpha$  - Hidroksilaz da düz endoplazmik retikulum enzimidir.  $11\beta$  - hidroksilaz ise mitokondrial enzimidir.



Şekil 3. Adrenal steroidlerin sentezi.

Steroid hormonlar yapıldıktan sonra plazmaya salınırlar. Adrenal hücrelerde depolanmaları yoktur veya çok azdır. Kortizol salgısı, adrenokortikotropin (ACTH) salgısının diüurnal ritmiyle düzenlenir. ACTH da hipotalamustan salgılanan kortikotropin salgılatıcı hormon (corticotropin releasing hormone-CRH) etkisi altındadır. Kortizolün CRH ve ACTH salgısı üzerinde baskılayıcı etkisi vardır (negatif "feed back" etki). Plazma kortizol düzeyi gece uyku sırasında artar ve uyanmadan hemen önce en yüksek değerine

ulaşır. En düşük kortizol düzeyleri ise gece uyku başlangıcından hemen önce elde edilir (12,13,32). Bu siklus hipotalamik, hipofizer, adrenal organik hastalıklar dışında, uyku bozuklukları, fiziksel ve emosyonel stresler, korku, anksiyete, ağrı gibi pek çok sebepten etkilenir.

## GLUKORTİKOİDLERİN PLAZMADA TAŞINMALARI

Kortizol plazmada proteine bağlı ve serbest şekillerde bulunur. Asıl bağlayıcı protein, kortikosteroid-bağlayan globulin (CBG) veya transkortin olarak isimlendirilen, 51.700 moleküler ağırlıklı glikoprotein olan bir  $\alpha$ -globulindir. Ağırlığının yaklaşık % 26'sı karbohidrattır. CBG karaciğerde oluşturulur ve estrogenler sentezini artırır. Konsantrasyonu gebelikte iki katına kadar artabilirken, normal menstruel siklus sırasındaki estrogen dalgalanmalarından fazla etkilenmez. Plazma yarı ömrü takriben 5 gündür. Kortikosteroidlere ilâveten, progesteron, prednisolon ve aldosteronu bağlayabilir (3,12,13,27). Bağlanmanın kuvveti, çeşitli glukokortikoidlerin biyolojik yarı ömürlerinin belirlenmesinde yardımcıdır. Kortizol CBG'e sıkıca bağlanır ve 1,5-2 saatlik yarı ömrü vardır (12).

Steroid hormonlar ayrıca seks hormonu bağlayan globulin (SHBG) ve albumin ile de kompleks oluştururlar. CBG'e bağlanan steroidlerin, bağlanma affinitelerine göre sırası; deoksikortizol  $\cong$  kortikosteron  $\cong$  kortizol > 17-hidroksi progesteron > deoksikortikosteron > progesteron şeklindedir (9). Normal durumlarda plazmadaki kortizolün takriben % 70'i CBG'e, % 20'si albumine bağlıdır, yaklaşık % 8'i bağlı değildir. ACTH uygulamasından sonra olabileceği gibi, kortizolün yüksek konsantrasyonlarıyla serbest fraksiyon önemli derecede artabilir (3). CBG'in bağlama kapasitesi yaklaşık 28  $\mu\text{g}/\text{dl}$ 'de kortizolle doymuş hale gelir (3). Plazmadaki proteine bağlı kortizol metabolik olarak aktif olmadığı halde, bağımlı ve serbest steroid arasındaki dengeye çabucak erişilebilir,

böylece, bağlı steroid, serbest steroid plazmadan çıktığında yerinin doldurulması için bir depo gibi düşünülebilir (3,12). Beyin omurilik sıvısındaki kortizol düzeyi, plazma serbest kortizolünü yansıtmaktadır (3,6).

CBG'in bağlayıcı kısmını kortizolün % 51,1-51,3, kortizonun % 3,9-3,0, kortikosteronun % 1,3-0,8, öteki endojen steroidlerin % 1'den daha az oranda işgal ettiği ve % 43-44,8'lik kısmın ise açıkta kaldığı bildirilmiştir (9). Gebelikte ise bu oranlar, kortizol % 41,4, progesteron % 10,6, kortizon % 3,8, kortikosteron % 2,6 diğer endojen steroidler % 1, % 40,5 ise işgal edilmemiş olarak değişir. Kortizol normal erkek, normal kadın ve gebelerde işgal edilen bağlayıcı kısmın sırayla % 94, % 96 ve % 68'ini oluşturur. Gebelikteki relatif azalma, primer olarak progesteronun belirgin plazma konsantrasyon artışı sonucu kompetisyon ileidir (9).

CBG konsantrasyonundaki değişiklikler, aynı zamanda kortizolün plazma dağılımında major değişikliklere sebep olur. CBG konsantrasyonunda normal sınırların üzerinde bir artış, CBG'e bağlanan kortizol yüzdesinde artışla, albumine bağlanan kortizol yüzdesinde ve bağlanmamış kortizol yüzdesinde belirgin azalma ile sonuçlanır. Gebelikte CBG seviyeleri normal kadınlardan 2-3 misli artar. Gebelikte artan CBG seviyeleri, normal kadınlarla karşılaştırıldığında, bağlanmamış kortizol yüzdesinde % 50 azalmaya sebep olur. Böylece total kortizol konsantrasyonundaki 2 misli artışa ve progesteronun yüksek konsantrasyonuna rağmen gebelikteki bağlanmamış kortizol konsantrasyonu normal kadınlarda yaklaşık aynıdır (9).

Albumin, endojen steroidlerin plazma dağılımında önemli bir determinanttır. Moleküler ağırlığı 69.000 dir; normal olarak takriben 4 gr/dl konsantrasyonunda bulunur. CBG'in tersine kortizole karşı affinitesi düşüktür. Plazmada CBG'den yüksek konsan-

trasyonda olmasına rağmen, normal konsantrasyonlarda plazma kortizolünün aşağı yukarı beşte birini bağlar (3). Steoid seviyelerinin yüksekliği ile karakterize fizyolojik bir durum olan gebelikte bile albuminin bağlayıcı kısımlarının büyük kısmı işgal edilmemiştir (9). Albumin konsantrasyonundaki değişiklikler, kortizolün plazma dağılımında nisbeten az değişikliklere sebep olur. Albumin konsantrasyonunun normal sınırların altına düşmesi, albumine bağlı kortizol yüzdesinde düşüşle ve CBG'e bağlı yüzde artışla sonuçlanırken, bağlanmamış kortizol yüzdesindeki artış % 10 dan daha azdır (9).

