

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ENDOKRİNOLOJİ VE METABOLİZMA BİLİM DALI

**CUSHİNG SENDROMU TANISINDA YENİ BİR TANI YÖNTEMİ OLARAK
TÜKÜRÜK KORTİZOLÜ**

Yan Dal Uzmanlık Tezi

Uzm.Dr. MERAL MERT

Tez Danışmanı: Prof. Dr. REFİK TANAKOL

İSTANBUL-2009

Bu tez Çalışması İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu Yürütücü Sekreterliği tarafından desteklenmiştir.

Proje No: T-635/17032005

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KISALTMALAR.....	4
GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
GENEL BİLGİLER.....	7
TANIM.....	9
EPİDEMİYOLOJİ.....	12
PATOFİZYOLOJİ.....	13
KLİNİK.....	16
MATERYAL VE METOD.....	31
BULGULAR.....	35
TARTIŞMA.....	50
SONUÇ	59
ÖZET.....	60
KAYNAKLAR.....	63

Yan dal uzmanlık eğitimim süresince engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen başta Endokrinoloji Bilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Faruk Alagöl olmak üzere tüm hocalarıma teşekkürü borç bilirim.

Tezimin her aşamasında bana büyük bir özveriyle yardımcı olan sayın hocam Prof .Dr. Refik Tanakol'a, yoğun çalışma programı içinde biyokimyasal analizlere vakit ayıran Doç. Dr. Semra Abbasoğlu'na , As. Dr. Hande Karpuzoğlu'na teşekkürlerimi sunarım. Eğitimim süresince engin bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr. Halil Dinçer Azizlerli, Prof. Dr. Temel Yılmaz, Prof. Dr. Yusuf Orhan, Prof. Dr. İlhan Satman, Prof. Dr. Nevin Dinççağ, Prof. Dr. Kubilay Karşıdağ, Prof. Dr.Ferihan Aral, Prof. Dr. Neşe Çolak, Prof. Dr. Sema Yarman, Prof. Dr. Fatma Harika Boztepe, Prof. Dr. Adil Doğan Azezli' e teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen endokrin laboratuvar sorumlusu sayın Prof. Dr. Beyhan Ömer'e ve tüm laboratuvar çalışanlarına teşekkür ederim.

Yoğun çalışma programı içinde tezimin istatistiklerini yapan sayın Yrd. Doç. Dr. Funda Sezgin'e teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim süresince beraber çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum tüm uzman ve asistan arkadaşlarıma, endokrinoloji bilim dalı çalışanlarına, desteğini sürekli hissettiğim aileme şükranlarımı sunarım.

KISALTMALAR

ACTH	Adrenokortikotropik hormon
CRH	Kortikotropin releasing hormon
DST	Deksametazon supresyon test
HPA	Hipotalamo-pituiter aks
KBG	Kortizol bağlayıcı globulin
HPLC	High performance liquid chromatografi
RIA	Radyoimmunoassay
LIA	Luminesans immünassay
İPSS	İnferior petrosal sinüs sampling
GIP	Gastrik inhibitör polipeptid

CUSHİNG SENDROMU TANISINDA YENİ BİR TANI YÖNTEMİ OLARAK TÜKÜRÜK KORTİZOLÜ

GİRİŞ VE AMAÇ

Cushing sendromu artmış kan glukokortikoid düzeylerine uzun süre maruz kalma sonucu gelişen klinik tabloları tanımlar. Cushing sendromu tanısında tipik klinik özelliklerin (trunkal obezite, Buffalo hörgücü, mor strialar, hipertansiyon ve glukoz intoleransı gibi) yanı sıra vücutta kortizol artışı olduğunun da biyokimyasal olarak gösterilmesi gerekir. Subklinik hiperkortizolemi, siklik Cushing sendromu, aberan reseptörlere bağlı Cushing sendromu gibi yeni tanımların da ortaya konmasıyla beraber tanıda kullanılan testlerin duyarlılığı ve tanısal değerinin gözden geçirilmesi ve ayrıca yeni tanı yöntemlerinin bulunma gerekliliği ortaya çıkmıştır. Kötü kontrollü diyabetes mellitus, hipertansiyon, obezite, hirsutizm, depresyon, polikistik over sendromu gibi psödo-cushing sendromuna yol açan tabloların yeniden değerlendirilmesinden sonra endojen hiperkortizolizm sıklığı %2-5 arasında bulunmuştur. Bu oranların saptanmasıyla beraber tanıda kullanılan testlerin duyarlılığı yeniden sorgulanmaya başlanmış ve hem eşik değerleri değişime uğramış hem de yeni tanı yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır. Halen bu amaçla düşük doz deksametazon supresyon testi, idrar serbest kortizolü, diurnal ritmin kaybolması, deksametazon-CRH testi ve gittikçe artan oranda geceyarısı tükürük kortizol tayinleri kullanılmaktadır.

Çalışmamızda Cushing sendromu tanısında basit, non-invaziv ve yeni tanı yöntemlerinden biri olan geceyarısı tükürük kortizolünün tanısal değeri araştırılmıştır.

TARİHÇE

Bartolomeo Eustachius, adrenal bezleri tanımlayan ilk kişidir, 1563'te “ glandulae renibus incumbents” olarak tanımlamış ve “opuscula anatomica” da göstermiştir. Ancak adrenal bezlerin fonksiyonları 19. yüzyılın ortalarına kadar saptanamamış, 1855'te Thomas Addison tarafından egzersiz, genel ekonomi ve vücut fonksiyonları üzerine etkilerine dikkat çekilmiştir. Bundan kısa süre sonra Charles Brown-Sequard köpeklerde adrenalektomi yaparak bu durumun yaşamsal önemini ortaya koymuştur. Bundan sonra adrenal bezin tümörleri tek tek bildirilmeye başlanmıştır.

Hipofiz bezi ise adrenal bezlerden daha önce keşfedilmiş, üçüncü yüzyılda Galen tarafından ilk kez phlegmon olarak görülmüş ve Latince “pituita” olarak tanımlanmıştır. 1672 'de Richard Lower tarafından ilk kez hipofiz bezinin fonksiyonlarına dikkat çekilmiştir.

20. yüzyılda ise kısmen tanımlanan akromegali hariç hipofiz tümörleri ve klinikleri hakkında çok az şey biliniyordu. 1901 'de Harvey Cushing ilk olarak 14 yaşında obez, tedaviye yanıt vermeyen progresif görme kaybı ve baş ağrısı olan bir hastada otopsi yaparak hipofizer tümör saptamıştır. Aynı dönemlerde Alfred Frohlich'in de benzer vakası olduğunu öğrenen Cushing araştırmalarına devam etmiştir. Beraber çalıştığı arkadaşlarından Minnie G retrospektif olarak hiperkortizolizme bağlı bir sendromu tanımlamıştır. Cushing araştırmalarının sonucunda 12 vakayı içeren Cushing sendromu ile ilişkili ilk yazısını yayınlamıştır(1). Bundan kısa süre sonra Bishop ve Close Cushing sendromu olarak adlandırdıkları çok benzer vakalarını yayınlamıştır. 1960'da Liddle ve Shute Cushing sendromu tanısında üç aşamanın gerektiğini göstermişler, bunları klinik sendromun tanımlanması, hiperkortizoleminin gösterilmesi, üç nedeninin arasında ayırıcı tanının yapılması olarak bildirmişlerdir (2). Bunu günümüze kadar pek çok araştırma izlemiştir.

GENEL BİLGİLER

Kortizol

Kortizol adrenal kortekste sentezlenen lipofilik ve steroid yapıda bir hormondur. Kortizol salgılanması hipotalamustan CRH ve hipofizden ACTH tarafından negatif feed back mekanizmasıyla düzenlenmektedir. Kortizol plazmada %90 oranında kortizol bağlayıcı globuline (KBG), % 8 albümine bağlı, %1-2 serbest halde bulunur. Sadece serbest kısmı hedef hücrelerde etkilidir. Total kortizol seviyelerinin 145-180 ng/ml'si (400-500 nmol/l) kortizol bağlayıcı globuline (KBG) ile bağlı halde bulunmaktadır. Bu değerlerin üzerinde, plazmadaki serbest kortizol seviyesi yükselir. Plazmadaki total kortizol değerleri KBG'in düzeyinden etkilenir. KBG plazmada yükseldiğinde total kortizol seviyesi de artar. İlaçlar (oral kontraseptif kullanımı), fizyolojik (hamilelik) ve patolojik olaylar (karaciğer hastalıkları, inflamasyon, polikistik over sendromu), KBG'nin düzeylerini etkileyebilen durumlar olarak sayılabilir. Plazma ve tükürükteki serbest kortizol düzeyleri bu durumdan etkilenmemektedir.

Kortizol seviyelerini etkileyen durumlar:

1. Fizyolojik
 - Stres
 - Egzersiz
 - Eksternal ACTH uygulanması
 - Eksternal kortizol uygulanması
2. Patolojik:
 - Hiperkortizolizm
 - Hipokortizolizm

Kortizolün Etkileri

- Lipid ve protein katabolizmasını ve glikoneogenezi artırır. Yağ depolarından yağ asitlerini mobilize eder. Glikojenoliz artar. Karaciğer dışında protein yapımını azaltır, yıkımını artırır. Karaciğere ise aminoasitlerin girişini kolaylaştırır. Karaciğere giren bu aminoasitler glikoneogenez ve protein yapımında kullanılır. Az miktarda olsa da lipolitik aktivitesi olmasına rağmen kortizol miktarının fazla olduğu durumlarda kortizolün diyabet yapıcı etkisine bağlı olarak insülin salgısı artar. Güçlü lipogenik aktiviteye sahip olan insülinin etkisiyle cushing sendromunda yağ birikimi olur.

- İnsüline karşı antagonistik etki gösterir. GLUT 4 reseptörleri aracılığıyla glukoz uptake'ini azaltır, karaciğerden glukoz yapım ve salınımını artırır.
- Anti-allerjik ve anti-inflamatuar etki gösterir. Kortizol fosfolipaz A2'i inhibe eden lipokortinler aracılığıyla inflamasyonda önemli rol oynayan araşidonik asit sentez ve salınımını inhibe eder. Glukokortikoidler lizozomların stabilizasyonunu sağlayarak proteolitik enzimlerin salınımını da engeller. Ayrıca mast hücre proliferasyonunu inhibe eder, sitokinlerin oluşumunu, infeksiyon ve travma bölgesine birikimini inhibe ederler. Dolaşımdaki nötrofillerin, eozinofillerin ve fibroblastların sayı ve fonksiyonlarını etkilerler. T ve B lenfositlerin sayısını azaltır. Sonuç olarak hücre sel ve hümoral immünitede azalmaya neden olur.
- Kalp kasılma gücünü ve periferik mikrosirkülasyonu artırır. Normal kan basıncının sağlanması, arteriollerin katekolaminler ve anjiotensin II'e cevabının sağlanması, normal myokardiyal fonksiyonların sürdürülebilmesi için kortizolün etkileri gereklidir.
- Gastrik salgıyı artırır.
- Osteoporotik etki yapar. Osteoblast fonksiyonlarını baskılar, yeni kemik oluşumunu azaltır, osteoklast sayısı ve aktivitesi artar. Kortizol fibroblast proliferasyonunu ve kollajen sentezini inhibe eder. Ayrıca glukokortikoid fazlalığı gastrointestinal sistemden kalsiyum absorpsiyonunu ve renal kalsiyum reabsorpsiyonu azaltır.
- Ön hipofiz hormonlarının salgılanmasını suprese eder.
- Kortizol, glomeruler kan akımını artırır, proksimal tubullerden fosfat reabsorpsiyonunu azaltıp, ekskresyonunu artırarak GFR'i artırır. Kortizol artışı olduğunda böbrekte aldosteron benzeri etkiyle tuz ve su retansiyonu olur. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase Tip 1 böbrek tubullerinde aktif kortizolü inaktif kortizona dönüştüren enzimdir. Bu enzimin kapasitesinde artış olur, kortizol benzer afinitesi olan aldosteron reseptörleri üzerinden etki etmeye başlar.

CUSHİNG SENDROMU VE PSÖDO-CUSHİNG SENDROMUNUN TANIMLARI

Cushing sendromu, değişik nedenlere bağlı olarak gelişen kronik glukokortikoid fazlalığının neden olduğu klinik tabloları tanımlar. Cushing sendromu ACTH'a bağımlı veya bağımsız olarak gelişebilir.

Tablo 1. Cushing sendromunda etyoloji
ACTH-bağımlı <ul style="list-style-type: none">• Hipofizer (Cushing hastalığı)• Ektopik ACTH sendromu• Ektopik CRH sendromu• ACTH kullanımı
ACTH-bağımsız <ul style="list-style-type: none">• Adrenal adenom• Adrenal karsinom• Makronodular adrenal hiperplazi (kısmen ACTH bağımlı)• Pigmente mikronodular adrenal hiperplazi (sporadik veya Carney kompleksin bir parçası olarak)• Anormal hormon reseptör ekspresyonu veya fonksiyonuna bağlı adrenal hiperplazi (AIMAH) (gastrik inhibitör polipeptid, vazopressin, β-adrenerjik ajanlar gibi)• McCune- Albright sendromu• Glukokortikoid kullanımı

Psödo-Cushing sendromu, Cushing sendromunun bazı klinik bulgularını taşıyan ve biyokimyasal olarak hiperkortizolemi bulgularını taklit eden durumlar olarak tanımlanmaktadır. Kadın ve erkeklerde benzer sıklıkta ve her yaşta görülebilir. Kronik anksiyete ve/veya depresyon, kronik alkolizm, alkol yoksunluk sendromu, morbid obezite, kötü kontrollü diyabetes mellitus gibi durumların psödo-Cushing sendromuna yol açtıkları bildirilmektedir (3,4,5,6).

Ayrıca oral kontraseptif kullanımı, gebelik gibi hiperöstrojenemik durumlar ve stres durumları da psödoCushing sendromu sebepleri arasında sayılmaktadır. Klinisyenler için Cushing sendromunun psödo-Cushing sendromundan ayırt edilmesi önemlidir.

Psödo-Cushing Sendromuna Yol Açan Durumlar

Klinik özellikleri Cushing sendromunu düşündürmeyen, yüksek kortizol sekresyonu ile birlikte olan durumlar

1)Stres durumları

Cerrahi

Ciddi hastalık

Kalorik stres

Aerobik stres

Emosyonel stres

2)Alkolizm

Kronik alkolizm

Etanol yoksunluk sendromları

3)Psikiyatrik bozukluklar

Depresyon (özellikle melankolik depresyon)

Anoreksiya Nervosa

Bulimia

Psikoz

Panik bozukluk

4) Böbrek Yetmezliği

5) Morbid Obezite

6) Primer glukokortikoid reseptör direnci

7) Artmış sıvı alımı (Psikojenik polidipsi veya diabetes insipidus)

8) Kontrolsüz diabetes mellitus

Kliniği Cushing sendromunu taklit eden ancak kortizol düzeyleri normal bulunabilen durumlar

- 1)Obezite
- 2)Metabolik Sendrom
- 3) Polikistik Over Sendromu
- 4) Büyüme hormonu eksikliği
- 5) HIV Enfeksiyonu
- 6) Glukokortikoidlere aşırı cevaplılık
- 7) Kortizol katabolizmasında yetersizlik

Psödo-Cushing sendromunun patofizyolojisinde pek çok etken suçlanmaktadır. Bir hipoteze göre psödo-Cushing sendromunda strese bağlı olarak CRH nöron aktivitesinde artış olmakta, buna sekonder olarak ACTH artışı, adrenal hiperplazi ve kortizol yapımında artış olduğu bildirilmektedir (7). Bu hipotez intermittan ve hafif hiperkortizolizmi açıklar. Cushing sendromundan farklı olarak hipotalamik- hipofizer-adrenal aks normaldir ve negatif kortizol geridenetimi korunmuştur. Hipertrofiye uğrayan adrenal bezler glukokortikoid sentez artışına yol açmakta ancak ACTH düzeyleri normal kalmaktadır. Özellikle melankolik depresyonda olmak üzere, depresyon hastalarında hiperkortizolemi varlığında asıl defektin hipotalamus düzeyinde olduğu düşünülmektedir. Bu hastalarda CRH'ye ACTH cevabı azalmış, kortizole bağlı negatif geri denetim mekanizması korunmuştur. Depresyonlu hastalarda bazal plazma kortizol seviyeleri normalken, CRH' ye kortizol cevabı normal, ACTH'ye cevap ise abartılıdır. BOS'ta CRH seviyesi yüksek bulunmuştur. Bu bulgular ışığında, ilk olarak depresyonda endojen CRH artmakta, adrenal bezler hipertrofiye olmakta ve ACTH'ye kortizol cevabının arttığı düşünülmektedir. Kronik alkolizmde ise hipotalamik veya suprahipotalamik seviyede CRH sekresyon artışı, KBG bağlanmasında bozukluk, kortizolün hepatik metabolizmasında bozulma patofizyolojiden sorumlu mekanizmalar arasında sayılmaktadır (8,9).

EPİDEMİYOLOJİ

Danimarka'da yapılan toplum-bazlı çalışmada 11 yıllık süreçte 166 hastaya Cushing sendromu tanısı konmuştur. 99 hastanın Cushing hastalığı, 48'i adrenal kökenli Cushing sendromunu, 16 hasta ektopik ACTH sendromu ve 3 tanesi ise sınıflandırılmamış olarak bildirilmiştir. Bu yayında insidens yılda 1 milyonda 2 olarak saptanmıştır (10) İspanya'da insidens milyonda 2.5 vaka (18 yılda 49 hasta) olarak bulunmuştur. Bu iki çalışmada standart mortalite oranı 3.8 olarak bulunmuştur. Daha sonra Milwaukee bölgesinde 11 yılda 1,5 milyonluk bir popülasyon incelenmiş ve insidens milyonda 5 vaka olarak bulunmuştur. Yüksek riskli popülasyonlarda yapılan tarama testleri okkült Cushing sendromunun sanıldığından daha fazla olduğunu göstermiştir. Daha sonra yapılan epidemiyolojik çalışmalar Cushing sendromunun hiçde nadir olmadığını göstermiştir. Lebowitz 1996'da kötü kontrollü diyabetes mellitusu olan obezlerde, cerrahi olarak da doğrulanmış Cushing sendromu sıklığını %3.3 olarak bulmuştur (11). Türkiye'de yapılan BKİ> 25 kg/m² olan 100 hastanın incelendiği araştırmada 9 hastaya cerrahi olarak doğrulanmış Cushing sendromu tanısı konmuştur (12). Yine adrenal insidentaloması olanlarda %10'lara kadar ulaşan subklinik hiperkortizolizm oranları bulunmuştur (13). Bütün bu değerler Cushing sendromu tanısının önemini artırmaktadır.