CBG'e bağlanabilen muhtelif steroidler aynı anda mevcut olduğunda bağlanma bölgeleri için yarışa girerler ve endojen steroidlerle yer değiştirme sonucu biolojik etkilerinin ve kullanılabilirliklerinin artmasına sebep olurlar. Bu konuda yapılan bir çalışmada (30), temel steroid yapısı olmayan bileşiklerin CBG'den kortizolün yerini değiştiremedikleri tesbit edilmiştir. Aynı çalışmada CBG'e bağlanma affinitesi sırası; kortizol > prednizolon > progesteron  $\equiv$  SC8365 > medroksiprogesteron > danazol > hidrokortizon hemisüksinat > testosteron > medroksiprogesteron asetat > prednizon > kortizon asetat olarak tesbit edilmiştir. Prednizolonun maksimal terapötik seviyelerinin varlığı, CBG'e bağlanan kortizolün konsantrasyonunu yaklaşık % 30'un üzerinde azaltır (3,30).

## GLUKOKORTİKÖİD HORMONLARIN ETKİ MEKANİZMALARI VE METABOLİZMALARI

Sadece serbest hormon biyolojik olarak aktif kabul edilir. Hedef hücredeki etkileri spesifik reseptörle etkileşimle başlar. Reseptörün aktive olmasıyla, DNA bağlanması mümkün hale gelir (12).

Steroidin biyolojik etkisi reseptöre bağlanabilirlik düzeyiyle plazmadaki serbest hormon konsantrasyonuna bağlıdır. Kortizol, kortikosteron ve aldosteron glukokortikoid

reseptörlere yüksek affinite ile bağlanmalarına rağmen, kortizol yüksek plazma konsantrasyonundan ötürü dominant durumdadır.

Glukokortikoidler, hücredeki önemli proteinlerin ; genellikle enzimlerin düzeyini artırarak belirli hücresele olayları etkilerler. Bunu, hedef hücredeki spesifik genlerin transkripsiyonunu düzenleyerek yaparlar. Bu hormonlar aynı zamanda nükleer transkriptlerin oluşumunu ve transportunu, spesifik mRNA'ların degradasyon hızını da düzenlerler. Bu şekilde DNA'dan proteine bilgi akımını çeşitli düzeylerde etkilemiş olurlar.

Kortikosteroidler, fizyolojik etkinliklerini bozan ve suda erir hale gelmelerini sağlayan birçok kimyasal değişikliğe uğrarlar (1,3,12,14), böylece idrar ve safraya ifraz edilirler. Bu değişiklikler başlıca karaciğerde olur, ancak böbreklerde, bağ dokusunda ve hatta adrenalinde de yapılabilir. Steroidlerin vücutta uğradığı kimyasal değişiklikler beş genel sınıfta toplanabilir; redüksiyon, hidroksilasyon, yan zincir bölünmesi, oksidasyon ve esterifikasyon.

İnsanlarda konjuge steroidlerin önemli kısmı safra yoluyla barsağa geçer ve reabsorbe olarak enterohepatik dolaşıma aktarılır. Konjuge steroidlerin yaklaşık % 70'i idrarla atılır. % 20 si gaitaya bırakılır, artan ise deri ve diğer yollarla çıkar. Nonkromatografik metodlarla yapılan idrar analizlerinde, kortizol ölçülebilen tek bileşik olmadığından, serbet kortikoidler şeklinde isimlendirilmelidir (28).

Kortizolün eser miktarlarıyla dağılım volümü, yaklaşık 10 litredir. Normal konsantrasyonlardaki endojen kortizolün yarı ömrü aşağı yukarı 66 dakikadır, yüksek miktarlara ulaşması ile 120 dakikaya kadar yükselebilir (3). Sekresyon ve atılımı hipertiroidizmde artar, hipotiroidizmde azalır, bu yüzden her iki tablo da plazma düzeyini fazla etkilemez. Plazma klirens hızı karaciğer hastalığında, üremide, çocuklukta ve aşırı yaşlılıkta azalır.

## ADRENAL KORTEKS VE ACTH STİMÜLASYONU

Adrenal korteksin salgılama potansiyelinin incelenmesinde, ekzojen ACTH stimülasyonuna verdiği cevaptan yararlanır.

Aminoterminalinden başlayan ilk 24 aminoasidi ihtiva eden sentetik ACTH fragmanı olan cosyntropin bu amaçla kullanılır. Bu şekilde önceden kullanılan biyolojik ekstrelere bağlı allerjik ve diğer kestirilemeyen etkilerden kurtulunmuştur.

Bir protokole göre, maksimal stimülasyon 0,25 mg(yaklaşık 24 ünite) cosyntropin'in intravenöz injeksiyonu ile elde edilir. İnjesiyondan önce, 30 ve 60 dakika sonra kan örneği alınır. Normal olarak plazma kortizolündeki artış 7 mg/dl den fazla olur. Tetra-cosactrin'in (synacthen) intramüsküler olarak uygulanıp, önce ve 15 ile 30 dakika, ya da 1. 4. ve 6. saatlerde örneklerin alındığı protokoller de mevcuttur. Bunlar genel olarak kısa stimülasyon testleri olarak isimlendirilirler.

Cevabın normalden az olduğu durumlarda, primer adrend hastalık ile pitüiter yetmezliğin ayırtedilmesi için daha uzun süreli ACTH stimülasyonu gereklidir. Saatte 20 mg cosyntropin infüzyonunun 24 saat yapıldığı veya 0,25 mg cosyntropinin 6 ile 8 saat infüze edildiği muhtelif protokoller vardır.

Cevap genellikle cinsiyet ve yaşla değişmez. Günün hangi saatinde yapıldığı önemli değildir. Primer adrenokortikal yetmezlikli hastalarda cevap görülmez. Hipopituitarizimli hastalarda orta derecede bir cevap görülebilir. Hipofizer veya ACTH salgılayan tümör tarafından sebep olunan hiperplazik adrenal korteksli hastaların cevapları ise abartılmış olabilir. Adrenal tümörlülerde cevap önceden kestirilemez (3,5,19,22,31).

## TÜKRÜK VE KORTİZOL

Tükrük gece ve gündüz boyunca devamlı olarak salgılanır. Tükrük akımı oral veya olfaktör stimulus veya ağrı ve psikolojik faktörlerle belirgin derecede artar. Yaşlılık, tükrük bezlerinin bazı hastalıkları, radyasyon etkisi ve muhtelif farmakolojik ajanlarla azalır. Tükrüğün % 99'u sudur. Tükrükte ayrıca sodyum, potasyum, klor, bikarbonat, magnezyum, kalsiyum, fosfat gibi inorganik maddeler ile, lizozim gibi enzimleri, IgA önde olmak üzere gamma-globulinleri kapsayan organik maddeler, lökositler ve Streptococcus salivarius başta olmak üzere bazı mikroorganizmalar bulunur (20,26).

Lipid hücre membranlarında çözünebilirliklerinden ötürü kortizol gibi ankonjuge steroidler asiner tükrük hücrelerine serbestce difüze olabirler. Tükrükteki kortizol konsantrasyonu normalde plazma serbest kortizol konsantrasyonundan yaklaşık % 30 azdır. Bu fark kısmen tükrük bezinde kortizolün kortizona dönüşümü ile açıklanabilir (7,23). Tükrük CBG konsantrasyonunun plazmadakinin yaklaşık % 1'i olduğuna dair bulgular (14), tükrüğün bağlayıcı proteinlerin etkilerini kortizolden uzak tuttuğunu ve böylece tükrükteki kortizolün plazma serbest kortizolü için iyi bir gösterge olduğu fikrini kuvvetlendirmiştir. Serbest kortizol tayini için idrar da kullanılmaktadır. İdrar toplama zorluklarının yanı sıra, idrardaki serbest kortizol, anlık değişimleri tam yansıtamamaktadır (21,33). Oysa kortizol salgılanmasındaki değişmeler yaklaşık 1 dakika içinde akım hızından etkilenmeden tükrüğe yansır (11,33,34). CBG düzeyi ve bundaki değişikliklerin tükrüğe yansması ile ilgili ümit verici çalışmalar, ayrıca kan alma işleminin verdiği stresin olmaması, multipl örnek alma rahatlıkları, hipotalamik, hipofizer, adrenokortikol fonksiyonların test edilmesinde, tükrük örneklerinin kullanılmasını daha avantajlı göstermektedir. Bunun ışığında tükrükte kortizol ve diğer bazı endojen steroidlere yönelik araştırmalar yapılmıştır (2,4,10,17,24).

RIA teknikleri kullanılarak yapılan çalışmalarda 11 -deoksikortizol ve 17 -hidroksiprogesteron ile çapraz reaksiyon tesbit edilmiştir. Adrenal karsinomlu, ektojik ACTH sendromlu hastalarda, Metyrapone testinde bu bileşiklerin düzeyleri artabilir, bu da plazma ve tükürük kortizol düzeylerini kantitatif olarak etkileyebilir. Bu durumda bu bileşiklerin kromatografik seperasyonlarının yapılması önerilir (23,33).

Laudat ve arkadaşları (23) çalışmalarında diüurnal varyasyonu tükürükte plazmadaki ile uyumlu olarak buldular. Hatta gece tükürük kortizolü tayinlerinin takibinden yararlanarak intermitan Cushing sendromunun araştırılmasının yapılabileceğini gösterdiler. Aynı çalışmada ACTH ile stimülasyon, muhtemelen CBG'in saturasyonu sonucu plazma serbest kortizol konsantrasyonundaki daha büyük artış ile, tükürük kortizol cevaplarının daha dramatik olmasıyla sonuçlanmıştır. Walker ve arkadaşlarının çalışmalarında (33) ACTH stimülasyonundan sonra parotid sıvısı kortizol konsantrasyonunda 8 misli, plazmada 3 misli artış (maksimum) görülmüştür. Başka bir çalışmada (24), ACTH stimülasyonunu takiben tükürük glukokortikoid konsantrasyonunda % 986, plazmada ise % 350 artış kaydedilmiştir. Williams ve arkadaşları ACTH stimülasyonu ile pik kortizol konsantrasyonu olarak tükürükte 7 misli, plazmada 3 misli bir artış elde etmişlerdir (34).

Gebelik, hipertiroidi, oral estrojen alımı gibi CBG'in konsantrasyonunun veya bağlama kapasitesinin değiştiği bazı durumlarda plazma ve tükürük konsantrasyonları uyumsuz olabilmektedir (8,9,23,30,33). Bazı hayvan deneylerinde protein malnütrisyonunun tükürük bezi ve salgısındaki protein miktarını orta derecede etkilediği bulunmuştur (29).

Bu arada bazı araştırmacılar, tükürüğün plazmadaki serbest steroid konsantrasyonlarını iyi yansıttığının varsayılmasını, steroid bağlayan globulinlerin tükürükteki varlıklarının ölçülmesindeki farklılıklara ve yetersizliğe bağlamışlardır (15,25). Tükürükteki bağlayıcı protein konsantrasyonları, steroid bağlayıcı protein ölçen konvansiyonel deneylerin limitlerine yakın ya da altında bulunmuştur (plazma konsantrasyonlarının % 0,1'i) (15).

Chu ve arkadaşları, CBG (veya immünolojik olarak aynı cevabı veren benzer yapılı moleküller) ve proteine bağlı steroidlerin (plazmanın % 0,1-0,2'si) kontamine olmamış tükürükte mevcut olduğunu, tükürük total ve plazma serbest steroid konsantrasyonlarının aynı olmadığını göstermişlerdir (7). CBG ve proteine bağlı steroidlerin tükürüğe nasıl geçtikleri belirsiz olarak kalmıştır. Asiner hücrelerden ultrafiltrasyon yoluyla geçmesi, 300 moleküler ağırlık sınırından ötürü uzak ihtimaldir. Aktif bir olay rol oynamış olabilir. Tükürükteki CBG'in hepatik orijinli olmayıp lokal olarak sentezlenmesi de alternatif bir görüştür (16). Normal insanda % 0,1-0,2 lik plazma bağlı kortizolünün tükürükte olması, total kortizol konsantrasyonunu % 10-15 artırır (7).

Bir çalışmada, kan alma işleminden önce ve sonra alınan tükürük kortizol düzeyleri arasında belirgin bir fark bulunamamıştır (18). Aynı çalışmada yüksek moleküler ağırlıklı bileşiklerin denatürasyon ve presipitasyonu ile viskozitenin azaltılması ve böylece matriks etkilerinden korunmak için derin dondurma ve çözme işleminin en az iki kez yapılması tavsiye edilmemiştir.

## MATERYAL VE METOD

Çalışma iki ayrı grupta yapıldı. Birinci grupta steroid salgı ve metabolizmasını etkileyecek fizyolojik ve patolojik bir durumu olmayan, ayrıca, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı'mızda obezite, hirsutismus, Cushing sendromu ön tanıları ile surrenal kortikal fonksiyonları araştırılan, bazal değerleri normal olan, yaşları 14 ile 45 arasında değişen 24 kişide aynı gün sabah ve akşam tükürük ve simültane plazma örnekleri alındı. İkinci grupta ise yine aynı sebeplerle adrenal kortikal fonksiyonları araştırılan, yaşları 16 ile 65 arasında değişen 24 kişiye uygulanan ACTH testi sırasında tükürük örnekleri de alındı.