Tedavi edilmediğinde Cushing sendromu mortalitesi 5 yılda %50'lere ulaşabilmektedir (14)

Cushing sendromunun düşünüldüğünden daha sık görüldüğünün anlaşılması ve morbidite ve mortalitesinin de yüksek olduğunun görülmesi tarama endikasyonlarının net olarak ortaya konmasını sağlamıştır. Cushing sendromu her yaşta görülebilir ve başlangıcı sinsi olabilir. Genellikle klinik olarak tanı konmadan önce 3-5 yıl süre geçmiş olmaktadır.

Kadınlarda biraz daha sık görülmektedir, ektopik ACTH sendromunda ise kadın erkek oranı biraz daha eşit görünmektedir. Bu nedenle yüksek riskli grupların taranması önemlidir. Cushing sendromu düşündürecek tipik klinik bulguların ortaya çıkması 12 yıla kadar uzayabilmektedir (15).

CUSHİNG SENDROMUNDA PATOFİZYOLOJİ

Kortizol, hipofiz bezinden salgılanan ACTH'nin kontrolü altında adrenal bezlerin zona fasikülata ve zona retikularis tabakalarından salgılanmaktadır. ACTH ise hipotalamustan salgılanan kortikotropin releasing hormon (CRH) ve vazopressin ile kontrol edilmektedir. Normal kişilerde kortizol sirkadyen bir ritmle salgılanmaktadır. Cushing sendromunda sirkadyen ritm kaybolmaktadır. Cushing sendromu etyoloji açısından ACTH bağımlı ve ACTH'dan bağımsız olarak iki büyük gruba ayrılmaktadır (Tablo-1).

Cushing sendromunda mineralokortikoid hormonların seviyesi yüksekken, renin-anjiyotensin sistem normal bulunmuştur. Cushing sendromuna eşlik eden hipertansiyona neden olan asıl mekanizmanın sodyuma veya anjiyotensin II'e de bağımlı olmadığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Katekolaminlere kalp düzeyinde duyarlılıkta artış, kardiyak debide artış hipertansiyon gelişmesine katkıda bulunan faktörlerden olabilir (16,17). Değişik nedenlere bağlı gelişen Cushing sendromlu hastalarda yapılan bir araştırma ise renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin etkili olmadığını göstermiştir (18).

Hastaların yaklaşık %80-85'ini ACTH-bağımlı form olan hipofizer Cushing hastalığı oluşturmaktadır. Bunun da %80'ini hipofizer tümörler, kalan %20'sini ise ektopik ACTH sendromlarına yol açan tümörler oluşturmaktadır. Başta akciğerin karsinoid tümörü ve küçük hücreli akciğer karsinomu olmak üzere, pek çok tümör ektopik ACTH kaynağı olabilmektedir. ACTH bağımlı olmayan Cushing sendromu tüm vakaların %15-20'sini oluşturmaktadır; büyük çoğunlukla adrenal tümöre bağlı olarak, daha nadiren de makronodüler hiperplazi, primer pigmente nodüler adrenal hastalık (izole veya Carney kompleksinin bir parçası) nedeniyle olmaktadır.

Tablo 1. Cushing sendromunda etyoloji

ACTH-bağımlı
<ul style="list-style-type: none">• Hipofizer (Cushing hastalığı)• Ektopik ACTH sendromu• Ektopik CRH sendromu• Kronik ACTH kullanımı
ACTH-bağımsız
<ul style="list-style-type: none">• Adrenal adenom• Adrenal karsinom• Makronodular adrenal hiperplazi (kısmen ACTH bağımlı)• Pigmente mikronodular adrenal hiperplazi (sporadik veya Carney kompleksin bir parçası olarak)• Anormal hormon reseptör ekspresyonu veya fonksiyonuna bağlı adrenal hiperplazi (AIMAH) (gastrik inhibitör polipeptid, vazopressin, β-adrenerjik reseptörler aracılığıyla)• McCune- Albright sendromu• Glukokortikoid kullanımı

ACTH, adrenal korteksin her üç tabakasını da uyararak steroid üretimini artırır. Sürekli uyarın altında kalan adrenal bez büyümeye başlar. Bu durum histolojik boyutta büyüme ve hiperplazi olarak saptanır. Mikro ve makro nodüller(>1 cm) görülebilir. ACTH bağımsız olan formlarda ise daha çok adrenal aktivitede artış görülmektedir. Adrenal adenomalar sadece glukokortikoid salgılayan zona fasikülata hücrelerinden oluşmaktadır. Hiperkortizolizme bağlı olarak ACTH supresedir, buna bağlı olarak adenom dışı doku atrofiye uğrar.

Hipofizer Cushing hastalığının hemen hemen tamamının nedeni soliter kortikotrop adenomlardır Bu tümörlerin büyük kısmı intrasellar mikroadenomalar (<1cm), %10'unu ise makroadenomalar oluşturmaktadır. Bu tümörlerin, klonal çoğalma ya da artmış hormonal stimülasyon veya anormal feed-back mekanizmalara bağlı olarak meydana gelen hiperplaziye bağlı olduğu düşünülmektedir. Anormal uyarının devamı hücrelerde mutasyonlara ve klonal

ekspansiyona neden olabilmektedir. Bilinen onkogenler ve tümör süpressör genlerin kortikotropinomalarda patogeneizde önemli rol almadıkları düşünülmektedir. Hayvansal deneyler siklin- bağımlı kinaz inhibitör p27(Kip1)'in kortikotrop tümör gelişiminde rol aldığını düşündürmektedir. Sitogenetik çalışmalar selim hipofiz adenomlarında, 6p kazanılması, kromozom 2,15q ve 22 kaybı gibi çok sayıda kromozomal değişikliğin olduğunu göstermektedir. Ancak bunlar halen çok küçük çalışmalar şeklindedir (19). %2'den daha az oranda CRH salgılayan adenomalar olabileceği bildirilmiştir.

Adrenal nedenli Cushing sendromunun patofizyolojisinde tek bir açıklama mümkün değildir. Adrenal kanserlerde IGF-2'de artmış ekspresyon, CDKN1C'nin (G1 siklin bağımlı kinaz inhibitörde) ve H19'un (büyüme süpressör) azalmış ekspresyonu ile beraber, paternal 11p15.5 isodisomy varlığı önemli rol oynuyor görünmektedir. P53 mutasyonu kısmen etkili olabilir. Adenoma ve karsinoma monoklonal, nodüler hiperplazi ise sıklıkla poliklonal olma eğilimindedir (20). Primer pigmente nodüler adrenal hastalıkta (PPNAD), kromozom 2p16 ve 17q22-24 üzerindeki genlerin sorumlu olduğu bildirilmektedir. Son dönemde sporadik ve ailevi Carney kompleksi bulunan hastaların yarısında 17q22-24 lokusunda bulunan, tip 1a proteinkinaz A düzenleyici geni kodlayan, PRKAR1A tümör süpressör gen mutasyonu gösterilmiştir (21). McCune-Albright sendromunda ise, bilateral nodüler hiperplaziden G proteinin α -subunitinde kodon 201'de aktive edici mutasyon sorumlu tutulmaktadır. Bu mutasyon erken embriyogeneizde mozaik paternde gelişmektedir. Mutasyonla beraber siklik adenozin monofosfat stimülasyonu oluşur, steroidogenik yolda aktivasyon gelişir ve sonuç olarak nodül oluşumu ve glukokortikoid artışı olmaktadır. Mutasyonun bulunmadığı internodüler adrenal kortekste atrofi gelişir (21).

AIMAH Cushing sendromunun nadir nedenlerindedir (<%1), bilateral makronodüler adrenal hiperplaziye bağlı gelişmektedir. Çoğunlukla sporadik olup nadiren ailevi vakalar bildirilmiştir. Nedeni bilinmemekle beraber, bazı nodüllerde adrenal bezlerde normalde bulunan veya ektopik reseptör ekspresyonunda artış olduğu saptanmıştır. Bu sendromun en iyi bilinen örneği gıda-bağımlı Cushing sendromudur (22,23). GIP'te postprandiyal artışın Cushing sendromundan sorumlu olduğu, sabah açlık kortizolü düşük veya normalken yemek sonrası kortizolde dramatik artış meydana geldiği bildirilmiştir. ACTH ise düşük seviyelerde saptanmıştır. GIP reseptörlerinin ektopik ekspresyonu bu tabloda sorumlu tutulmaktadır. Ayrıca vazopressin ve β -reseptör ekspresyonlarında artışa bağlı sendromlar da bildirilmiştir (24).

CUSHING SENDROMUNDA KLİNİK ÖZELLİKLER

Hiperkortizolemi ile ilişkili klinik bulgular, hiperkortizoleminin ciddiyeti ve derecesi, hastanın yaşı ve hastalığın süresi ile ilgili olabilmektedir. Hiperkortizolemi çok geniş sistemik etkiye sahiptir. Tüm bulgularıyla yerleşmiş bir Cushing sendromunun tanısını koymak kolay olabilir. Ancak bazı durumlarda hastanın zaman içindeki değişimini saptamak için fotoğraflarla değerlendirmek yararlı olabilir.

Trunkal obezite, ekimoz, pletore, proksimal kas güçsüzlüğü, osteopeni ve hipertansiyon Cushing sendromu için en tanımlayıcı bulgular olmakla beraber, en güvenilir olanları ekimoz ve proksimal kas güçsüzlüğü olarak bildirilmiştir (25). Kadın ve erkeklerde yağ dağılımında değişme görülür. Visseral kompartmanlarda, yüz ve boyunda subkutan dokuda yağ doku artışı görülmektedir. İntra-abdominal yağ doku artışı trunkal obeziteye yol açar. Aydede yüzü ve dorso-servikal bölgede yağ birikmesine bağlı “buffalo-hörgücü” Cushing sendromunun tipik görüntüsüne neden olmaktadır. Ayrıca supraklaviküler bölgede ve temporal bölgede doluluk gelişmektedir. Cilt bulguları sık görülen bulgulardandır. Çapı > 1cm olan mor strialar, çoğu araştırmacı tarafından Cushing sendromu için patognomonik kabul edilmekte ve genellikle karın dış bölgelerinde, bacak iç bölgelerinde yer almaktadırlar. Gonadal disfonksiyon hastaların yaklaşık %75’inde görülebilmektedir. Çocuklarda gelişme geriliği önemli bulgulardandır.

Hızlı başlamış kas güçsüzlüğü, hiperpigmentasyon, tipik cushingoid bulgularla beraber ektopik ACTH sendromunu düşündürebilirken, ciddi hirsutizm ve virilizasyon ise adrenal karsinomayı akla getirmelidir (26,27).

ACTH bağımlı Cushing sendromunun muhtemelen bir kısmı siklik veya intermittan olabilmektedir. Klinik tablonun silik olduğu dönemlerde Cushing sendromu için yapılan testler normal bulunduğundan testler aralıklarla tekrarlanmalıdır (15).

Tablo-2: Cushing sendromunda görülen klinik bulgu ve belirtilerin sıklığı değişik çalışmalarda şu şekilde verilmiştir; (DE Groot, Vol 1 s: 433)

Belirti ve bulgular	Plotz ve ark (n=33)	Sprague ve ark (n=100)	Soffer ve ark (n=50)	Urbanic ve George (n=31)	Ross ve Lynch (n=70)	Pecori Giraldi ve ark (n=280)
Obezite veya kilo artışı	97	84	86	79	97	85/86
Hipertansiyon	84	90	88	77	74	68/67
Güçsüzlük/kas atrofisi	83		58	90	56	64/46
pletore	89	81	78		94	
Yüzde yuvarlaklaşma	89	92	92		88	
Stria	60	64	50	51	56	72/51
İnce deri				84		
Ekimoz	60	62	68	77	62	21/32
Hirsutizm	73	74	84	64	81	
Akne	82	64		35	21	19/28
Kadında saç dökülmesi			51		13	
Dorsoservikal yağ yastığı		67	34		54	51/54
Ödem	60		66	48	50	
Menstruel bozukluk	86	35	72	69	84	
Libidoda azalma	86		100/33	55	100/47	
Baş ağrısı	58			39	43	
Sırt ağrısı	83			39	43	
Psikiyatrik bozukluk	67		40	48	62	26/34
Tekrarlayan enfeksiyonlar		14		25		
Yara iyileşmesinde bozulma ve ciddi enfeksiyon	42					
Karın ağrısı					21	
Böbrek taşı					15	21/6
Osteoporoz/kırık	83		56	48	50	47/32
Bozulmuş glukoz toleransı	94		84	39	50	43/45

Spesifik belirti ve bulgular dışında nonspesifik belirti ve bulgular da görülmektedir. Psikolojik ve kognitif değişimler, depresyon, nöropsikiyatrik problemler (mani, anksiyete, ve kognitif disfonksiyon, uykusuzluk vb), psikozlar intihar eğiliminde artış görülebilmektedir. Posterior subkapsüler katarakt, egzoftalmi, Lisch nodülleri, santral koryoretinopati de görülebilecek nadir bulgulardandır (28,29,30). Cushing sendromundaki yüksek morbidite ve mortaliteden genellikle metabolik bozuklukların yol açtığı kardiyovasküler komplikasyonlar sorumludur. Hiperkortizoleminin yol açtığı insülin direnci, periferik dokularda glukoz kullanımını azaltmakta, bozulmuş glukoz toleransı %30-60, aşikar diyabet ise %25- 50'e varan oranlarda rastlanmaktadır (31,32) Abdominal obezite ve visseral yağ dokusunda artış görülmektedir. Arteryel hipertansiyon Cushing sendromlu hastaların yaklaşık %80'inde bulunur. Hipertansiyon kardiyovasküler morbiditede önemli faktörlerdendir. Hipertansiyon hafif bile olsa organ hasarı gelişebilmektedir. Ciddi hiperkortizolizm durumunda kortizolün böbrekte 11 β -hidroksisteroid dehidrogenaz Tip 2 ile inaktif kortizona dönüşmesinde sorun olmaktadır. Hipertansiyon gelişiminde etkili faktörlerden biri de muhtemel kortizolün mineralokortikoid aktivitesidir. Vasoaktif maddelerin inotropik etkileri, katekolaminler, vasopressin, ve anjiyotensin II ve muhtemel vasodilatör mekanizmalarda supresyon (nitrik oksid ve prostasiklin üretimi gibi) etkili faktörlerdendir. Hiperlipidemi, hiperkoagülabilitate de artmış morbidite ve mortaliteye katkıda bulunabilmektedir. Cushing sendromunda nefrolityazisin arttığı da bildirilmiştir. Aktif Cushing sendromlu hastaların %50'sinde, remisyondakilerin ise %6,5 'unda taş saptanmıştır. Üriner sistemde hiperkalsiüri, hipositratüri ve hiperürikozüri saptanmıştır (33). Aksiyel iskelet sisteminde düşük kemik yoğunluğu ve kırıklar görülebilir. Bu etkiler Cushing sendromu düzeldiğinde geri dönüşümlüdür. Bir araştırmada cushing sendromlu hastalarda osteoporoz prevalansı %54.8, atravmatik kırık prevalansı ise %21.4 olarak bulunmuştur. Aynı hasta grubunda adrenal kaynaklı Cushing sendromunda hipofiz kaynaklı Cushing sendromuna göre daha yüksek osteoporoz (%69.9'a %37.8) ve atravmatik kırık (%26.1'e 15.8) prevalansı saptanmıştır (34). Benzer bulgulara sahip başka bir çalışmada, 26 Cushing hastalığı, 12 Cushing sendromu ve 38 sağlıklı hasta incelenmiş, en düşük lomber dansitometri değerleri adrenal kaynaklı Cushing sendromunda saptanmıştır. Femurda Cushing sendromlu hastalarda sağlıklı gruba göre daha düşük değerler saptanmış ancak adrenal ve hipofizer kaynaklı Cushing sendromlu hastalar arasında fark saptanamamıştır (35).

Kemik üzerine anabolik etkili olan DHEA-S her iki çalışmada da adrenal kaynaklı Cushing sendromunda daha düşük bulunmuştur. Düşük kemik yoğunluğundan sorumlu olabilecek etkenlerden biri olarak değerlendirilmiştir (35).

Cushing sendromunda nonspesifik laboratuvar testleri: TSH değerleri genellikle subnormal düzeylerde olup, remisyonunda yükselir. Yüksek normal hemoglobin, hematokrit, ve eritrosit sayıları görülebilir. Lökositöz ve eozinofil sayılarında azalma ve hipokalemi görülebilir.

Amerika Klinik Endokrinologlar birliğinin Cushing Sendrom kılavuzunda Cushing sendromu düşündüren belirti ve bulgular aşağıdaki tabloda görüldüğü gibi özetlenmiştir (36);

Tablo-3: Cushing sendromunda klinik özellikler ve iç içe geçen durumlar (a)

Semptom	Bulgu	İç içe geçen durumlar
<i>Cushing sendromunu en iyi tanımlayan ancak genelde yüksek sensitivitesi olmayanlar</i>		
	Kolay morarma	
	Yüzde pletore	
	Proksimal myopati veya proksimal kas güçsüzlüğü	
	Stria (özellikle mor ve > 1cm olanlar)	
	Gelişme geriliği olan ve kilo alan çocuklar	
<i>Toplumda yaygın görülen ve /veya daha az tanımlayan</i>		
Depresyon	Buffalo hörgücü	Hipertansiyon (b)
Yorgunluk	Yüzde dolgunluk	İnsidental adrenal kitle
Kilo artışı	Obezite	Vertebral osteoporoz (b)
Sırt ağrısı	Supraklaviküler dolgunluk	Polikistik over sendromu
İştahta değişme	İnce deri (b)	Tip 2 diabetes Mellitus (b)
Konsantrasyonda azalma	Periferik ödem	Hipokalemi
Libidoda azalma	Akne	Böbrek taşları
Hafızada bozulma (özellikle yakın dönem)	Hirsutizm veya kadında saç dökülmesi	Olağan olmayan infeksiyonlar
Insomnia	Deri iyileşmesinde gecikme	
İrritabilite		
Menstruel anormallikler		
Çocuklarda gelişmede yavaşlama	Çocuklarda anormal genital virilizasyon	
	Çocuklarda kısa boy, gecikmiş puberte veya prekoks puberte	

(a) Olağan koşullarda görülen bulgular

(b) Daha genç yaşta görüldüğünde Cushing sendrom olasılığı artar

CUSHİNG SENDROMU AÇISINDAN TARAMA YAPILMASI ÖNERİLEN DURUMLAR

Tanı konulmadığında mortalitesinin yüksek olması, klinik belirti ve bulgularının Cushing sendromu olmadan pek çok klinik durumla beraber bulunması, tarama yapılması gereken grupların iyi belirlenmesini gerektirmektedir. Bu konuda pek çok grubun önerileri mevcuttur. Örneğin James Findling ve arkadaşlarının tarama yapılmasını önerdikleri gruplar Tablo-4 te gösterilmiştir.

Tablo-4: Cushing sendromu açısından tarama yapılması önerilen durumlar (37).

Belirti ve bulgular	Santral obezitesi ve aşağıdaki bulguları olanlar Yüzde yuvarlaklaşma ve pletore Supraklaviküler ve dorsoservikal yağ yastığında artış Kolay yaralanma, ekimozlar Geniş, morumsu striaları olanlar (1 cm'den büyük) Proksimal myopati Lanugo kıllarında artış Yüzeyel mantar infeksiyonlarında artış Çocuklarda gelişme geriliği
Klinik Tanı Metabolik Sendrom X	Diyabetes Mellitus (Hb A1c > %8) Hipertansiyon Hiperlipidemi Polikistik over sendromu
Hipogonadotropik Hipogonadizm	Oligomenore /amenore/infertilite Libido kaybı ve impotans
Osteoporoz (Kosta, vertebra kırığı)	< 65 yaş altı
Adrenal insidentaloma	

Amerika Endokrinologlar Birliği'nin 2008 yılında yayınladığı Cushing sendromu kılavuzunda tarama yapılması gereken gruplar şu şekilde sıralanmıştır;

1. Yaş grubuna göre beklenmeyen bulguları olan hastalar (osteoporoz, hipertansiyon gibi)
2. Cushing sendromunu yüksek olasılıkla dűřündüren çok sayıda ve progresif bulguları olan hastalar (pletore, ekimozlar, trunkal obezite, stria, proksimal myopati, hirsutizm, akne, periferik ödem gibi)
3. Boy gelişme persantili azalırken kilosu artan çocuklar
4. Adrenal insidentaloması saptanan hastalar

HİPOTALAMUS-HİPOFİZER- ADRENAL AKS REGÜLASYONU VE TESTLER

Tablo-5: Serum kortizol değerlerinin gün içindeki normal dağılımı

	Referans değerleri(ng/ml)
Uyanma Zamanı	1.4-8.9
En yüksek değer (uyandıktan 90 dk sonra)	5-17.7
Kortizolün en yüksek değerinden sonraki	1.0-2.8
3.5-4.5 saat sonra	
Kortizolün en yüksek değerinden sonraki	0.5-3.1
7.5-8.5 saat sonra	
Addison	<0.4

HPA aksın değerlendirilmesinde statik testlerden çok dinamik testlerin kullanımı yararlıdır. Kortizol veya ACTH salgısında artışı dűřünüldüğünde deksametazon ile supresyon yapılması önerilmektedir. Kortizol adrenal bezden ACTH kontrolünde pulsatil olarak salınan bir hormondur. ACTH hipotalamustan salınan CRH kontrolü altındadır. Kortizol sekresyonu diürnal ritme sahiptir, pik değerine sabah 08'de, en alt düzeyine ise gece 22'de ulaşır. 24 saatte 8-10 tane salınımsal zirvesi vardır. CRH'nin kan düzeyi ölçümleri henüz güvenilir değildir. Kortizol ölçümü kortizol bağlayıcı globulin etkilenmektedir. KBG, östrojenler, akut hepatit gibi pek çok faktörden etkilenerek ölçümlere etki etmektedir. KBG

artışı yalancı kortizol artışlarına yol açmaktadır. Bu nedenle 24 saatlik idrar serbest kortizol ölçümleri veya serbest fraksiyon ölçümüne dayalı testler önerilmektedir. CRH ölçümü teorik olarak ektoptik CRH sendromu ayırıcı tanısında yararlı gibi görünse de dakikalarla ölçülen kısa yarı ömrü ve hızlı proteolitik yıkımına bağlı kararsız serum seviyeleri nedeniyle henüz pratik görünmemektedir.

Laboratuvar testi olarak kullanılan ölçümler:

1. Kortizol: Rastlantısal tek ölçümler HPA aksının yetersizliğinde yol gösterici olabilir. Kortizol $> 16 \mu\text{g/dl}$ ise yetersizlik olasılığı dışlanabilir. Ancak kortizol artışı düşünülüyorsa rastlantısal kortizol ölçümü $< 5 \mu\text{g/dl}$ ise Cushing sendromu olasılığı dışlanabilir. Tersine $>50 \mu\text{g/dl}$ bulunan serum kortizol değeri kesin tanı koydurmasa da hiperkortizolizm düşündürülebilir. Geceyarısı serum kortizol değerinin $7.5 \mu\text{g/dl}$ (206 nmol/L)’den yüksek olması Cushing sendromu ayırıcı tanısında %96 sensitivite ve %100 spesifisiteye sahiptir (38). Ancak hastane koşullarında istirahat halindeki kişilerde, 1 saat önce kateter konularak, dinlenir vaziyette kan alınması gerekmektedir.
2. Sık kortizol tayini: 24 saat süreyle her 20-30 dakikada bir yapılan serum kortizol tayini ancak araştırma amaçlı kullanılabilir. Diürnal varyasyonun kaybı Cushing hastalığı tanısında yararlı olabilir (39)
3. Tükürük kortizol tayini: Non invaziv ve yeni bir tanı yöntemi olarak tükürük kortizolü KBG’den etkilenmeyen güvenli bir tanı yöntemi olarak görünmektedir.
4. İdrar kortizol tayini: 24 saatlik idrarda serbest kortizol tayini Cushing sendromu tanısında kullanılan testlerden biridir. Mükemmel olmasa da kortizol artışı durumlarının tayininde etkili bir test gibi görünmektedir. Serbest kortizol filtre edilir ve reabsorbe olmaz ya da böbrekte metabolize olmaz. 24 saat süreyle devam eden kortizol sekresyonunun büyük bölümü sabah 4 ile akşam 16 arasında olmaktadır. İdrar kortizol tayininde idrar örneğinin doğru olarak en az üç veya dört kez toplanması (2, 40) ve idrar kreatinin ölçümü ile doğrulanması uygun bir yaklaşım yöntemidir (serbest kortizol/kreatinin oranı 1.0-1.5;medyan 1.3). Glomerüler filtrasyon hızı $< 30 \text{ mL/dak}$ olduğunda idrar serbest kortizol düzeylerinde yanlış normallik saptanabilmektedir (41). İdrar kortizol ölçümünde farklı ölçüm yöntemleri kullanıldığından değişik laboratuvarlardan farklı sonuçlar alınabilmektedir. Bu durum sensitivite ve spesifisiteyi düşürdüğünden daha duyarlı yöntemler geliştirilmeye çalışılmıştır. İdrar kortizol ölçümünde “high-performance liquid chromatography –HPLC” yöntemi altın standart olarak kabul görmüştür. Ancak karbamazepin ve fenofibrat gibi ilaçlar bu yöntemle de

etkileşebilmektedir. İdrar kortizol tayininin sensitivite ve spesifitesini araştıran pek çok çalışma mevcuttur. Sensitivite %45-71 arasında bulunmuş, spesifite ise %100 bile bulunmuştur (42,43,44,45). İdrar serbest kortizol değeri normal referans aralığının dört katından yüksekse kuvvetle Cushing sendromu tanısı koydurur. Hafif yükseklikler ise kronik anksiyete, depresyon, alkolizm gibi pseudo-Cushing olarak tanımlanan durumlarda ve gebelikte saptanabilmektedir. Normal değerler kullanılan yöntemle göre değişebilmektedir. Örneğin RIA ile normal değer < 80-120 µg/24 saat veya < 220-330 nmol/24 saat, HPLC ile ise <50 µg/24 saat veya <138 nmol/24 saat olarak bildirilmektedir (46).

5. ACTH: KBG'den etkilenmez, ısıya karşı labildir, buz içerisinde toplanmazsa proteolize uğrayarak plazma değeri azalır. Kortizol serumda ölçülürken ACTH plazmada ölçülür. Tükürükte ACTH ölçümü bildirilmemiştir, sık ACTH ölçümü hiperkortizolizm değerlendirilmesinde yararlı olabilir. ACTH'den bağımsız Cushing sendromu tanısında sabah ACTH düzeyinin duyarlı bir yöntemle bakıldığında ölçülemeyecek seviyede bulunması değerlidir. Ancak hafif veya okkült hastalık varlığında ACTH halen ölçülebilir düzeydedir.
6. Deksametazon/CRH testi: Deksametazon supresyonu sonrası CRH kullanıldığında Cushing sendromunun tanısında etyolojisinde sensitivite ve spesifitesinin arttığını gösteren pek çok çalışma vardır. Plazma kortizol değerinin CRH injeksiyonundan 15 dakika sonra 1.4 µg/dl'den yüksek ölçülmesi Cushing sendromunu psödoCushing durumlarından ayırmada %85'in üzerinde sensitivite ve spesifiteye sahip bulunmuştur (47).
7. Geceyarısı plazma kortizol ölçümü: Normal sirkadyen ritm nedeniyle sabah 06-08 arasında en yüksek, uykunun ilk yarısında gece en alt düzeye iner. Cushing sendromunda normal sirkadyen ritm bozulur ve geceyarısı plazma kortizolü yükselir. En erken ve en sensitif belirteç olabileceği yönünde çalışmalar mevcuttur.
8. Diurnal ritm tayini: Geç gece ya da geceyarısı kortizol ölçümü oldukça sensitif ve spesifik tarama testi olarak kabul edilmektedir. Geceyarısı kortizolü >7.5 µg/dl ve uyku kortizolü >1.6 µg/dl olması Cushing sendromu lehinedir. Sabah kortizolü Cushing sendromu olgularında normal olabilir ancak gece kortizolü artmıştır. Bu testin kullanılabilmesi için hastanın hazırlığı önemlidir. 48 saat önce hastanın hastaneye yatırılması önerilmektedir. Uykuda alınan geceyarısı plazma kortizolünün <1.8 µg/dl olması Cushing sendromu tanısını dışlar, uyanıklıkta ölçülen plazma geceyarısı

kortizolünün $>7.5 \mu\text{g/dl}$ olması ile %97 sensitiviteyle Cushing-psödoCushing ayırıcı tanısını yapabilir (46).

9. Cushing sendromunda nonspesifik laboratuvar testleri: TSH değerleri genellikle subnormal düzeylerde olup, remisyonda yükselir. Yüksek normal hemoglobin, hematokrit, ve eritrosit sayıları görülebilir. Lökositöz ve eozinofil sayılarında azalma ve hipokalemi görülebilir.

Psödo-Cushing sendromlarında tarama testlerinde sık görülebilen değişiklikler:

- 24 saatlik idrarda serbest kortizol düzeyi hafif yüksek olabilir.
- Normal kişilerde, obezite, majör depresyon, alkolizm veya psikiyatrik bozukluklarda 1 mg deksametazon supresyon testinde baskılanma görülmeyebilir
- 2 gün 2 mg deksametazon testinde da tanısal doğruluk %71'e inebilir (47,48).

TÜKÜRÜK KORTİZOL TAYİNİ

Tükürük bezleri kapiller damar ağı ile çevrili, bağ dokusu ile sarılı duktal sistemlerdir. Tükürük sentezi, tükürük bezlerinin üzerinde yerleşmiş olan asiner hücre membranlarının kapiller damarlardan kanı filtre etmesi ile olur. Küçük hidrofilik moleküller membranı, çift katlı lipit alanına yerleşmiş olan protein kanalları sayesinde geçebilirler. Periferik proteinler hormonlar için reseptör görevi gören proteinler şeklinde davranabilirler. Tükürükte steroid hormonların serbest hali bulunabilir. Steroid hormonlar küçük ve lipofilik olduklarından asiner hücre membranlarını kolaylıkla geçebilirler. Tükürük kortizol değerleri uyandıktan 60-90 dakika sonra pik yapar ve salgılanması gün içerisinde salınım gösterir.

Deneyisel verilerden elde edilen veriler

Tablo-6: Tükürük ve plazmada bildirilen normal değerler

	TÜKÜRÜK	PLAZMA
SU	%97-99.5	%90-90.3
Ph	(5.6)6.4-7.4(7.9)	7.4
Albümin (mg/L)	246-344	34000-48000
Kolesterol (mg/dl)	3-15	150-300
Kreatinin (mg/dl)	0.07-0.2	<1.1
Glukoz (mg/dl)	<2	55-115
Protein (g/L)	1.1-1.8 (6.4)	66-87
Kalsiyum(mmol/L)	0.88-2.05	2.2-2.55
Klor (mmol/L)	5-40	96-108
Magnezyum(mmol/L)	0.08-0.56	0.70-1.05
Fosfat (mmol/L)	1.4-13.2	0.87-1.45
Sodyum (mmol/L)	2-21	133-145
Potasyum (mmol/L)	6.4-37	3.3-5.1

*Kadın hastalar yetişkin ve premenopozal değerler olarak verilmiştir

**Saliva Diagnostic IBL verilerinden değişik literatürlerden derlenmiştir

Tablo-7: Değişik hormonlar için tükürük ve plazmada bildirilen normal değerler

ANALİZ		TÜKÜRÜK	PLAZMA
Aldosteron(pmol/L)	♀	29-118	80-790
Androstenedion(pmol/L)	♀	62-482	1400-11900
Androstenedion(pmol/L)	♂	140-630	1200-11000
Kortizol pikte (nmol/L)	♂♀	13.8-48.9	190-690
Kortizol pikinden 8 Saat sonra (nmol/L)	♂♀	1.4-8.6	55-250
Progesteron folikuler faz (pmol/L)	♀	<160	500-3500
Progesteron luteal faz (pmol/L)		200-1600	4900-72000
Testesteron(pmol/L)	♀	10-52	200-2860
Testosteron(Pmol/L)	♂	95-205	9900-27800
Östradiol Foliküler faz Pmol/L	♀	2-18	26-650
Östradiol midsiklus Pmol/L	♀	9-29	180-1420
Östriol pmol/L	40 haftalık gebe	4.5-9.8	330-1596
17-OH-progesteron pmol/L	♂	50-360	150-4900
17-OH-progesteron pmol/L	♀ luteal faz	140-320	600-8800
DHEA (nmol/L)	♀	0.3-1.0	4.5-34.5
DHEA (nmol/L)	♂	0.3-1.7	6.2-43.3
KBG (µg/L)	♀	72±71	42200±5600
KBG(µg/L)	♂	38±18	39700±6300
SHBG (nmol/L)	♂	19±10	15-100
SHBG(nmol/L)	♀	63±60	15-120
Östron (pmol/L)	♀	10-21	92-1294
Östron (pmol/L)	♂	10-21	92-555

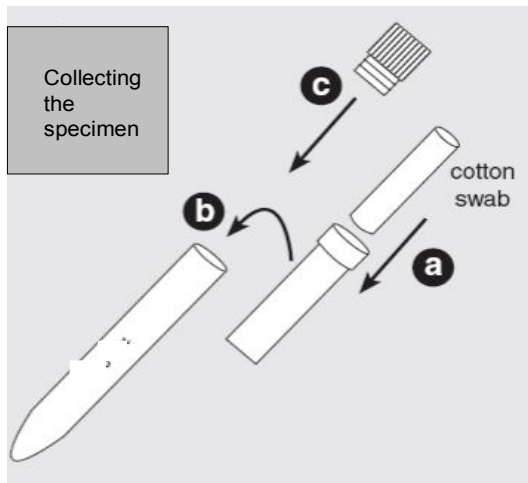
*Kadın hastalar yetişkin ve premenopozal değerler olarak verilmiştir

**Saliva Diagnostic IBL verilerinden değişik literatürlerden derlenmiştir

Hastalar için tükürük kortizol tayini kolay, basit, stres oluşturmeyen, non-invaziv ve serum serbest kortizolü ile korele olan bir yöntemdir. Plazma serbest kortizolü tükürük bezlerinde bulunan asiner hücrelere difüze olur. Tükürükte bağlayıcı globulinler yoktur. Tükürük kortizol düzeyleri tükürük akım hızından etkilenmemektedir. Bu nedenle plazma serbest kortizolü ve tükürük kortizolü arasında çok güçlü bir korelasyon vardır. Tükürük kortizol örnekleri standart buzdolabında veya oda ısısında saklanabilir.