Her iki grupta da 12 saatlik açlıktan sonra sabah saat 08:00 de önce tükürük örneği ağız su ile çalkalanıp temizlendikten sonra, 5 dakikalık süre içinde tüp içerisine 1-2 cc. kadar alındı. Daha sonra 3-4 cc venöz kan örneği alınıp santrifüje edilerek serumları ayrıldı. Akşam örnekleri saat 20:00 de alındı.

ACTH stimülasyonu için 24 aminoasitten oluşan serntetik kortikotropin olan tetrakosaktid heksaasetik asit (Synacthen Depot ampul) 1,0 mg intramüsküler uygulandı. Uygulamadan hemen önce ve 1,4 ve 6 saat sonra örnekler aynı şekilde alındı.

Örnekler -20 °c da muhafaza edildi.

Plazma ve tükürük örneklerinde kortizol tayini "Amerlex Cortisol RIA kiti" ile A.Ü.T.F Endokrinoloji ve Metabolizma Laboratuvarı'nda yapıldı.

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmeleri A.Ü.T.F. İstatistik bilim dalında, "paired" t testi ve korelasyon analizinden yararlanılarak yapıldı.



## SONUÇLAR

Her iki grupta (n.48) bazal tükürük ve plazma kortizol düzeyleri ortalamaları incelenmiş, tükürük için  $0,50 \pm 0,07 \mu\text{g/dl}$  (s;0,51), plazma için  $18,67 \pm 1,01 \mu\text{g/dl}$  (s;7,00) bulunmuş, ikisi arasındaki ve yaşla aralarındaki ilişki anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Sabah ve akşam, tükürük ve plazma düzeylerine ilişkin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri Tablo I'de gösterilmiştir. Akşam değerlerinde tükürük için birey başına ortalama  $0,28 \pm 0,04 \mu\text{g/dl}$ , plazma için  $7,81 \pm 1,23 \mu\text{g/dl}$ 'lik azalma olduğu anlaşılmış ve her ikisi de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,001$ ). Düşüş yüzdeleri karşılaştırıldığında ise (tükürük için %72, plazma için %52) tükürükteki düşüşün daha fazla olduğu tespit edilmiş ve bu da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Tablo II de bazal ve 1.4. ve 6. saat tükürük ve plazma düzeylerinin ortalama, standart hata ve standart sapma değerleri verilmiştir. ACTH testi sırasında en yüksek ortalama tükürük kortizol konsantrasyonuna 6. saatte, en yüksek plazma kortizol konsantrasyonuna 4. saatte erişilmiştir. Erişilen maksimum tükürük kortizol konsantrasyonu  $5,42 \pm 1,35 \mu\text{g/dl}$  plazma kortizol konsantrasyonu ise  $56,63 \pm 6,29 \mu\text{g/dl}$  dir.

ACTH testi sırasında ortalama tükürük konsantrasyonunda 8,74, plazma kortizol konsantrasyonunda 2,55 misli artış olmuştur. Aradaki fark önemlidir ( $p<0,05$ ). Saatler arası farklar göz önüne alındığında gerek tükürük ve gerekse plazma için bazal ile 1.4. ve 6. saatler arası ve 1. ile 4. saatler arası artışlar anlamlı bulunmuş, 1. ve 6. saatler arası fark plazma düzeyleri açısından önemli değilken, tükürük için önemli, 4. ve 6. saatler arası fark ise her ikisi için de önemsiz bulunmuştur (Tablo III).

Şekil IV ve V'de tükürük ve plazma için sabah ve akşam kortizol düzeyleri ortalamaları grafik şeklinde belirtilmiş, şekli VI ve VII'de ise aynı işlem bazal, 1,4 ve 6. saat değerleri için yapılmıştır.

Örnek	n	Ortalama Tükürük Kortizol Düzeyi $\mu\text{g} / \text{dl}$		n	Ortalama Plazma Kortizol Düzeyi $\mu\text{g} / \text{dl}$	
		$X \pm S_x$	S		$X \pm S_x$	S
SABAH	24	$0,39 \pm 0,05$	0,23	24	$15,14 \pm 1,00$	4,91
AKŞAM	24	$0,11 \pm 0,03$	0,14	24	$7,33 \pm 0,96$	4,71
P		< 0,001			< 0,001	

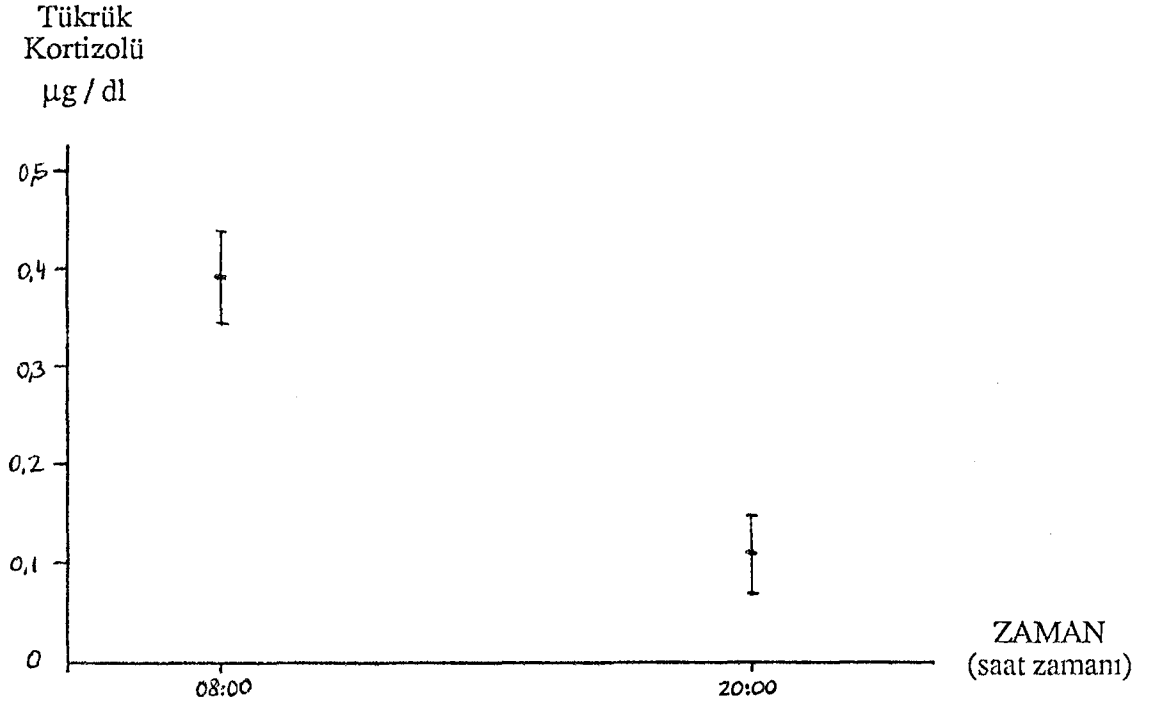
Tablo I. Sabah ve akşama ait tükürük ve plazma kortizol konsantrasyonlarının (mg/dl) ortalama, standart hata ve sapmaları ile sabah ve akşam kortizol düzeyleri ortalamaları arasındaki farkın önem kontrolü.