Tükürük Örneklerinin Toplanması

- Kortizol ölçümü dışında örnek toplanması için cam tüpler tercih edilmelidir. Polipropilen yapıdaki tüpler kullanılabilir. Fakat poliester yapıdaki plastik tüpler yanlış düşük sonuçlara neden olacaktır.
- Tükürük materyali dişler fırçalanmadan önce ya da fırçalandıktan yarım saat sonra toplanmalıdır.
- Tükürük toplanmasından hemen önce ağzın suyla çalkalanması tavsiye edilmektedir.
- Tükürük salgısının artışı şekersiz sakız çiğnenmesi ile arttırılabilir.
- Miktarı az da olsa kırmızı renkte tükürük örneği çalışılmamalıdır. Kanla bulaşmış olabilir.
- Steroid ölçümü için toplanan tükürük örnekleri oda sıcaklığında 5 gün, 2-8 derecede 10 gün, -20 derecede uzun zaman saklanabilir.



olay bir yöntem olan geceyarısı tükürük kortizol tayini Cushing sendromu tanısında kullanışlı bir yöntem olarak görülmektedir. Geceyarısı tükürük değeri 5.52 nmol/L (>2 ng/ml)'den büyük olması Cushing sendromu tanısını %100 sensitivite ve %96 spesifisite ile koydurabilmektedir (49). Ancak bu çalışma hastanede yatan hastalarda yapılmış olup ayaktan yapılmış daha büyük çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

DEKSAMETAZON SUPRESYON TESTLERİ

Deksametazon glukokortikoid reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanan potent bir ACTH inhibitörüdür. Ek olarak idrar ve serumda radyoimmünoassay ölçümlerine girmez. Bu nedenle hiperkortizolizm tanısında kullanılmaktadır. Deksametazon düşük ve yüksek dozlarda uygulanarak hiperkortizolizmin tanı ve etyolojisinin saptanmasında yararlı olmaktadır. Ancak bu testlerin hiç biri mükemmel değildir.

TABLO 8: Değişik deksametazon supresyon testleri					
Supresyon Testi	Deksametazon Dozu	Uygulama Zamanı	Normal kortizol cevabı	Sensitivite (%) Spesifisite (%)	
Düşük Doz	1 mg	23:00 x1	<1.8 µg/dl	91-97 / 87-94	
Tek doz	8 mg	23:00 x 1	<50% bazal	92 / 100	
2 gün	2 mg	0.5 mg	Her 6 saatte bir x 2 gün	<1.8 µg/dl	92-100/92-100
8 mg Deksametazon supresyon	2.0 mg	Her 6 saatte bir x 2 gün	<50% bazal	79 / 100	
16 mg Deksametazon supresyon	4 mg	her 6 saatte bir x 2 gün	<50% bazal	74 / 100	

Sitokrom p-450 üzerine etkili barbitürat, aminoglutetimid, fenitoin, rifampin gibi ilaçların kullanımı, östrojen gibi KBG üzerine etkili ilaçların kullanımı testlerin sensitivite ve spesifisitelerini düşürmektedir. Ayrıca kullanılan assaylerle beraber saptanmış olan eşik değerlerde de yıllar içinde değişimler olmuştur. Tek doz 1 mg deksametazon supresyon testinde eşik değerler: 1998 yılında < 5 µg/dl ve < 2.5 µg/dl (50,51), iken 2000'de <3 µg/dl (43) ve 2003'te 1,8 µg/dl (41)'ye kadar düşürülmüştür.

En yaygın kullanılan tarama testi tek doz 1 mg deksametazon supresyon testidir. (çocuklarda 0.3 mg/kg). Bir gece önce saat 23'te 1mg deksametazonun ağız yolu ile verilmesini takiben saat 08'de alınan kan örneğinde serum kortizol düzeyinin ölçülmesi en yaygın uygulama yöntemidir. Endojen ACTH'nin pikinden önce verilen deksametazon ile sabah serum kortizolünün baskılanması esasına dayanır. Sensitivitesi %83-100 arasında değişmektedir. Eşik değer değiştikçe sensitivite de değişmektedir. Normal cevabın < 1,8 µg/dl olması beklenir(41). Bu testte obezite, stres, psikiyatrik hastalıklar ve KBG artışı durumlarında yalancı pozitiflik olurken kronik böbrek yetersizliği, kronik karaciğer yetersizliği, ilaç emilim bozukluğu veya değişmiş ilaç metabolizması durumlarında yalancı negatiflik olabilmektedir. Yaygın kullanılan 1 mg deksametazon supresyon testinde bazı hastaların aşırı hassasiyeti yanlış negatif cevaplara yol açmakta, intermittan hiperkortizolemik vakalarda yine yanlış negatifliklerle karşılaşılabilir (52,41). Deksametazon supresyon testleri ve idrar serbest kortizol tayininde idrarın doğru biriktirilmesi, ilaçların doğru alınması gibi uyum faktörlerinin dışında, sitokrom p-450 aktivitesi, intestinal absorpsiyon bozuklukları, alınan ilaçlar (digoksin, karbamazepin, sentetik steroidler, östrojen preparatları vb) sonuç üzerine etki edebilmektedir.

Yüksek doz DSST'de ise klasik kriter plazma veya idrar serbest kortizolünde >%50 baskılanma olmasıdır. Sensitivite %81, spesifisite %66,7 olarak bildirilmiştir (53) Ektopik Cushing sendromu olgularının en az %20-30'unda plazma ve idrar kortizol düzeyleri %50'den fazla baskılanır(54). Cushing hastalığı olmayan olguların da en az %20-30'unda baskılanma olmayabilir (55).

CRH STİMÜLASYON TESTİ: Deksametazon ile beraber kullanıldığında hiperkortizolizm tanısında ve etyolojinin saptanmasında önemli yeri vardır. CRH'nın pahalı olması (300\$) sorun oluşturabilmektedir, ancak yine de CRH deksametazon testi yapılan çalışmalarda Cushing sendromu tanı ve etyolojisinde maliyet etkin olarak bulunmuştur. Testten 30 dk önce intravenöz yol açılarak -15 dakika, 0, 15 ve 30. dakikada buzlu kaptaki bulunan bir tüpe ACTH için kan alınır. CRH intravenöz olarak 1 µg/kg en fazla 100 µg olacak şekilde enjekte edilir. Günün herhangi bir saatinde yapılabilir ancak sabah saatlerinde yapılması önerilmektedir. Bulantı, metalik tat, idrar yapma hissi, kan basıncında değişim, kalp hızında değişim, baş ağrısı, batında rahatsızlık hissi, flushing, ışıpta huzursuzluk hissi gibi yan etkiler görülebilir ancak genellikle birkaç dakika sürmektedirler. Cushing hastası olanlarda CRH sonrası 15 ve 30 dakikada ACTH konsantrasyonları ortalama bazal değerlere göre (-15 ve 0

dk) %35 artma olmaktadır. CRH stimülasyon testinin sensitivitesinin %100, spesifisitesinin %64 ve tanısal doğruluk oranının %76 olduğunu gösteren çalışma mevcuttur (47).

CRH-DEKSAMETAZON TESTİ: Bazı araştırmacılara göre CRH-Deksametazon testi Cushing sendromu tanısında oldukça yüksek sensitivite ve spesifisiteye sahiptir (% 86 sensitivite ve spesifisite %100) (47). ilk gün öğle 12'de başlanıp, 2 gün süreyle 0.5 mg deksametazon her 6 saatte bir verilir, üçüncü gün sabah 06'da son deksametazon dozu verilip saat 08'de test uygulamaya başlanır. CRH'dan 30 dakika önce intravenöz damar yolu açılıp, -15, 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180 ve 210. dakikalarda kortizol ve ACTH için kan örnekleri alınır. CRH 1 µg/kg maksimum 100 µg olacak şekilde uygulanır. Plazma kortizol değerinin CRH injeksiyonundan 15 dakika sonra 1.4 µg/dl'den büyük ölçülmesi Cushing sendromunu psödoCushing durumlarından ayırmada %86 sensitif ve %100'e yakın spesifik olarak bulunmuştur (55).

CRH-İNFERİOR PETROSAL SAMPLİNG: Deksametazon ve/veya CRH testleri hipofizer Cushing hastalığı gösteriyor ve hipofiz görüntülemesi normal saptanıyorsa IPSS yapılması önerilmektedir. Lateralizasyon için daha az duyarlı olmakla birlikte ACTH kaynağının santral olup olmadığını göstermede yararlıdır (56). Hastaya deneyimli nöroradyologla intravenöz kateter konduktan sonra kan basıncı, nabız ve oksijenizasyon için takip edilir ve femoral venlere kateter yerleştirilir. Floroskopi kılavuzluğu ile inferior petrosal sinüslere kadar ulaşılır. -15, -10,-5, 0 dakikalarda ACTH ve kortizol ölçümleri için kan alınır, CRH (100 µg IV) verildikten sonra 2,5,10,15 ya da 3,5,ve 10. dakikalarda kan örnekleri uygun koşullarda elde edilir. Sabah saatlerinde yapılması önerilmektedir. Hastalar CRH'nin muhtemel yan etkileri açısından takip edilmelidir. Literatürde IPSS sonrası inme gelişen bir vaka bildirilmiştir (57,58). Santral ve periferik ACTH oranlarının bazal ölçümlerde >2 ve CRH sonrası >3 olması Cushing hastalığını düşündürmektedir. CRH ile beraber yapılan IPSS'de tanısal doğruluk %86'dan %90'lara, sensitivite ise %95-99'lara kadar çıkabilmektedir(59,60).

MATERYAL VE METOD

Çalışmaya 78 psödoCushing sendromlu hasta (50 obez, 18 hirsutizmli 10 diyabetes mellituslu), 16 sürrenal kitle, 26 tanısı doğrulanmış Cushing sendromlu olgu (15 Cushing hastalığı, 10 adrenal Cushing sendromu, 1 ektopik ACTH sendromu), 26 kişi kontrol grubu olarak alınmıştır.

Çalışmanın ayrı bir parçası olarak sağlıklı popülasyonun normal geceyarısı tükürük kortizol referans değerlerini belirlemek için sağlıklı grup olarak kabul edilen, herhangi bir şikayeti olmayan ve ilaç kullanmayan rastlantısal seçilmiş 100 kişide geceyarısı tükürük kortizolü bakılmıştır.

Çalışmaya alınan tüm hastaların gönüllü bilgilendirilmiş olur formu alındıktan sonra yakınmaları kaydedilmiş, ayrıntılı fizik muayeneleri yapılmış, Cushing sendromu açısından önemli olabilecek hirsutizm, kilo artışı, stria varlığı, pletore, buffalo-hump varlığı, supraklaviküler dolgunluk olması, temporal yağ yastığının bulunması, akne, aydede yüz, proksimal kas güçsüzlüğü olması, alt ekstremitte ödemi, ekimoz, libido kaybı, depresyon, diyabetes mellitus varlığı, hipertansiyon, androjenik alopesi mevcudiyeti şeklinde toplam 18 bulgu varlığı sorgulanmış, boy-kilo, beden kitle indeksi (BKİ), bel kalça çevreleri, sistolik ve diastolik kan basıncı değerleri kaydedilmiştir. Hastaları istatistiksel olarak üç gruba ayırmak amacıyla, 6'dan küçük bulgusu olanlar düşük klinik skorlu, 6-12 bulgusu olanlar orta klinik skorlu, 12-18 arasında bulgusu olanlar ise yüksek klinik skorlu olarak gruplanmıştır. Hastalar saat 21'den sonra istirahat halinde iken (yemek, içki, fizik aktiviteden sakınılarak) ve öncesinde steroidli pomad veya krem ya da ilaç kullanmamak kaydıyla (östrojen içeren ilaçlar ve steroidli krem kullanımı sonrası 3 hafta beklenilerek) dişler fırçalanmadan sadece çalkalanarak plastik bir pipetten çalışma için verilecek olan plastik tüplere saat 24'te bazal tükürük örneklerini vermişler ve ardından tüm dünyada yerleşik protokole uygun olarak Deksametazon 0.5 mg tabletten iki adet ağız yoluyla alarak, ertesi sabah 08'de aç karna hem serum hem de tükürük örnekleri vermişlerdir. Test öncesinde 24 saatlik idrar örneği sabah uyanınca ilk idrar atılarak toplanmaya başlanmış ertesi sabah aynı saatteki ilk idrar dahil olmak üzere 24 saatlik idrarda serbest kortizol tayini yapılmıştır. Bir mg deksametazon supresyon testinde supresyon saptanmayan hastalarda 2 gün 2 mg deksametazon supresyon testi yapılmıştır. Bu test esnasında da tükürük kortizol ve idrar kortizol örnekleri alınmıştır. Cushing sendromu ayırıcı tanısında yapılan yüksek doz deksametazon supresyon testi sırasında da yine serum, tükürük ve idrar kortizol tayinleri yapılmıştır. Adrenal insidentaloma hastalarında diğer hormon sekresyonları dışlandıktan sonra ek olarak yapılan supresyon

testleri esnasında serum kortizol değerlerine ek olarak tükürük ve idrar kortizol tayinleri de yapılmıştır.

Çalışmaya alınmama kriterleri;

- a) Egzojen steroid alımı: steroidli pomad, krem, tablet ya da ovul kullanmak
- b) KBG’i etkileyebilecek olan ajan kullanmak; HRT, östrojen kullanımı, medroksiprogesteron asetat kullanmak, mitotan, doğum kontrol hapı kullanmak
- c) Sitokrom p 450 üzerine etkili ilaç kullanımı: Rifampin, fluoksetin, itrankanazol, ritonavir
- d) Gebelik
- e) Kortizol klirensini etkileyebilecek ilaç kullanımı: antiepileptikler, fenitoin, fenobarbital
- f) Kronik alkolizm (test öncesi en az 2 hafta alkol alınmaması önerildi) olarak belirlenmiştir.

Tükürük kortizolü Cortisol-LİA 96 test ile, serum kortizolü Cortisol-ELİSA 96 test ile, 24 saatlik idrar kortizolü ise RIA ile ölçülmüştür. Tükürük örnekleri 4 derecede 10 saat, -20 derecede inceleme gerçekleştirilinceye kadar saklanabilmektedir. Çalışmamızda kullanılan laboratuvar yöntemleri ve özellikleri şu şekildedir:

1) İDRAR KORTİZOL DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜLMESİ

İdrar kortizol düzeyleri, “DSL-2100 Active™ Cortizol Coated-Tube Radioimmunoassay” kiti kullanılarak ölçüldü (Diagnostic System Laboratories, Webster, Texas, USA). Bu kit, belirli sayıdaki antikör bağlama bölgeleri için radyoaktif ve radyoaktif olmayan antijenler arasında yarışma oluşturulmasına dayanan klasik bir “radioimmunassay (RIA)” yöntemidir. Kortizol molekülündeki özel bir alana karşı önceden hazırlanmış ve tüp yüzeyine kaplanmış olan belirli sayıdaki antikora (rabbit anti-cortisol immunglobulin) bağlanmak için I-125 ile işaretlenmiş antijenler ve idrar örneklerindeki işaretlenmiş antijenler yarışır. Belirli bir inkübasyon süresinin sonunda bağlanmamış antijenler dökülerek uzaklaştırılır. Tüp yüzeyindeki radyoaktivite bir gama sayacı ile ölçülür. Ölçülen radyoaktivite miktarı örnekte mevcut kortizol miktarı ile ters orantılıdır.

Ayırıcılar:

- 1) 0, 0.5, 2, 4, 10, 20 ve 60 µg/dL kortizol içeren standartlar

- 2) I-125 ile işaretli antijenler
- 3) Anti-kortizol immunglobulin içeren plastik tüpler
- 4) Düşük ve yüksek kortizol içeren kontrol solüsyonları

2)TÜKÜRÜK KORTİZOL DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜLMESİ

Tükürük kortizol düzeyleri, “Cortisol Luminescence Immunoassay (LIA)” kiti kullanılarak ölçülmüştür (IBL Immuno Biological Laboratories, Hamburg, Germany). LIA yöntemi de RIA’daki gibi “yarışma” prensibine dayanır. Tükürükte mevcut olan antijenler (kortizol), enzimle işaretlenmiş olan antijenlerle (işaretli kortizol) plaklara kaplanmış olan sabit sayıdaki antikora bağlanmak üzere birbiriyle yarışır. İnkübasyondan sonra plaklar yıkanarak yarışma reaksiyonu durdurulur. İşaretlemek için kullanılan enzimin (HRP, horse radish peroxidase) lüminesant substratı plaklara eklenir. Oluşan lüminesansın yoğunluğu bir lüminometre (Berthold microtiter plate luminometer) ile ölçülür. Ölçülen lüminesans miktarı örnekte mevcut kortizol miktarı ile ters orantılıdır. Sonuçlar standart eğrisinden direkt olarak saptanır.

Ayırıcılar:

- 1) 0, 0.03, 0.06, 0.20, 0.60, 1.50 ve 4.00 µg/dL kortizol içeren standartlar
- 2) HRP ile konjuge edilmiş kortizol solüsyonu
- 3) Anti-kortizol immunglobulin içeren plaklar (microtiter plate)
- 4) Düşük ve yüksek kortizol içeren kontrol solüsyonları
- 5) Lüminesant substrat içeren solüsyon
- 6) Yıkama solüsyonu

Tükürük kortizolünün

- ng/dl’den nmol/L’e dönüştürülmesi için 0.028 ile çarpılması,
- µg/dl x10: ng/ml,
- µg/dlx27.6: nmol/L
- ng/ml÷10: µg/dl

Plazma kortizolünün ise µg/dl’den nmol/L’e dönüştürülmesi için 27.6 ile çarpılması gereklidir.

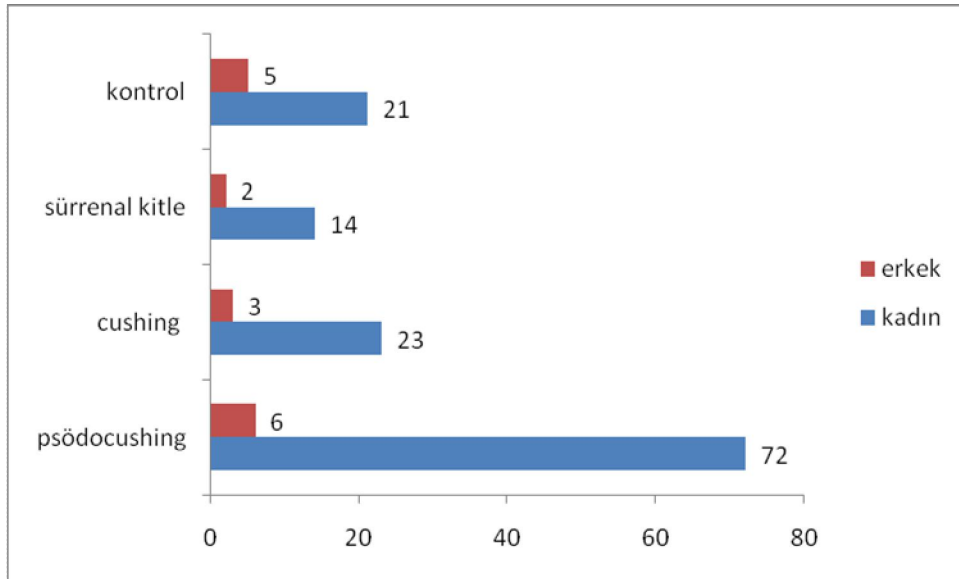
İSTATİSTİK ANALİZLER

Bu çalışmadaki analizler SPSS 12.0 ve 13.0 paket programı yardımıyla elde edilmiştir. İstatistik analizler iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşama, grupların farklılığının sınanmasına yönelik gerçekleştirilmiş, ikinci aşama ise, model kavramı içinde ele alınarak ilişkiler belirlenmeye çalışılmıştır. Grup sayıları bazı aşamalarda $n < 30$ durumunu sağladığı için non-parametrik yöntemler tercih edilmiştir. Ayrıca, $n > 30$ olan bazı grupların Jarque- Bera normallik testi sonuçları normal dağılımın sağlanmadığını ortaya koymuştur. Sağlıklı ve hasta gruplarının farklılığının sınanması amacıyla Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Bu aşamanın ardından duyarlılık ve belirlilik değerleri bulunarak yorumlanmıştır. Grupların farklılığının belirlenmesinde ayrıca ROC eğrileri kullanılarak ayırimsama düzeyleri ve istatistik anlamlılıkları değerlendirilmiştir. Klinik skorlarına göre üç gruba ayrıla hastalarda geceyarısı tükürük kortizölü ve diğer değişkenlerin gruplar arasındaki ilişkisi one-way ANOVA testi ile belirlenmiştir.

BULGULAR

Çalışmaya 26 (23 kadın, 3 erkek) Cushing sendromlu hasta, 78 (72 kadın, 6 erkek) psödo-Cushing sendromlu hasta, 16 sürrenal kitleli hasta (2 erkek, 14 kadın), 26 (21 kadın, 5 erkek) kontrol grubu hastası dahil edilmiştir (Grafik-1). Bu gruplardan Cushing sendromlu hastaların yaş ortalamaları $40,23 \pm 12,96$ ve BKİ (kg/m^2) $28,71 \pm 5,57$ iken, psödo-Cushing sendromlu hastaların yaş ortalaması $32,88 \pm 13,96$, BKİ $33,75 \pm 9,05$, sürrenal kitle hastalarının yaş ortalaması $51,11 \pm 14,34$ ve BKİ $27,77 \pm 8,87$, kontrol grubunun yaş ortalaması $43,38 \pm 8,38$ ve BKİ ise $25,23 \pm 3,11$ olarak bulunmuştur. Hastalardan uygun koşullarda geceyarısı tükürük örnekleri ve 24 saatlik idrar örnekleri ve kan örnekleri alınmıştır. Prospektif olarak toplanan örnekler çalışıldığında, yeterli miktarda örnek toplayamama, kontaminasyon, uyum problemi gibi nedenlerle Cushing sendromlu 12 hastanın, Psödo-Cushing sendromlu 8 vakanın, sürrenal kitle grubundan 4 vakanın, kontrol grubundan 3 vakanın geceyarısı tükürük kortizol örneği çalışılamamıştır. 24 saatlik idrar serbest kortizol örneklerinde ise Cushing sendromlu vakaların 16'sı, psödo-Cushing sendromlu vakaların 37'si, kontrol grubunun ise 7'sinin uygun koşulda ve uygun miktarda örnek toplayamadığı ya da toplamadığı belirlenmiştir ve değerlendirmeye alınmamıştır.

Grafik 1: Hasta Gruplarının Cinsiyet Dağılımı



Tablo9: Cushing Sendromlu Hastaların Dağılımı

Cushing sendromu	Cushing hastalığı	Adrenal Cushing	Ektopik ACTH
Kadın (n)	13	9	0
Erkek (n)	2	1	1
Kadın yaş ort (yıl)	40.07±11.73	46.46±15.5	
Erkek yaş ort (yıl)	26±12.72	42	24

Grafik 2: Hasta gruplarında ortalama BKİ değerleri



Çalışmaya alınan psödo-cushing'li obez hastaların 45'i kadın, 5'i erkekti. Kadın obez hastaların yaş ortalaması 34.9±13.3 iken erkek obez hastaların yaş ortalaması 19.8±3.56 olarak bulunmuştur. Obeziteye Tip 2 diyabetes mellitus eşlik eden 5 kadın hasta, hiperlipidemi eşlik eden 17 kadın hasta, depresyon eşlik eden 5 erkek hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Hirsutizmli 18 kadın hasta, 6 tedavi altında psikiyatri tarafından klinik olarak stabil kabul edilmiş depresyon vakası, 7 kadın Tip 2 diyabetes mellitus vakası, 24 statin tedavisi almakta olan hiperlipidemi vakası çalışmaya alınmıştır.

Ayrıca sağlıklı popülasyonun normal geceyarısı tükürük kortizol değerlerini belirleyebilmek amacıyla bakılan rastlantısal olarak seçilmiş sağlıklı 100 vakada LIA ile bakılan geceyarısı tükürük kortizolünün normal değeri $0,21 \pm 0,03$ $\mu\text{g/dl}$ olarak bulunmuştur (CI %95, 0,16-0,268).

Tablo 10: Hasta Gruplarının Ortalama Değerleri ve Güven Aralıkları

	Kontrol (grup 0) (n:26)	Non-fonksiyone sürrenal kitle (grup1) (n:12)	Cushing send (grup2) (n:18)	Obezite (grup 3) (n:37)	Hirsutizm (grup 4) (n:16)
Geceyarısı tükürük kortizolü CI	0,28±0,09 (0,219-0,34)	0,29±0,09 (0,225-0,35)	1,02±0,28 (0,95-1,08)	0,09±0,02 (0,032-0,14)	0,15±0,04 (0,087-0,21)
1 mg sonrası sabah tükürük kortizolü	0,084±0,015 (0,052- 0,116)	0,15±0,06 (0,08-0,21)	0,84±0,5 (0,77-0,90)	0,07±0,01 (0,012-0,12)	0,04±0,01 (0-0,10)
İdrar serbest kortizol	50,94±21,01 (50,879- 51,0)	91,37±56,7 (91,3-91,43)	181,08±52,6 (181,01- 181,14)	20,27±4,5 (20,21-20,32)	27,85±8,27 (27,78-27,91)
Bazal kortizol	13,2±0,6 (13,13- 13,26)	15,1±1,5 (15,03-15,16)	22,9±2,16 (22,83-22,96)	15,4±1,08 (15,34-15,45)	19,4±1,7 (19,33-19,46)
1mg sonrası kan kortizol	0,82± 0,23 (0,75-0,88)	1±0,71 (0,93-1,065)	10,42± 8,39 (12,37-12,58)	1,15±3,13 (1,092-1,20)	0,75±0,26 (0,68-0,81)

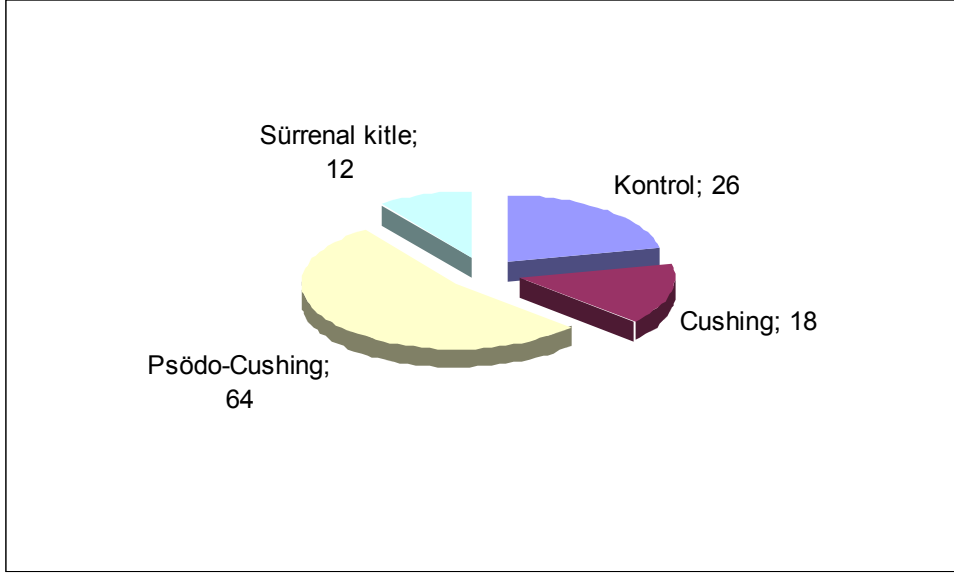
* %95 ihtimalle güven aralığı alt ve üst sınır değerleri

Hasta gruplarından Cushing sendromlu hastalarda 24 saatlik idrarda serbest kortizol düzeyleri, bazal kortizol düzeyleri ve 1 mg DST sonrası kan kortizol düzeyleri diğer gruplardan daha

yüksektir. Bu durum Cushing sendromunda mevcut hiperkortizolemiyle uyumludur. Diğer hasta gruplarındaki değerler literatürde belirtilen normal referans değerleri ile uyumludur.

Hastalar dört gruba ayrıldığında geceyarısı tükürük kortizolü ve 1 mg sonrası sabah tükürük kortizolü ölçülebilen hastaların sayıları ve Grafik 5’te verilmiştir.

Grafik 3: Çalışmaya alınan hasta gruplarında geceyarısı ve 1mg DST sonrası tükürük kortizolü bakılan hasta dağılımı



Çalışmada 18 Cushing sendromlu, 64 psödo-Cushing sendromlu, 12 sürrenal kitle, 26 kontrol hastasında geceyarısı ve 1 mg DST sonrası tükürük kortizolü değerleri ölçülebilmiştir.

Tablo11: Geceyarısı Tükürük Kortizolü ve 1 mg Sonrası Sabah Tükürük kortizolü ve gruplar arası ilişkinin Kruskal-Wallis ile karşılaştırılması

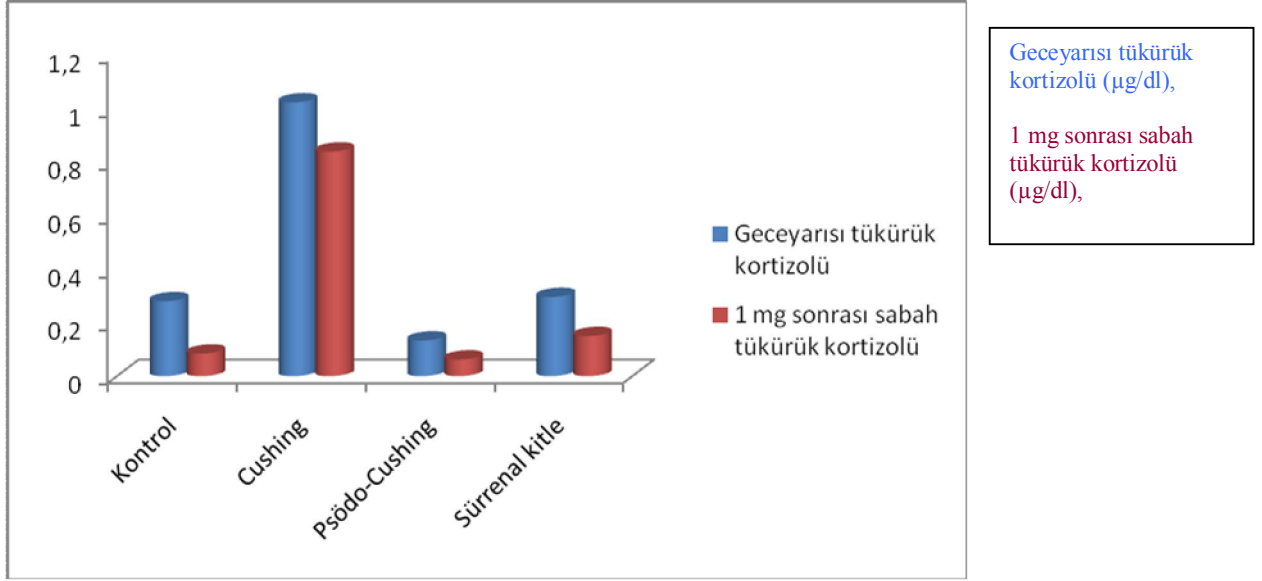
	Kontrol (grup 0) (n:26)	Cushing send (grup1) (n:18)	PsödoCushing (grup2) (n:64)	Sürrenal kitleli (grup 3) (n:12)
1 mg sonrası	0,084±0,015^{a1}	0,84±0,5^{b1}	0,062±0,121^{c1}	0,15±0,06
sabah tükürük kortizolü	0,116-0,052	0,77-0,90	0,02-0,122	0,08-0,21
Bazal kortizol	13,22±0,6^{a2} (13,13±13,26)	22,9±2,16^{b2} (22,83±22,96)	16,99±5,58^{c2} (6,06-27,92)	15,17±3,78 (13,40- 23,4)
Geceyarısı tükürük kortizolü	0,28±0,09^{a3} 0,15-0,26	1,024±0,28^{b3} 0,96-1,08	0,133±0,24^{c3} 0,074-0,192	0,296±0,09 0,231-0,361
İdrar kortizolü	50,94±21,01^{a4} (6,17-95,71)	181,08±52,06^{b4} (72,12-290,04)	20,45±5,6^{c4} (9,474-31,476)	91,37±56,37 (0-214,2)

- %95 ihtimalle güven aralığı alt ve üst sınır değerleri
- a1: 0-1 grupları arası p0.010; 0-2 arası p: 0.001; 0-3 arası p: 0.0001
- a2: 0-1 grupları arası p: 0.001; 0-2 arası p: 0,001; 0-3 arası p: 0.0001
- a3: 0-1 grupları arası p:0.001; 0-2 arası p: 0.001; 0-3 arası p: 0.001
- a4: 0-1 grupları arası p: 0,008; 0-2 arası p: 0,001; 0-3 arası p: 0,001
- b1: 1-2 grupları arası p:0.001; 1-3 arası p: 0.001;
- b2: 1-2 grupları arası p: 0,028; 1-3 arası p: 0,011
- b3: 1-2 grupları arası p: 0.001; 1-3 arası p: 0.001
- b4: 1-2 grupları arası p: 0,001;1-3 arası p: 0,001
- c1: 2-3 grupları arası p: 0.08
- c2: 2-3 grupları arası p:0,140
- c3: 2-3 grupları arası p:0.007
- c4: 2-3 grupları arası p: 0,068

Kontrol ve hasta gruplarının geceyarısı tükürük kortizol düzeyleri, 1mg sonrası sabah tükürük kortizol düzeyleri açısından karşılaştırıldığında gruplar arası farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu Kruskal-Wallis testi ile gösterilmiştir. Cushing sendromu ile kontrol grubu,

psödoCushing ve sürrenal kitle arasında geceyarısı tükürük kortizolü ve 1 mg sonrası sabah tükürük kortizolü arasında istatistik anlamlı ilişki mevcuttur.

Grafik 4: Sağlıklı, Cushing, Psödo-Cushing sendromlu ve sürrenal kitleli hasta gruplarında tükürük kortizol değerleri



En yüksek değerler Cushing sendromlu hastalarda saptanmıştır. Bunu psödo-Cushing sendromlu hastalar izlemiştir. Bu durum literatürle uyumludur.

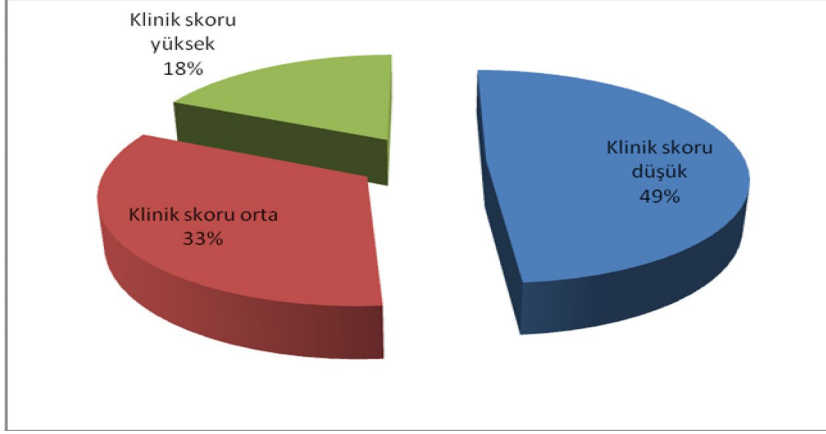
Hastalar klinik skorlarına göre üç gruba ayrıldığında elde edilen değerler Tablo 12’de verilmiştir.