Örnek	n	Ortalama Tükrük Kortizol Düzeyi $\mu\text{g} / \text{dl}$		n	Ortalama Plazma Kortizol Düzeyi $\mu\text{g} / \text{dl}$	
		$X \pm Sx$	S		$X \pm Sx$	S
BAZAL	24	$0.62 \pm 0.14$	0.66	24	$22.19 \pm 1.44$	7.08
1. SAAT	24	$1.99 \pm 0.46$	2.25	24	$42.26 \pm 3.21$	15.73
4. SAAT	24	$3.95 \pm 0.68$	3.35	24	$56.63 \pm 6.29$	30.81
6. SAAT	24	$5.42 \pm 1.35$	6.62	24	$50.86 \pm 5.33$	26.10

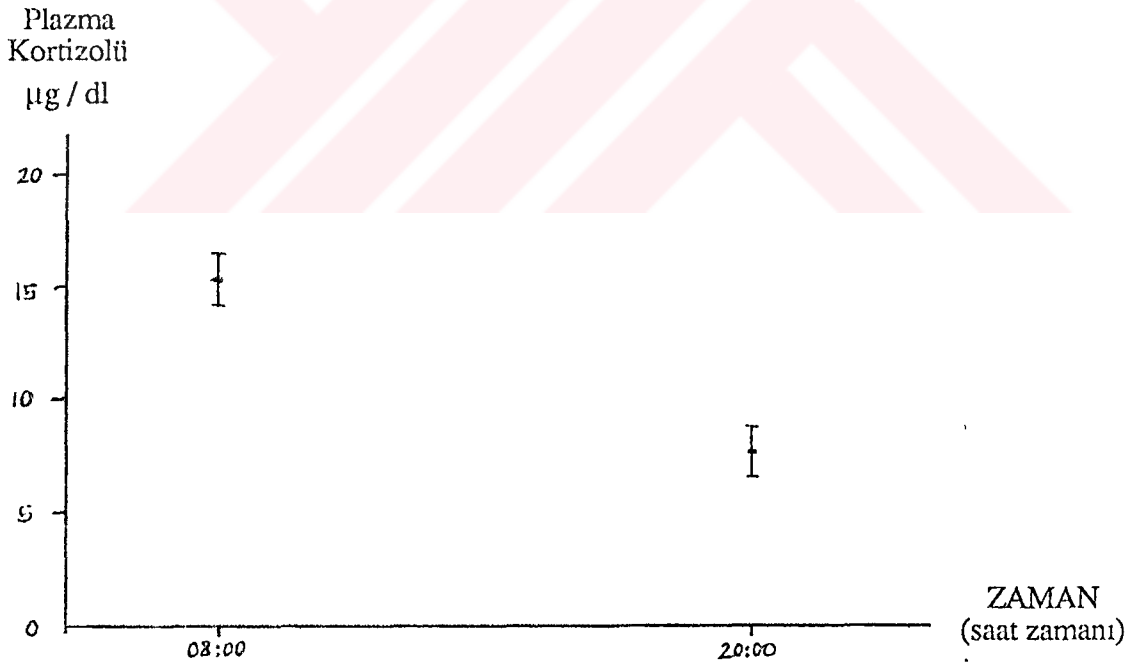
Tablo II. Bazal ve ACTH zerkinden sonra elde edilen ortalama plazma ve tükrük kortizol düzeyleri ( $\mu\text{g} / \text{dl}$ ) ile standart hata ve sapmaları.

Saatler	TÜKRÜK	PLAZMA
	P	P
0-1	< 0.01	< 0.001
0-4	< 0.001	< 0.001
0-6	< 0.01	< 0.001
1-4	< 0.001	< 0.01
1-6	< 0.01	> <u>0.05</u>
4-6	> <u>0.05</u>	> <u>0.05</u>

Tablo III. ACTH testi sırasında ölçüm ortalamaları arası farkın önem kontrolü

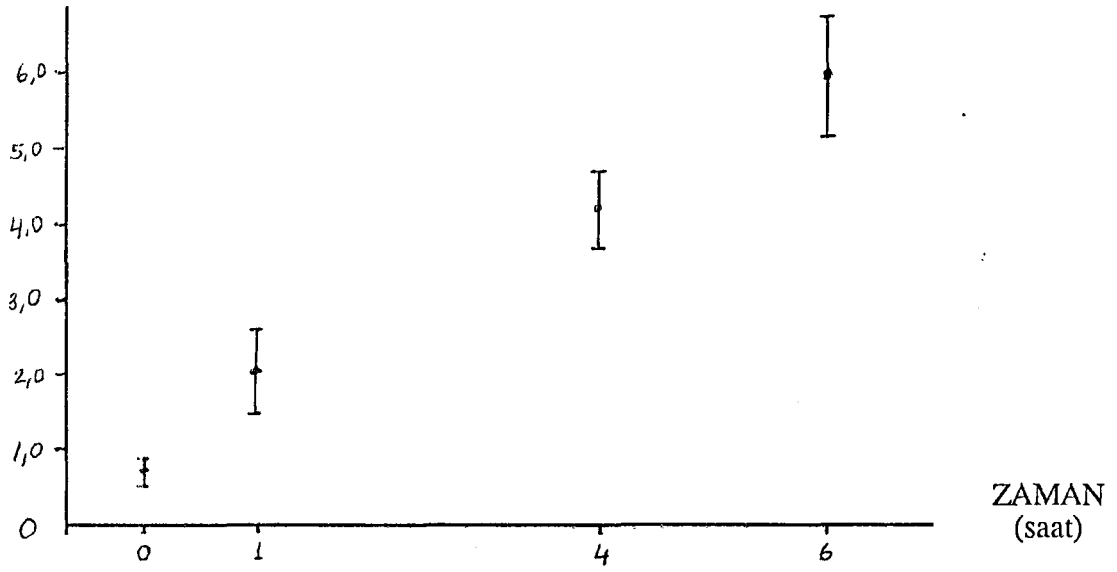


Şekil IV. Sabah ve akşam tükrük kortizol düzeyi ortalamaları ve standart hataları.