	Klinik skoru düşük olan (S<6) (grup 0) (n:56)	Klinik skoru orta olan (S:6-12) (grup1) (n:38)	Klinik skoru yüksek olan (S>12) (grup 2) (n: 21)
Geceyarısı tükürük kortizolü ^{a1}	0,20±0,35	0,148±0,20	0,880±1,14
1 mg sonrası sabah tükürük kortizolü ^{a2}	0,068±0,11	0,083±0,16	0,288±0,38
1mg sonrası kan kortizolü	0,88±0,9	0,84±0,7	1,45±1,17
İdrar kortizolü ^{a3}	36,53±10,35	28,36±24,22	77,62±8,41
Bazal kortizol ^{a4}	15,35±4,1	16,08±4,37	20,86±6,88

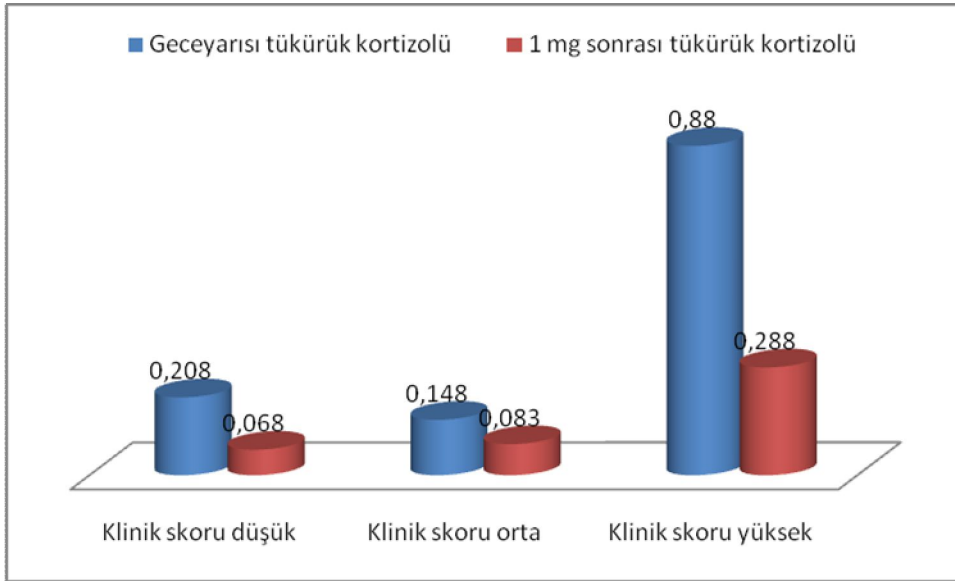
One-Way Anova ile bakıldığında anlamlı p düzeyleri:

- a1: 0-2 grupları arasında p: 0,0001, 1-2 arasında p: 0,0001,
- a2: 0-2 grupları arasında p: 0,0001, 1-2 arasında p: 0,005
- a3: 0-2 grupları arasında p: 0,0001,
- a4: 0-2 grupları arasında p: 0,0001, 1-2 arasında p: 0,002

Grafik 5: Klinik skoruna göre hasta sayıları

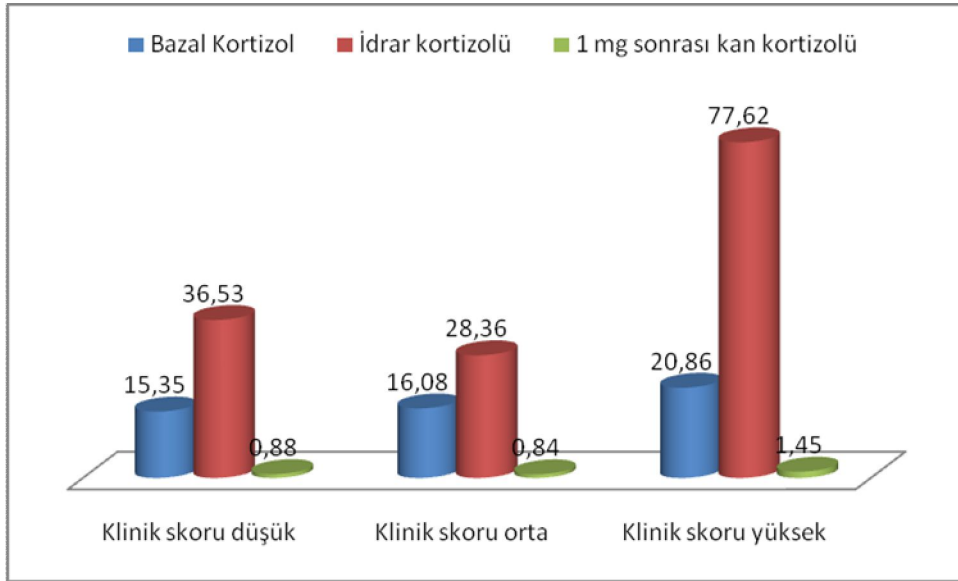


Grafik 6: Klinik skoru düşük, orta ve yüksek olan gruplarda geceyarısı ve 1 mg DST sonrası tükürük kortizol düzeyleri ($\mu\text{g}/\text{dl}$)



Görüldüğü gibi klinik skoru yüksek olan hastalarda geceyarısı ve 1 mg DST sonrası tükürük kortizol düzeyleri daha yüksek bulunmuştur.

Grafik 7: Klinik skoru düşük, orta ve yüksek olan hastalarda kan ve idrar kortizol düzeyleri



Bazal kortizol: µg/dl

İdrar kortizolü: µg/24 saat

1 mg DST sonrası kan kortizolü : µg/dl

Beklenildiği gibi klinik skoru yüksek olan grupta 24 saatlik idrarda serbest kortizol, bazal kortizol ve 1 mg DST sonrası kan kortizol düzeyleri en yüksek değerlerde bulunmuştur.

Sonuç olarak, geceyarısı tükürük kortizolü her toplum için belirlenen normal değerler kullanılarak Cushing sendromu ve psödoCushing sendromunun ayırıcı tanısında, 1 mg DST ile beraber kullanılabilir kolay ve güvenilir bir testtir. Ayrıca 1mg DST sonrası bakılan sabah tükürük kortizol değeri de Cushing sendromu ve psödoCushing sendromu ayırıcı tanısında kullanılabilir bir yöntem olarak görülmektedir.

Sensitivite ve spesifisite oranlarının saptanması için kullanılan formül ise ;

Duyarlılık(sensitivite): $DP / DP + YN \times 100$ ve Belirlilik (spesifisite): $DN / YP + DN \times 100$ şeklindedir.

Çalışmaya alınan hastalarda geceyarısı tükürük kortizolü açısından doğru pozitiflik saptanan hasta sayısı 26, doğru negatiflik saptanan hasta sayısı 61, yalancı pozitiflik saptanan hasta sayısı 10, yalancı negatiflik saptanan hasta sayısı ise 4 olarak saptanmıştır. Geceyarısı tükürük kortizolünün Cushing sendromu tanısını koymada sensitivitesi %86, spesifisitesi ise %85 olarak bulunmuştur.

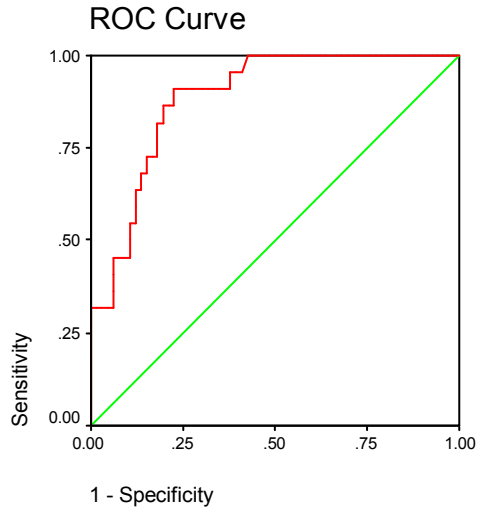
Çalışmanın son aşamasında ROC analizi yardımıyla grup ayırmsamalarının başarıları ve

istatistik anlamlılığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

ROC analizi tıbbi teşhis sonuçlarının gerçek doğruluğunu belirlemek için kullanılır. Bu analizde kullanılan terimlerden duyarlılık (sensitivity), testleri pozitif (hasta) çıkan hastaların (TP) hasta sayısına oranı, belirlilik (specificity) ise testleri negatif (sağlam) çıkan sağlam kişilerin (TN) sağlam sayısına oranıdır. ROC analizi, teşhis prosedürünün duyarlılık ve özgüllüğünü belirlemek için kullanılan standart bir yaklaşımdır. Bunun için teşhisin duyarlılık ve belirliliği arasındaki ilişkiyi tanımlayacak ROC eğrileri kullanılır. Eğrilerin eksenleri TP (hastaya hasta denmesi) ve FP (sağlama hasta denmesi)'dir. Eğriler, 0-1 sınırları arasında olup y koordinatına ve üst sınıra yakınlık başarılı testi gösterirken, 45° gibi eğime sahip eğriler başarısız bir testi gösterir. Böylece ROC eğrileri incelenerek testin başarısı belirlenebilir. Başarılı bir testte eğrilerin altında kalan alanın büyük olması beklenir. ROC eğrisinde sol üst köşeye en yakın nokta duyarlılık ve özgüllüğün en uygun olduğu yeri belirtmektedir. ROC eğrisi altında kalan alan ise, iki farklı grubun doğru bir biçimde ayırt edilme olasılığını vermektedir.

Çalışmada sağlıklı kontrol, Cushing ve psödo-Cushing sendromlu hasta gruplarının farklılığını ortaya koymak amacıyla ROC analizi SPSS 13.0 programı yardımıyla elde edilmiştir. İlk olarak Cushing ve psödo-Cushing sendromlu hastaların geceyarısı tükürük kortizol düzeyine göre ne derece ayımsandığı grafik 10'da gösterilmiştir. Sol köşeye ne kadar yakın grafik elde edilirse ayırsama o derece başarılıdır. Geceyarısı tükürük kortizolü için çalışmamızda saptadığımız eşik değeri olan 0,21 alındığında Cushing ve psödo-Cushing tanısı %86,1 ayımsanmıştır ve bu değeri istatistik anlamlıdır.(p=0.00) Literatürde, %60 değerini geçen çalışmalar başarılı olarak kabul edilmektedir. Gece yarısı değişkeni, Cushing ve psödo-Cushing grubunu ayırmada başarılı bir unsurdur.

Grafik 8: Cushing ve Psödo-Cushing gruplarında ROC eğrisi



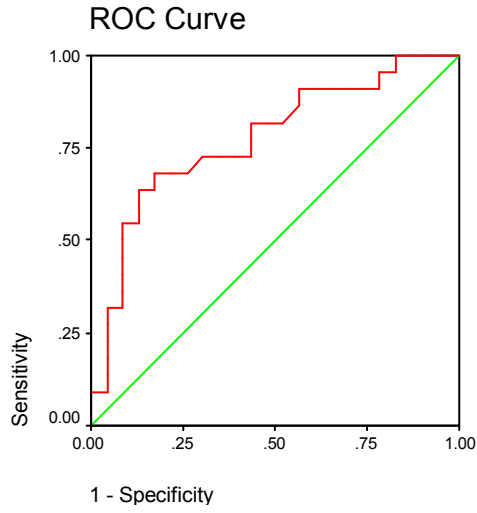
is.

Tablo 13 : Cushing ve psödo-Cushing gruplarına yönelik geceyarısı ayırimsama düzeyi tablosu

Alan	Standart hata	Asymptotic Sig	Asymptotic %95 güven aralığı	
			Alt Sınır	Üst Sınır
.861	.040	.000	.782	.939

Cushing ve psödocushing arasındaki ayırmada yaklaşık %86,1 oranında başarı elde edilmiştir. Gece yarısı tükürük kortizolü teşhişte yine başarılı bulunmuştur.

Grafik 9: Cushing ve sağlıklı grupta ROC eğrisi



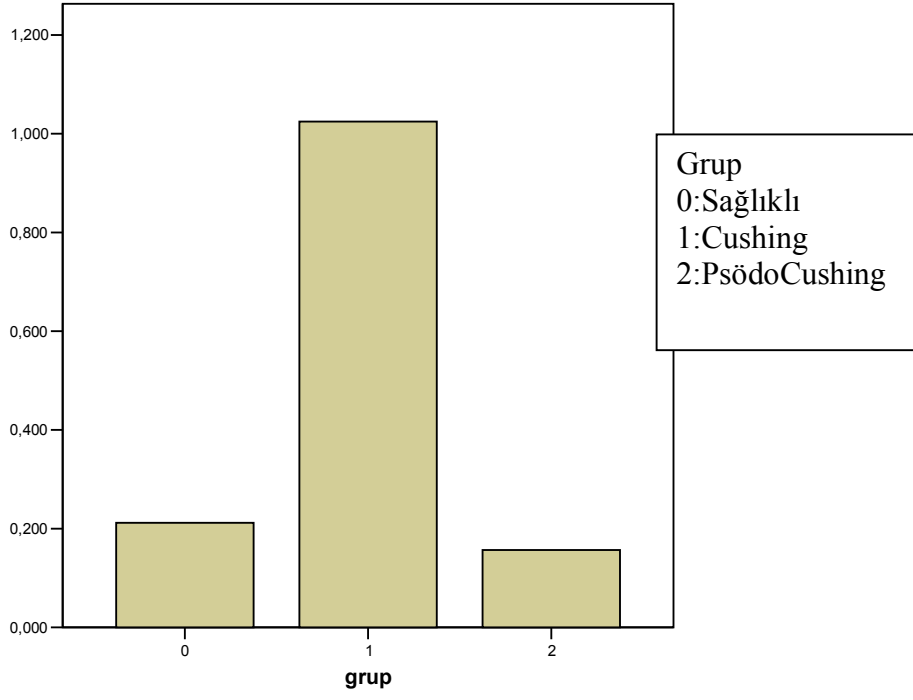
is.

Tablo 14. Cushing ve sağlıklı hasta gruplarına yönelik geceyarısı tükürük kortizolünün ayırimsama düzeyi tablosu

Alan	Standart hata	Asymptotic Sig	Asymptotic %95 güven aralığı	
			Alt Sınır	Üst Sınır
.774	.071	.002	.634	.913

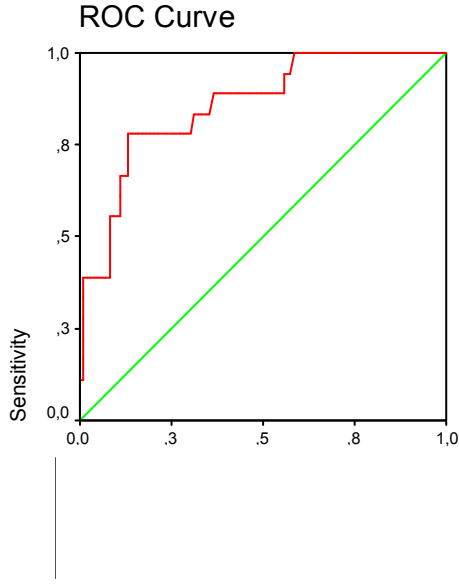
Sağlıklı ve Cushing hasta grubu için geceyarısı tükürük kortizolü 0,21 eşik değeri alındığında %77,4 başarılı bir ayırimsama gücüne sahiptir.

Grafik 10: Sağlıklı, Cushing ve Psödocushing hastalarında ortalama geceyarısı tükürük kortizol düzeyleri ($\mu\text{g}/\text{dl}$)



Cushing sendromlu hastalarda en yüksek ortalama geceyarısı kortizol düzeyleri saptanmıştır.

Grafik 11: Cushing sendromu olan ve olmayan diğer hasta gruplarında geceyarısı tükürük kortizolü açısından ROC eğrisi

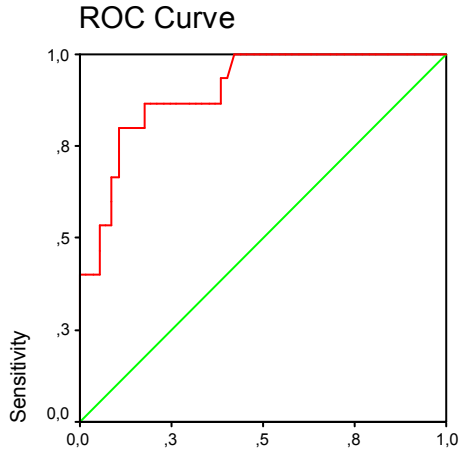


Tablo 15. Cushing sendromlu olan ve olmayan hasta gruplarına yönelik geceyarısı tükürük kortizolünün ayırimsama düzeyi tablosu

Alan	Standart hata	Asymptotic Sig	Asymptotic %95 güven aralığı	
			Alt Sınır	Üst Sınır
.857	.047	.000	.765	.948

Cushing sendromu olan hastalar ve olmayan diğer hastalar arasında geceyarısı tükürük kortizolünün eşik değeri ROC eğrisi ile araştırıldığında sensitivitenin %100, spesifisitenin %98 olduğu eşik değeri 0,024 olarak bulunmuşken, sensitivitenin %100, spesifisitenin %80 olduğu eşik değeri ise 0,042 olarak saptanmıştır.

Grafik 12: Cushing ve psödo-Cushing sendromu arasında 1 mg deksametazon supresyon testi sonrası sabah tükürük kortizolü açısından ROC eğrisi



Tablo-16: Cushing ve psödo-Cushing grupları arasında 1 mg deksametazon supresyon testi sonrası sabah tükürük kortizolünün ayırimsama düzeyi tablosu

Alan	Standart hata	Asymptotic Sig	Asymptotic %95 güven aralığı	
			Alt Sınır	Üst Sınır
.902	.040	.000	.824	.981

Cushing ve psödo-Cushing sendromu arasında 1 mg sonrası sabah tükürük kortizol düzeyinin eşik değeri ROC eğrisi ile bakıldığında sensitivitenin %100, spesifisitenin %98 olduğu değer 0,019 iken, sensitivitenin %100, spesifisitenin ise %89 olduğu değer 0,0315 olarak bulunmuştur.

TARTIŞMA

Cushing sendromu artmış glukokortikoidlere fazla maruz kalma sonucu gelişen, tedavi edilmediğinde mortalitesi 5 yılda %50'lere ulaşabilen ciddi bir hastalıktır. Değişik belirti ve bulgular bir arada bulunabilmektedir. Değişik ülkelerde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda bir milyonda 2 ila 5 arasında değişen insidans oranları saptanmış, bu oranlar obezite, sürrenal insidentaloma, kontrolsüz Tip 2 diyabetes mellitus gibi daha küçük alt gruplarda daha da yüksek saptanmıştır. Bu durum Cushing sendromu tanısının doğru zamanda ve doğru şekilde konulmasını önemli kılmaktadır.

Cushing sendromu olmamasına rağmen bu hastalığa özgü belirti kümelerinin ortaya çıkması oldukça yaygın bir durumdur. Ayrıca Cushing sendromu bulunan tüm hastalar sendromun karakteristik bulgularını taşımazlar. Bu nedenle Cushing sendromunu kesinleştirmek ve etyolojisini araştırmak için kullanılan laboratuvar testlerinin tanısal değerlerinin araştırılması önemlidir.

Testlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin sabit olmadığı tersine ele alınan bir hastalığın şiddetine ya da zamansal durumuna göre değişebildiği düşüncesini vurgulamak için spektrum hatası "case-mix" terimi üretilmiştir. Spektrum hatası farklı popülasyonlarda tanı testi performanslarında görülen değişkenlik anlamına gelmektedir (değişik derecede ve şiddette hastalıkları bulunan hastalardan ve hastalığı bulunmayan kontrol deneklerinden oluşan incelenmiş olguların spektrumu) (61).

Cushing sendromu tanısı için yapılan 1 mg deksametazon supresyon testi (DST) basit bir tarama aracıdır ve duyarlılığı %95 ve özgüllüğü %87 olarak bildirilmiştir (62,63). Normal bireylerde gece uygulanan DST'yi izleyen sabah plazma kortizol düzeylerinin yaş, cinsiyet, beden kitle indeksi ve orta düzeyde alkol alımı ya da sigara kullanımından etkilenmediği gösterilmiştir (64). Ancak 1 mg DST testi depresyon, şizofreni, Alzheimer tipi demans ya da obsesif kompulsif hastalık bulunanların %30-58'inde ve alkolün akut olarak bırakılması durumunda supresyonla sonuçlanmaz (yalancı pozitiflik) (65). Yaşı 65'den daha büyük kişilerde kilo kaybından ya da uyku yoksunluğundan sonra yalancı pozitif DST bulguları da bildirilmiştir. Malabsorpsiyonu bulunan ya da fenitoin, barbitüratlar, rifampisin, meprobamat ve karbamazepin gibi karaciğer metabolizmasını artıran ilaçlar ile tedavi edilenlerde, östrojen kullanımı ve gebelik gibi KBG'i artıran durumlarda da yanlış pozitif sonuçlar bildirilmiştir. Bu nedenle tükürük kortizölü gibi daha kolay, yaygın kullanıma daha uygun, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek yeni tanı yöntemlerine tarama testi olarak ihtiyaç duyulmaktadır.

İki gün 2 mg DST testi içinse plazma kortizolü bakıldığında duyarlılığı %80-98, ve özgüllüğü % 79 olarak bildirilmiştir. CRH ile beraber kullanılması duyarlılık ve özgüllüğü %97 ve 94'e çıkarmaktadır. Bu nedenle tanıda yeri önemli olup sıkı kontrol altındaki koşullarda, tercihan hastane koşullarında yapılması önerilmektedir (66, 67, 83). Cushing hastalığı olan hastaların %3-8'inde deksametazona hassasiyet mevcuttur. Bu nedenle gerek 1 mg gerek iki gün iki mg deksametazon supresyon testlerinde yanlış pozitiflikler olabilmektedir. Ayrıca ülkemiz koşullarında CRH teminindeki güçlük ve yüksek maliyet göz önünde bulundurulmalıdır.

Serum kortizolünde diüurnal ritmin kaybolmasını göstermek için yapılan geceyarısı serum kortizol düzeyinin ölçülmesi, Cushing sendromu tanısında duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir yöntemdir (yaklaşık %97). Ancak poliklinik koşullarında bu testin yapılması uygun olmayacağı için hastaların hastaneye yatırılması önerilmektedir (68). Normal olgularda test sonuçlarının beden kitle indeksi, yaş ya da uyumama durumu ile bağıntılı olmadığı bildirilmiştir (69). Papanicolaou ve arkadaşları hafif hiperkortizolemik hasta altgrubunda geceyarısı serum kortizol düzeyi için %100 özgüllük sağlayan sınır değerler (550 ng/dl=15.2 nmol/L) kullanıldığında, %95 olan genel duyarlılığın %89'a düştüğünü bulmuşlardır (38). Yapılan ROC analizi ile en iyi eşik değer 4 µg/dl olarak bildirilmiştir (42). Geceyarısı plazma kortizol ölçümü, örneğin alınış koşullarının günlük pratikte zor oluşu, hastane yatışı gerektirmesi, sonuç değerlendirilirken farklı merkezlerden bildirilen farklı eşik değerlerin kullanılışı göz önüne alındığında stresli bir yöntem olarak görünmektedir. Yaygın kullanıma uygun görünmemektedir.

Yatma zamanı tükürük kortizol düzeyi ölçümünün Cushing sendromu tanısı için duyarlılığı ise %93, özgüllüğü ise %100'e kadar bildirilmektedir ve Cushing sendromu için yapılan tanı çalışmaları içinde poliklinik koşullarında yapılabilen en basit işlem olma avantajı vardır (46). Ölçümler zayıf normal erişkinlerde ve Cushing sendromu bulunan hastalarda yapıldığında tükürük kortizolünün özgüllüğü daha düşük saptanmıştır (yaklaşık %93)(68,69,70,71,72,73). Çalışmalarda değişik referans değerler bildirilmektedir, bunun nedeni değişik toplumlarda farklı assayler ile yapılan çalışmalardır. Bildirilen çalışmaların pek çoğu RIA ile yapılan çalışmalar olup, son dönemde Amerikan FDA tarafından geliştirilen "enzyme-linked immunosorbent assay (EIA)" ile de çalışmalar yapılmaktadır. Raff ve arkadaşlarının (74) her iki yöntemi aynı örnekte karşılaştırdıkları çalışmada EIA'da tükürük kortizol değerinin RIA'dan daha yüksek saptandığı, ancak RIA ile bulunan değer hastada beklenen değere daha yakın olduğu ve bunun bağımsız tükürük depo solusyonunun dilüe edilmesi ile de doğrulandığı bildirilmiştir. RIA ile ölçümlerin daha uygun olabileceği

düşünülmüştür. Ayrıca son dönemde “Roche Elecsys Immunoassay system” (Salimetrics EIA) ile DPC RIA yöntemi karşılaştırılmış, özellikle çok kritik tanısal değerlerde (11-357 µg/dl veya 0.3-10 nmol/L) her iki yöntemle birbirine çok yakın sonuçlar alındığını saptamışlardır. Yine tükürük kortizolü için bir diğer yöntemde liquid-chromotography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ‘dir. Bu yöntemin diğer yöntemlerle karşılaştırıldığı çalışmalarda daha düşük kortizol değerleri saptandığı bildirilmiştir (75,76). RIA ile yapılmış bir çalışmada tükürük kortizolünün >350 ng/dl (9.8 nmol/L:0.355 µg/dl) olması Cushing sendromu tanısını koydururken, < 150 ng/dl (4.2 nmol/L: 0.152 µg/dl) olması tanıyı dışlar denilmekte, ara değerler olan 150-350 ng/dl için ise ek tanı yöntemlerine başvurulması önerilmektedir (77). Bu nedenle her merkezin kullanılan yönteme göre tükürük kortizolü için normal referans aralığını ve sensitivitesini belirlemesi önerilmektedir. Bizim çalışmamızda LIA yöntemi kullanılmış olup geceyarısı tükürük kortizolünün <147 ng/dl (0,15 µg/dl:4,14 nmol/L) olması durumunda Cushing sendromu olma olasılığının düşük olduğu, > 266 ng/dl (0,27 µg/dl:7,45 nmol/L) olması durumunda Cushing sendromu olma olasılığının yüksek olduğunu, ara değerlerde ise testin tekrarlanması ve diğer tanı yöntemleriyle kombine edilmesi gerektiği bulunmuştur. Halen son kılavuzlarda tükürük kortizol düzeyinin, 24 saatlik idrarda serbest kortizol düzeyi ve 1 mg deksametazon supresyon testleriyle beraber kullanımı önerilmektedir. Bizim çalışmamızda LIA ile yapılan ölçümlerde sağlıklı 100 kişide ölçtüğümüz geceyarısı tükürük kortizol ortalaması $0,21 \pm 0,03$ µg/dl olarak bulunmuştur. Cushing ve psödoCushing sendromlu hastaların geceyarısı tükürük kortizol düzeyleri arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı fark bulunmuş olup, Cushing sendromlu hastalarda geceyarısı tükürük kortizolü psödoCushing sendromlu olanlara göre belirgin olarak yüksektir ($1,024 \pm 0,28$ e karşı $0,133 \pm 0,24$). Tükürük kortizolü, 1 mg deksametazon supresyon testi sonrası sabah bakıldığında Cushing sendromlu, psödoCushing sendromlu ve kontrol grubu karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı fark bulunmuş olup ($p < 0.000$) en yüksek değerler Cushing sendromlu hastalarda saptanmıştır. Cushing sendromu olan hastalar ve olmayan diğer hastalar arasında geceyarısı tükürük kortizolünün eşik değeri ROC eğrisi ile araştırıldığında sensitivitenin %100, spesifisitenin %98 olduğu eşik değer 0,024 olarak bulunmuşken, sensitivitenin %100, spesifisitenin %80 olduğu eşik değer ise 0,042 olarak saptanmıştır.

Çalışma gruplarından farklı olarak alınan sağlıklı gruptan elde edilen geceyarısı tükürük kortizolü %95 CI ile hesaplandığında normal değerlerin alt sınırı 0,16 µg/dl(4,41 nmol/L, 160 ng/dl) ve üst sınırı 0,268 µg/dl (7.39 nmol/L, 268 ng/dl) saptanmaktadır. %99 CI ile ise alt sınır 0,14 µg/dl (3,864 nmol/L, 140 ng/dl) ve üst sınır 0,28 µg/dl (7.72 nmol/L, 280 ng/dl) olarak bulunmaktadır.

Bazı araştırmacılar altın standardın yüksek performanslı sıvı kromatografisi, kitle spektrometrisi ile birlikte uygulanan gaz kromatografisi ya da ardışık kitle spektrometrisi ile 24 saatlik idrar serbest kortizol düzeyi ölçümü (UFC) olduğunu kabul etmektedir (62,78). Cushing sendromu bulunan hastaların %15'ine varan kısmında dört ölçümden birisi normal olabileceği için iki ya da üç kez 24 saatlik örnek alınmalıdır ve tercihen birlikte kreatinin ölçümü yapılmalıdır. Cushing sendromunun değerlendirilmesinde UFC'nin duyarlılığı %95-100 ve özgüllüğü %94-98 arasındadır (67). UFC yaş cinsiyet, beden kitle indeksi (35-40'ı aşmadığı sürece), orta düzeyde alkol alımı ya da sigara içilmesi ile değişikliğe uğramamaktadır (64). Glomerüler filtrasyon hızı 30 ml/dk'dan düşük olan ya da böbrek yetersizliği bulunan hastalarda UFC ölçümü geçerli değildir. Ayrıca depresyon, anksiyete bozukluğu, obsesif-kompulsif bozukluk, uyku-apne, morbid obezite, polikistik over sendromu, iyi kontrol edilemeyen diyabetes mellitus, glukokortikoidlere ailesel direnç, hipertiroidi ya da alkolizm bulunan hastaların %40 kadarında UFC normal sınırlardan daha yüksek olabilir (62, 66, 67). İdrar serbest kortizol değerinin normal referans değerinin 4 katı ve daha fazla yüksek olmasının kuvvetle Cushing sendromu düşündürdüğü bildirilmiştir (46). Normal değerler ise çalışılan laboratuvar ve kullanılan yöntemle göre değişir. Genellikle RIA ile çalışılan yöntemlerde < 80-120 µg/24 saat, veya <220-330 nmol/24 saat, HPLC ile ise <50 µg/24 saat veya <138 nmol/24 saat normal değerler olarak bildirilmektedir. Bizim çalışmamızda 24 saatlik idrar serbest kortizol düzeyi tayini için RIA yöntemi kullanılmış olup, en yüksek değerler Cushing sendromunda saptanmış, sağlıklı grubun ortalaması ise 50,94±21.1 µg/24 saat bulunmuştur. Sağlıklı kontrol grubu ile Cushing ve psödo-Cushing sendromlu hastalar arasında idrar serbest kortizol düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır (p<0.05). Ancak idrar serbest kortizol düzeyi değerlendirilirken tek örneğin yetmeyeceği, sağlıklı koşullarda toplamının gerekliliği, 4 kat ve üstü yüksekliklerin klinik anlamlı olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Plazma ACTH düzeyleri, ACTH'a bağımlı olan ve olmayan hastalıkları ayırt etmede yol gösterici olabilir (48). Cushing sendromu bulunan hastalarda yapılan bir çalışmada plazma ACTH düzeylerinin duyarlılık ve özgüllüğünün %100 olduğu bildirilmiş olmasına karşın,

başka bir çalışmada Cushing hastalarının %55'inde, ektopik ACTH salgılanması bulunan hastaların %17'sinde ve adrenal tümörü bulunan hastaların %28'inde ACTH düzeyleri normal bulunmuştur (79, 80).

Tükürük kortizol düzeyi, plazma serbest kortizolü açısından çok değerli bir göstergedir. Kortizol kanda proteinlere bağlı olarak bulunur. KBG veya transkortin kortizolün %90'ının bağlandığı proteindir, kortizolün %7'si ise albümine bağlanır. Plazma serbest kortizolü tükürük bezlerinden salınır ve bağlayıcı proteinler tükürükte bulunmaz. Tükürük salınma hızından da etkilenmez. Tükürük biriktirilmesi kolay ve non invaziv bir yöntemdir. Tükürükte kişiye bağlı olarak bulunabilecek bakterilerden de etkilenmez. Standart buzdolaplarında + 4 C derecede laboratuara gönderilene kadar rahatlıkla saklanabilmektedir.

Tükürük örneğinde bakılabilecek hormon örnekleri arasında kortizol, östrojen, progesteron, testosteron, melatonin, DHEAS sayılabilir. Ancak geçerliliği kanıtlanmış tek ölçüm kortizol ölçümüdür (76). Serum kortizolü alınırken damara girmenin yarattığı stresin kortizol düzeyine etkisi non invaziv bir yöntem olan tükürük örneğinin alınması esnasında oluşmamaktadır (81).

Putignano ve arkadaşları geceyarısı tükürük kortizolü için 0.35 µg/dl (9.7nmol/litre) eşik değeri alındığında Cushing tanısında %93 sensitiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır (69). Bizim çalışmamızda da benzer olarak geceyarısı tükürük kortizolünün Cushing sendromu tanısını koymada sensitivitesi %86, spesifisitesi ise %85 olarak bulunmuştur. Yine aynı çalışmada UFC ile geceyarısı tükürük kortizolü arasındaki uyumlu bulgular sadece Cushing sendromu olan hastalarda bulunmuştur. Değişik eşik değerler alınarak yapılan pek çok araştırmada geceyarısı tükürük kortizolü için sensitivite %92-93 arasında bulunmuştur (68-71).