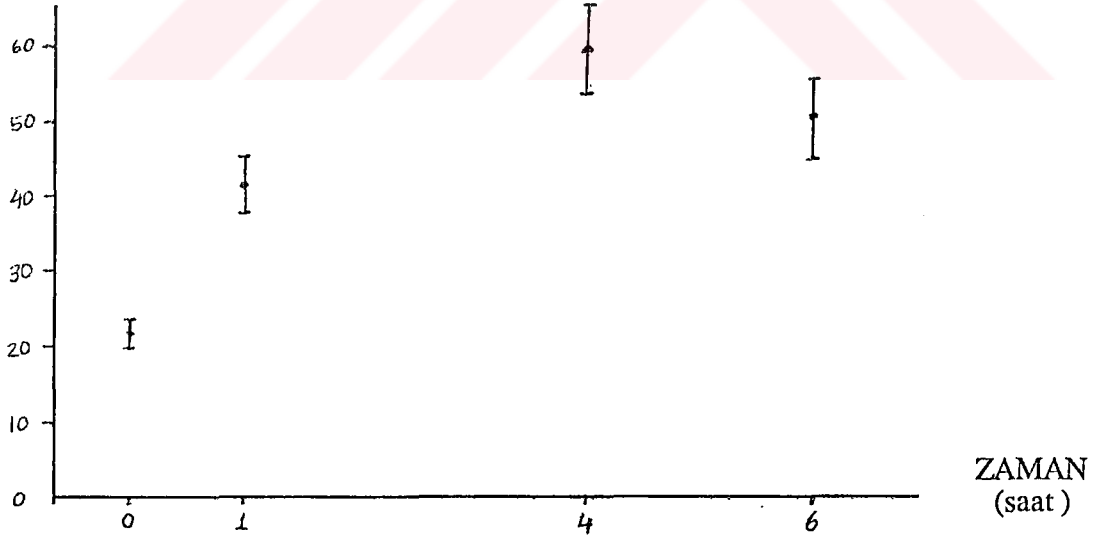
Şekil V. Sabah ve akşam plazma kortizol düzeyi ortalamaları ve standart hataları

Tükrük  
Kortizolü  
 $\mu\text{g} / \text{dl}$



Şekil VI. ACTH stimülasyonu öncesi ve sonrası tükrük kortizol düzeyi ortalamaları ve standart hataları

Plazma  
Kortizolü  
 $\mu\text{g} / \text{dl}$



Şekil VII. ACTH stimülasyonu öncesi ve sonrası plazma kortizol düzeyi ortalamaları ve standart hataları.

## TARTIŞMA

Kan ve diğeri vücut sıvılarındaki muhtelif maddelerin analizinde hassasiyet daima ön plânda aranır. Bu hassasiyeti sağlayan tetkikin de mümkün olduğunca rutin olarak uygulanabilirliğinin olması ve noninvazif olması istenen özelliklerdir. Muhtelif RIA teknikleri tarafından sağlanan hassasiyet, çok az düzeydeki maddelerin de ölçülebilmesini sağlamaktadır.

Homonlar ele alındığında, aktif konponentlerinin konsantrasyonları değerlendirmelerde önem taşır. Çoğunda olduğu gibi, steroid hormonlar, özellikle de kortizol için proteine bağlı olmayan kısım biyolojik olarak aktif kabul edilir. Ancak plazmadaki proteine bağlı olmayan kortizol konsantrasyonlarının ölçülmesi teknik olarak zor ve masraflı olduğundan kortizolün bu konponentini yansıtacak başka yollar aranmıştır. Genel bilgiler kısmında da bahsedilen muhtelif tetkikler, tükrüğün plazma serbest kortizolünü yansıtmada değerli bir vücut sıvısı olduğu görüşünün ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bu hassasiyet, tükrüğün bağlayıcı proteinleri ihtiva etmemesi ile açıklanmak istenmiştir. Ancak tekniklerin geliştirilmesi ile bu proteinlerin daha hassas ölçümü sağlanmış ve bu konudaki değerlendirmelerin yeniden yapılması gereği ortaya çıkmıştır (7,14,18,23).

Buna rağmen, tükrüğün muhtelif hormonların, özellikle de kortizolün aktif düzeylerini daha hassas yansıtabileceği düşünülmekte ve bu bakımdan incelemelere devam edilmektedir.

Bu çalışmada elde ettiğimiz bulgular başlıca dört grupta toplanabilir:

1) Araştırmaya aldığımız hastalarda saat 8:00 ve saat 20:00 tükürük kortizol konsantrasyonları ölçülmüştür. Bazal tükürük kortizol konsantrasyonları ortalaması  $0,50 \pm 0,07$   $\mu\text{g/dl}$ 'dir ( $13,80 \pm 1,93$  nmol/L). Bazal tükürük ve plazma kortizol düzeyleri arasındaki ilişki anlamlı bulunmadı ( $p > 0,05$ ). Laudat ve arkadaşları  $15,5 \pm 0,8$  nmol/L, Foreman ve arkadaşları  $12,9 \pm 12,9$  nmol/L olarak bildirmişlerdir (11,23). Saat 20:00'de ölçülen kortizol düzeyleri ortalaması  $0,11 \pm 0,03$   $\mu\text{g/dl}$  ( $3,04 \pm 0,83$  nmol/L) bulundu. Aynı saate ait Laudat ve arkadaşlarının bildirdiği ortalama ise  $3,9 \pm 0,2$  nmol/L'dir (23).

Bulduğumuz ortalama değerler literatür ile uygunluk göstermektedir.

2) Saat 20:00 kortizol konsantrasyonlarında, saat 08:00 değerlerine göre saptanan yüzde azalma tükürükte, plazmada olduğundan daha fazla olmuştur (tükürük için %72, plazma için %52 : $p < 0,05$ ). Bu nedenle tükürük kortizol konsantrasyonunun kortizolün diüurnal salgı örneğini güvenilir bir biçimde yansıttığı söylenebilir.

3) ACTH uyarısına yanıt olarak tükürük kortizol konsantrasyonlarında, plazma kortizol konsantrasyonlarına göre daha belirgin bir artış olmuştur. Walker ve arkadaşlarının (33) birinci saatte ve parotid sıvısı için 8 misli, plazma için 3 misli olarak gördükleri pik değere tükürük için 4., plazma için 6. saatte erişilirken, artışlar bazale göre maksimum olarak, tükürük için 8,74, plazma için 2,55 misli idi. Williams ve arkadaşlarının çalışmasında, ACTH stimülasyonundan sonraki pik değer tükürükte bazale göre 7 misli, plazmada 3 misli idi (34). Başka bir çalışmada tükürükte %986, plazmada %350'lik bir artış tesbit edilmiştir (24). Laudat ve arkadaşlarının çalışmasının sonuçları ise aşağıdadır (parantez içindeki değerler çalışmamıza aittir).

Bazal tükürük kortizolü:  $12,1 \pm 0,8$  nmol/L ( $17,11 \pm 3,86$  nmol).

Bazal plazma total kortizolü:  $433 \pm 18,5$  nmol/L ( $612,44 \pm 39,74$  nmol/L).

ACTH'den sonra bir saat sonra;

Tükrük:  $52,2 \pm 2,2$  nmol/L ( $54,92 \pm 12,70$  nmol/L).

Plazma  $897 \pm 22$  nmol/L ( $1166,38 \pm 88,60$  nmol/L).

Bu belirgin artışın sebebi belki de ACTH uyarısından sonra ortaya çıkan kortizol salgısı artışı sonucunda CBG'in satüre olmasıdır. Böyle bir durumda serbest kortizol konsantrasyonunda daha belirgin bir artış olacağı tabiidir (23).

4) Yalnız bazal şartlarda ölçülen tükrük ve plazma kortizol konsantrasyonları arasında anlamlı korelasyon saptanmamıştır. Bunun nedeni belki, tükrük kortizol konsantrasyonunun serbest plazma kortizol konsantrasyonunu yansıtmasıdır. Biz ise plazma serbest kortizol konsantrasyonunu değil, plazma total kortizol konsantrasyonunu ölçtük. Korelasyon analizi de plazma total kortizol konsantrasyonları ile tükrük kortizol konsantrasyonları arasında yapılmıştır.

Araştırmaya dahil ettiğimiz hastalardan 27 yaşındaki bir kadında, tetkiklerinin tamamlanması sonucu Cushing Sendromu tesbit edildi. ACTH stimülasyonuna verdiği cevap normaldi. Deksmetazon testinde ise 1 mg ve 2 mg ile sağlanamayan supresyona, 8 mg ile ulaşıldı. Bilgisayarlı tomografik incelemede bilateral surrenal nodüler hiperplazi tespit edildi (daha sonra hastaya bilateral adrenalectomi uygulandı). Bu hastanın ilk tetkiklerinden olan ve plazma incelemelerinde normal cevap görülen (kortizol için: bazal  $18,8$  µg/dl, 1. saat  $30,8$  µg/dl, 4. saat  $60,0$  µg/dl, 6. saat  $39,9$  µg/dl).

ACTH stimülasyonu sırasında simültane tükrük kortizol konsantrasyonları ise; bazal  $2,3$ , 1. saat  $10,8$ , 4. saat  $13,9$ , 6. saat  $15,6$  µg/dl idi. Bu sonuçlar tablo II'de verilen ortalamaların üzerindedir.

Çalışmamızdaki tükürük kortizol konsantrasyonu değerlerinin hudutlarındaki genişlik, daha önce bahsedilen lokal protein yapımı, tükürükte kortizolün kısmen metabolize olması, plazma serbest/bağlı kortizol oranındaki farklılıklar, tükürüğe geçen bağlayıcı protein miktarındaki değişiklikler, derin dondurma süresi ve sayısı ile tükürük kortizol konsantrasyonunu %10 oranında etkileyebildiği öne sürülen matriks etkisi gibi faktörlerle açıklanabilir.

Yukarıda 4 madde halinde özetlediğimiz ve literatür verileri ile karşılaştırdığımız bulgularımızın ışığı altında, sonuç olarak diyebiliriz ki, tükürük kortizol konsantrasyonu kortizol salgısının iyi bir göstergesidir ve sürrenal hastalıklarının tanı ve ayırıcı tanısında yararlı olacağı düşünülebilir. Yalnız öyle bir yargıya daha kesin bir biçimde varmak, iyi plânlanmış ve dikkatli uygulanmış ileri çalışmalar sonucunda mümkün olabilir. Tükürük kortizol konsantrasyonları plazma serbest kortizol konsantrasyonları ile karşılaştırılmalıdır (çalışmamızda ise plazma serbest kortizol konsantrasyonları ölçülmemiştir). Sürrenal kortizol salgı işlevinde bozukluk bulunan hastalarda bazal şartlarda ve dinamik testler (ACTH, deksametazon) sırasında tükürük kortizol konsantrasyonları ölçülmelidir. Ayrıca tükürükte kortizol konsantrasyonunun normal sınırları daha geniş populasyonlarda yapılacak çalışmalarla belirlenmelidir.

## ÖZET

Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı'nda gerçekleştirilen bu çalışmada yaşları 14-45 arasında değişen toplam 24 hastada saat 08:00 ve 20:00 de tükürük ve plazma total kortizol konsantrasyonları ölçülmüştür. Ayrıca yine Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı'nda sürrenal fonksiyonları yönünden tetkik edilen yaşları 16-65 arasında değişen 24 hastada ACTH uyarı testi sırasında plazma total kortizol konsantrasyonları ölçülmüştür.

Sabah ve akşam kortizol konsantrasyonları arasındaki farkın, sürrenal kortizol salgısı bozukluğu bulunmayan hastalar üzerinde yapılan incelemede, tükürük değerlerinde, plazma değerlerine göre daha belirgin olduğu saptanmıştır. ACTH uyarı testinde de kortizol konsantrasyonlarındaki artış tükürükte plazmaya göre daha belirgin olmuştur.

Elde edilen sonuçlar, tükürük kortizol konsantrasyonlarının, kortizol salgısının iyi bir göstergesi olabileceğini düşündürmektedir. Fakat bu konunun daha iyi belirlenmesi için tükürük kortizol konsantrasyonlarının sürrenal kortizol salgısı bozukluğu bulunan hastalarda (Cushing sendromu ve Addison hastalığında) da ölçülmesi ve bu hastalara yapılan dinamik testler (başlıca ACTH ve deksametazon testleri) sırasında izlenmesi gerekmektedir. Ayrıca tükürük kortizol konsantrasyonları, plazma serbest kortizol konsantrasyonları ile karşılaştırılmalıdır. Çünkü, tükürük kortizol konsantrasyonunun plazma serbest kortizol konsantrasyonunu yansıttığı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- 1- Aras K, Erşen G: Adrenal korteks hormonları. Tıbbi Biyokimya: Hormonlar. 1. Baskı Ankara, A.Ü.T.F. Yayınları, 1974, sayfa 53-73.
- 2- Ben-Aryeh H, Roll N, Lahav M, Dlin R, Hanne-Paparo N, Szargel R, Shein-Orr C, Laufer D: Effect of exercise on salivary composition and cortisol in serum and saliva in man. J Dent Res 68 (11): 1495-7, 1989.
- 3- Bondy PK: Disorders of adrenal cortex. In Wilson JD, Foster DN (eds): Williams Textbook of Endocrinology. 7th ed. Philadelphia, WB Saunders Co. 1985, pp 816-90.
- 4- Booth WD, White CA: The isolation, purification and some properties of pheromaxein, the pheromonal steroid-binding protein, in porcine submaxillary glands and saliva. J Endocr 118: 45-57, 1988.
- 5- Broughton A: Application of adrenocorticotropin assays in a routine clinical laboratory. Am J Clin Pathol 64: 618-24. 1975.
- 6- Carroll BJ, Curtis GC, Miendels J: Cerebrospinal-fluid and plasma free cortisol concentrations in depression. Psychol med 6:235-44, 1976.

- 7- Chu F. W., Ekins RP : Detection of corticosteroid binding globulin in parotid fluids ; evidence for the presence of both protein-bound and non-protein-bound (free) steroids in uncontaminated saliva. *Acta Endocrinologica (Copenh)* 119 : 56-60, 1988.
- 8- D'alessandro S, Curbelo MM, Tumilasci OR, Tessler JA, Houssay AB : Changes in human parotid salivary protein and sialic acid levels during pregnancy. *Arch Oral Biol* 34 (10) : 829-831, 1989.
- 9- Dunn JF, Nisula BC, Rodbard D. : Transport of steroid hormones : binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 53 : 58-68, 1981.
- 10- Few JD, Mangat TK, Oppe TE, James VHT : Saliva aldosterone concentration in healthy infants. *Archives of Disease in Childhood* 61 : 508-9, 1986.
- 11- Foreman DM, Goodyer IM : Salivary Cortisol hypersecretion in juvenile depression. *J. Child Psychol Psychiat* 29 (3) : 311-20, 1988.
- 12- Granner DK. : Hormones of the adrenal cortex. In Murray RK, Granner Dk, Mayes PA, Rodwell VW (eds) : *Harper's Biochemistry*. 21 st ed. Los Altos California, Appleton & Lange, 1988, pp. 511-23.
- 13- Granner DK : Hormones of the gonads. In Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (eds) : *Harper's Biochemistry*. 21 st ed. Los Altos, California, Appleton & Lange, 1988, pp. 537-8.
- 14- Gündüz M : Kortikosteroidlerin yapıları, biyosentezi ve fizyolojik etkileri. *Fizyopatoloji Cilt 1*. 1. Baskı, İzmir, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

Yayınları, 1977, Sayfa 136-54.

- 15- Hammond GI, Langley MS : Identification and measurement of sex hormone binding globulin (SHBG) and corticosteroid binding globulin (CBG) in human saliva. *Acta Endocrinologica* 112 : 603-8, 1986.
- 16- Hammond GL, Smith CL, Goping IS : Primary structure of human corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and pulmonary cDNA s, exhibits homology with serine protease inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 84 : 515 3-7, 1987.
- 17- Harris B, Cook NJ, Walker RF, Read GF, Riad-Fahmy D : Salivary steroids and psychometric parameters in male marathon runners. *Br J Sports Med* 3 (2) : 89-93, 1989.
- 18- Harris B, Cook N, Warner N, Read GF, Walker RF, Thomas R, Riad. Fahmy D: Anxiety and the dexamethasone suppression test monitored with saliva. *Biol Psychiatry* 23 : 698-704, 1988.
- 19- Jacobs HS, Nabarro JDN : Tests of hypothalamic pituitary adrenal function in man. *Quart J Med* 38 : 475, 1969.
- 20- Jonsson R, Howland BE, Bowden GHW : Relationships between periodontal health, salivary steroids, and *Bacteriodes Intermedius* in males, pregnant and non-pregnant women. *J. Dent Res* 67 (8) : 1062-9, 1988.
- 21- Kakimoto Y, Nakamura A, Tani H, Nagasawa Y, Yagura S : Crew workload in JASDF C-1 transport flights : I. Change in heart rate and salivary cortisol. *Aviat Space Environ Med* 59 : 511-6, 1989.

- 22- Kehlet H, Blichert-Toft M, Linghoim J, Rasmussen P : Short ACTH test in assessing hypothalamic-pituitary and adrenocortical function. *Br Med J* 1: 249-51, 1976.
- 23- Laudat MH, Cerdas S, Fournier C, Guiban D, Guilhame B, Loton JP : Salivary Cortisol measurement : A practical approach to assess pituitary-adrenal-function. *J Clin Endocrinol Metab* 66 : 343, 1988.
- 24- Lee CY, Few JD, Tames VHT : The determination of 18- hydroxycorticosterone in saliva and plasma : comparison with aldosterone and glucocorticoids. *J Steroid Biochem* 29 (9) : 511-7, 1988.
- 25- Lin LY, Chang CC : [Determinastion of protein concentration in human saliva]. *Kao Hsiung I Hsuch Ko Hsuch Tsa Chih* 5 (7) : 389-97, 1989, Eng Abs..
- 26- Manson JD : The oral environment. In Manson JD (ed) : *Perodontics*. 3 rd ed. London, Henry Kimpton Publishers, 1975, p 24.
- 27- Murphy BED : Some studies of the protein-binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurement of varios steroids in body fluids by competitive protein-binding radiossay. *J Clin Endocr* 27 : 973-90, 1967.
- 28- Murphy BEP, Okouneff LM, Klein GP, Ngo SC : Lack of specificity of cortisol determinations in human urine. *J. Clin Endocrinol Metab* 53 : 91, 1981.
- 29- Naini A, Morgan B, Mandel ID : Effect of protein malnutrition on the composition of submadibular glands of aged rats. *Arch Oral Biol*, 34 (12) : 985-8, 1989.

- 30- Pugeat MM, Dunn JF, Nisula BC : Transport of steroid hormones : Interaction of 70 drugs with testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. J Clin Endocrinol Metab 53 : 69-75, 1981.
- 31- Rose LI, Williams GH, Jagger PI, Lauler DP : The 48-hour adrenocorticotrophin infusion test for adrenocortical insufficiency. Ann Intern Med 73 : 49-54, 1970.
- 32- Rose RM : Psychoendocrinology. In Wilson JD, Foster DW (eds) : Williams Textbook of Endocrinology. 7 th ed. Philadelphia, WBSaunders Co, 1985, pp 653-82.
- 33- Walker RF, Riad-Fahmy D, Read GF : Adrenal status assessed by direct radioimmunoassay of cortisol in whole saliva or parotid saliva. Clin Chem 24 (9) : 1460-3, 1978.
- 34- Williams H, Read GF, Verrier-Jones ER, Hughes IA : Effect of inhaled beclomethasone dipropionate on saliva cortisol concentrations. Arch Dis Child 59 : 553-6, 1984.

  
Yükseköğretim Kurulu  
Dokümantasyon Merkezi