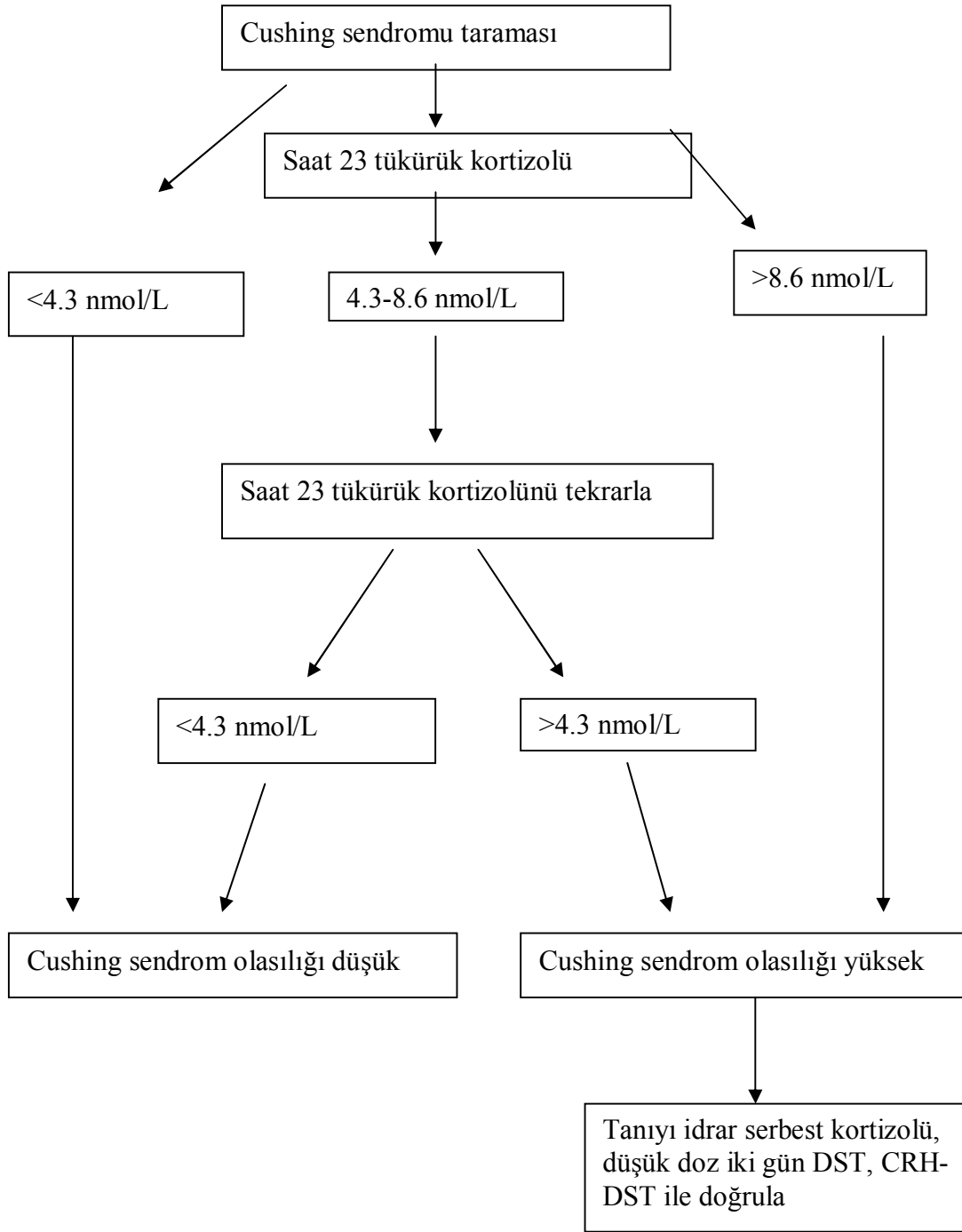
Castro ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 1mg DST ile kombine edilmiş tükürük kortizol ölçümünün sensitivitesi %91.4'ten 100'e çıkmaktadır (68). Tükürük kortizolü için 90 mcı persantilin üstünde bir eşik değeri seçildiğinde (normal kontrollerde 62 ng/dl, obezlerde 392 ng/dl) sensitivite ve spesifisite değerleri %100, %100 ve %91.4, %94.4 olarak bulunmuştur (68). Sabah tükürük kortizolü ölçümü hiperkortizolemi ayırıcı tanısında yararlı bulunmamıştır. Bizim çalışmamızda da 1 mg deksametazon supresyon testi sonrası bakılan sabah tükürük kortizolünde supresyon dereceleri grup içi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır(p>0,05). Gruplar arası karşılaştırmalar yapıldığında, Cushing ve psödo-Cushing sendromu arasında 1 mg sonrası sabah tükürük kortizol düzeyinin eşik değeri ROC eğrisi ile bakıldığında sensitivitenin %100, spesifisitenin %98 olduğu değer 0,019 iken, sensitivitenin %100, spesifisitenin ise %89 olduğu değer 0,0315 olarak bulunmuştur. Yine Castro ve arkadaşlarının çalışmasında Cushing hastalığında sirkadyen ritmin takibi

tükürük kortizolü ile yapılmıştır. Cushing sendromu olan hastaların %43'ünde saat 17 ve 23 teki tükürük kortizol değerlerinde diüurnal varyasyon görülmüş, ancak tüm değerler yüksek saptanmıştır.

Çalışmamızda hastalar klinik skorlarına göre düşük (<6), orta (6-12) ve yüksek(>12) olarak gruplanmış, geceyarısı tükürük kortizolü açısından gruplar karşılaştırıldığında klinik skoru düşük olan grupla yüksek olan grup arasında ve orta olan grup ile yüksek olan grup arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı ilişki saptanmıştır (p: 0,0001). Benzer ilişki 1 mg sonrası sabah tükürük kortizolünde de saptanmıştır. İdrar serbest kortizolü ise sadece klinik skoru düşük ve yüksek grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p: 0,0001). Cushing sendromu açısından hastalar klinik skorlarına göre değerlendirilirken yüksek skorlu grupta gerek geceyarısı, gerekse 1 mg sonrası sabah tükürük kortizolü istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir.

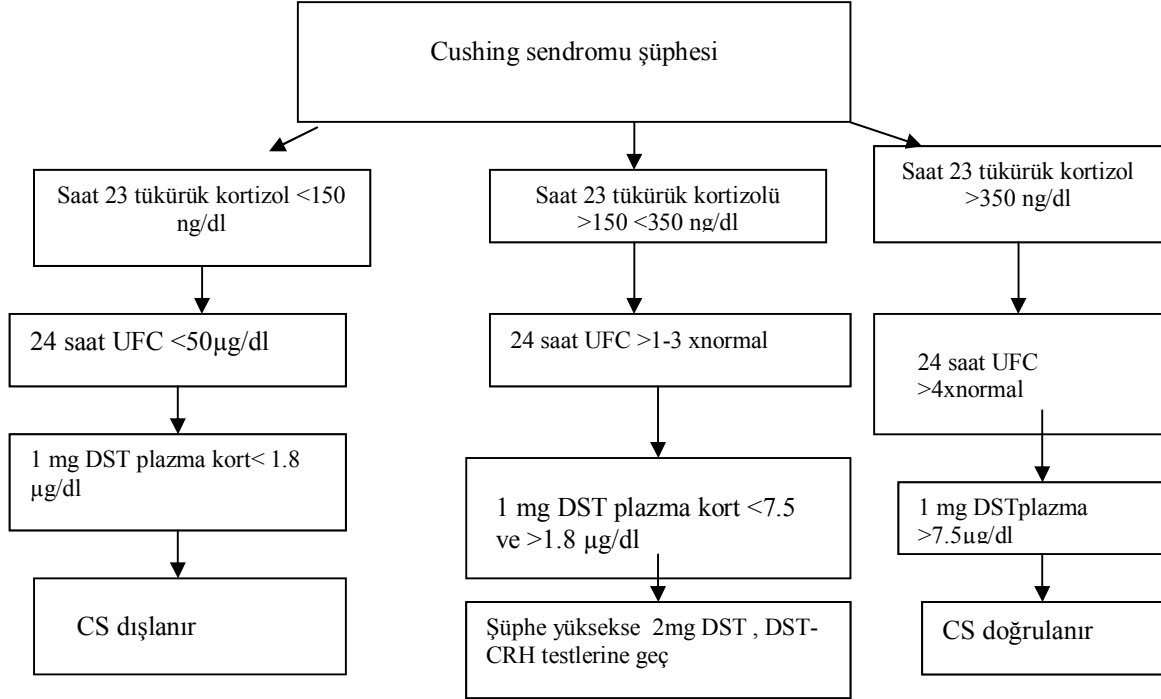
Sonuç olarak geceyarısı tükürük kortizolünün ülkemizde de, Cushing sendromu tanısında noninvaziv ve stressiz bir yöntem olarak, hastanın klinik şüpheyi de göz önüne alınarak diğer tarama yöntemleriyle beraber güvenle kullanılabileceği düşünülmektedir.

Hastaların taranmasında literatürde önerilen algoritmelerden iki ayrı örnek aşağıda bildirilmiştir. Bizim hasta grubumuzda sağlıklı hastalardan elde edilen geceyarısı tükürük kortizolü ortalaması 0,21µg/dl (5,796 nmol/L: 210 ng/dl) olarak saptanmıştır. Cushing sendromu taramasında geceyarısı tükürük kortizolünün kullanılmasına yönelik önerilerimiz şekil-3'te özetlenmiştir.

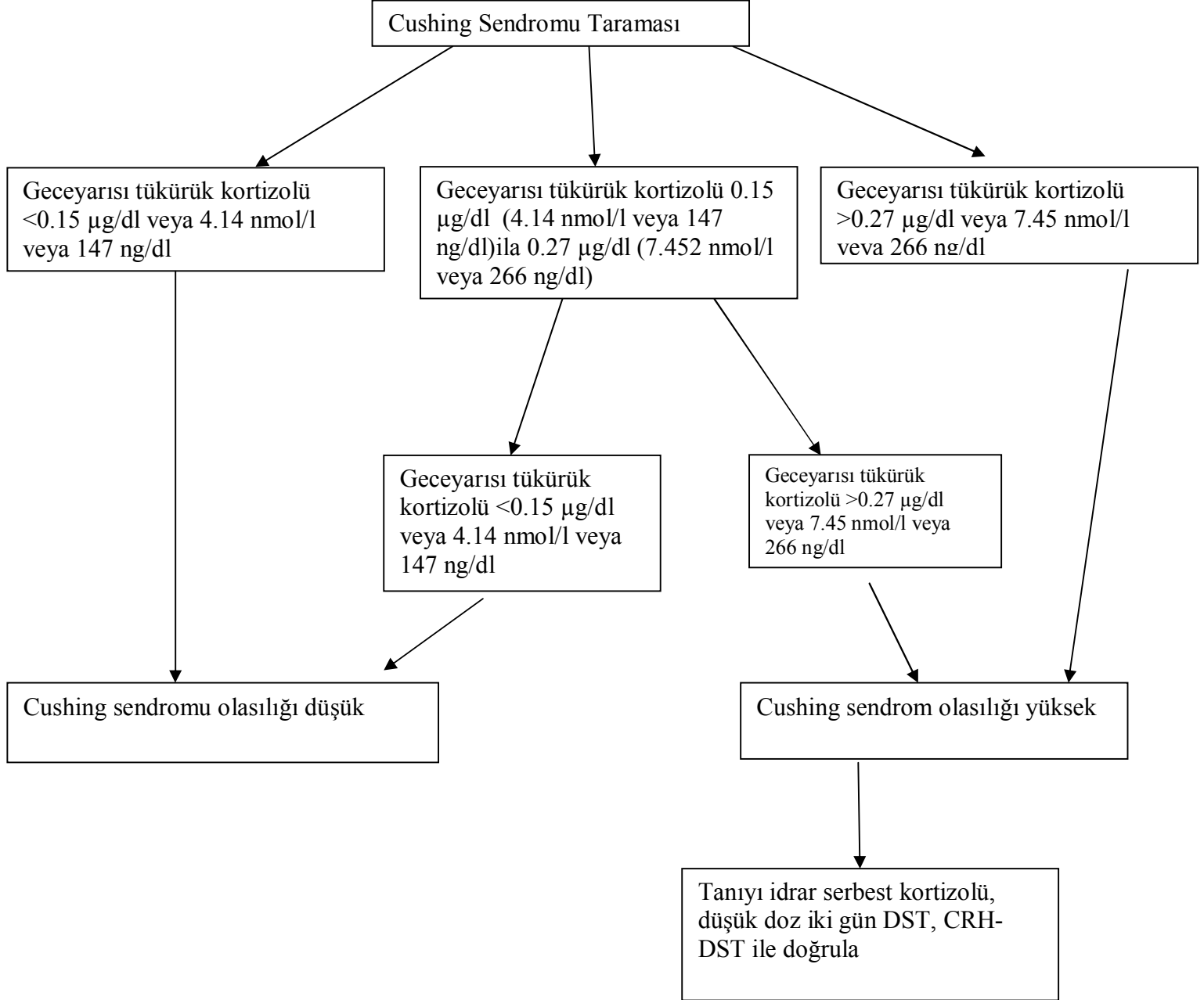


Şekil-1: Cushing Sendromu tanısında algoritim (Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 2005)

Şekil-2. CS tanısında algoritm (38)



Şekil-3: Bizim verilerimize göre önerilerimiz



SONUÇ

Çalışmamızda LIA ile bakılan geceyarısı tükürük kortizolünün normal değerini belirlemek için bakılan 100 hastadan elde edilen geceyarısı tükürük kortizolü ortalaması 0,21µg/dl (5,796 nmol/L: 210 ng/dl) olarak saptanmıştır. Geceyarısı tükürük kortizolünün Cushing sendromu tanısını koymada, sensitivitesi %86, spesifisitesi ise %85 olarak bulunmuştur.

Cushing sendromu olan hastalar ve diğer hastalar arasında geceyarısı tükürük kortizolünün eşik değeri ROC eğrisi ile araştırıldığında sensitivitenin %100, spesifisitenin %98 olduğu eşik değer 0,024 olarak bulunmuşken, sensitivitenin %100, spesifisitenin %80 olduğu eşik değer ise 0,042 olarak saptanmıştır. Cushing ve psödo-Cushing sendromu arasında 1 mg sonrası sabah tükürük kortizol düzeyinin eşik değeri ROC eğrisi ile bakıldığında sensitivitenin %100, spesifisitenin %98 olduğu değer 0,019 iken, sensitivitenin %100, spesifisitenin ise %89 olduğu değer 0,0315 olarak bulunmuştur.

Hastalar klinik skorlarına göre düşük, orta ve yüksek olarak gruplanmış geceyarısı tükürük kortizolü ve 1 mg sonrası tükürük kortizolü açısından gruplar karşılaştırıldığında klinik skoru düşük olan grupla, yüksek olan grup arasında ve orta olan grup ile yüksek olan grup arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı ilişki saptanmıştır (p: 0,0001).

Sonuç olarak; geceyarısı tükürük kortizolü her toplum için belirlenen normal değerler kullanılarak Cushing sendromu ve psödo-Cushing sendromunun ayırıcı tanısında, 1 mg DST ile beraber kullanılabilecek kolay ve güvenilir bir testtir. Ayrıca 1mg DST sonrası bakılan sabah tükürük kortizol değeri de Cushing sendromu ve psödoCushing sendromu ayırıcı tanısında kullanılabilecek bir yöntem olarak görülmektedir.

ÖZET

Çalışmamızda Cushing sendromu tanısında basit, non-invaziv ve yeni tanı yöntemlerinden biri olan geceyarısı tükürük kortizolünün yeri araştırılmıştır.

Çalışmaya 78 psödoCushing, 16 sürrenal kitle, 26 tanısı doğrulanmış Cushing sendromu, 26 kontrol grubu alınmıştır. Çalışmanın ayrı bir parçası olarak sağlıklı popülasyonda normal geceyarısı tükürük kortizol düzeylerini saptamak amacıyla, herhangi bir şikayeti olmayan ve ilaç kullanmayan rastlantısal seçilmiş 100 hastada geceyarısı tükürük kortizolü, bakılmıştır.

Çalışmaya alınan tüm hastaların yakınmaları, ayrıntılı fizik muayeneleri yapılmış, Cushing sendromu için önemli olabilecek tüm belirti ve bulgular kaydedilmiştir. Hastalar saat 24'te bazal tükürük örneklerini vermişler ve ardından uygulanan 1 mg deksametazon supresyon testi sonrası sabah 08'de serum ve tükürük örnekleri vermişlerdir. 24 saatlik idrar serbest kortizol tayini ve adrenal insidentaloma hastalarında diğer hormon sekresyonları ekarte edildikten sonra ek olarak yapılan supresyon testleri esnasında serum kortizol değerlerine ek olarak tükürük ve idrar kortizol tayinleri de yapılmıştır. Tükürük kortizolü Cortisol-LIA 96 test, serum kortizolü Cortisol-ELISA 96 test, 24 saatlik idrar kortizolü ise RIA ile ölçülmüştür. Bu çalışmada SPSS 12 programı kullanılmıştır. Sağlıklı grubun geceyarısı tükürük kortizol ortalaması $0,21 \pm 0,03$ $\mu\text{g/dl}$ bulunmuştur. Ayrıca aynı grupta geceyarısı tükürük kortizolü %95 ihtimalle güven aralığı ile değerlendirildiğinde üst sınır 0,268 ve alt sınır 0,16 $\mu\text{g/dl}$ bulunmuştur. %99 ihtimalle değerlendirildiğinde ise, üst sınır 0,28 ve alt sınır 0,14 $\mu\text{g/dl}$ bulunmuştur. Geceyarısı tükürük kortizolünün Cushing sendromu tanısını koymada, sensitivitesi %86, spesifisitesi ise %85 olarak bulunmuştur.

Kontrol ve hasta grupları geceyarısı tükürük kortizol düzeyleri açısından karşılaştırıldığında gruplar arası farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu Kruskal-Wallis testi ile gösterilmiştir. Ayrıca hastalar klinik skorlarına göre düşük, orta ve yüksek olarak gruplanmış, geceyarısı tükürük kortizolü ve 1 mg sonrası tükürük kortizolü açısından gruplar karşılaştırıldığında klinik skoru düşük olan grupla, yüksek olan grup arasında ve orta olan

grup ile yüksek olan grup arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı ilişki saptanmıştır (p: 0,0001).

Sonuç olarak; geceyarısı tükürük kortizolü her toplum için belirlenen normal değerler kullanılarak Cushing sendromu ve psödoCushing sendromunun ayırıcı tanısında kullanılabilecek kolay ve güvenilir bir test olarak görünmektedir.

SUMMARY

78 Patients with PseudoCushing Syndrome (50 obesity, 18 hirsutism, 10 diabetes mellitus), 16 adrenal tumors, 26 pathologically confirmed Cushing's Syndrome (15 Cushing Disease, 10 Cushing Syndrome and 1 ectopic ACTH Syndrome), and 26 healthy individuals as the control group are included in our study. Midnight salivary cortisol was also measured in 100 healthy individuals who did not use any medications. The symptoms, detailed physical findings, weight and height, body mass index (BMI), waist/hip ratio, systolic and diastolic blood pressures and also hirsutism, weight gain, purple-stria, plethore, buffalo-hump, supraclavicular fullness, temporal fat cushion, acne, moonface, proximal muscle weakness, lower limb edema, ecchymosis, loss of libido, depression, diabetes mellitus, hypertension, alopecia of all patients were noted in evaluation forms (18 findings). Salivary samples were collected from the individuals after 9 p.m. at rest, without using any steroid drops, ointments or medications or without teeth brushing. Salivary samples are collected at midnight and also after administering two tablets of 0.5 mg DXM orally at 8 am before breakfast. Before the test 24-hour urine samples were collected to detect urinary free cortisol levels. The evaluation of patients with adrenal tumors were done after dexamethasone suppression tests and with testing other hormone secretions.

The salivary, serum and urinary cortisol levels were measured by Cortisol-LIA 96, Cortisol-ELISA 96 and RIA tests respectively. SPSS 12.0 and 13.0 programme was used. Comparison of the results of the patients with healthy group was made with Kruskal-Wallis test.

The maximum midnight salivary cortisol levels measured by LIA with 95% confidence intervals for our population were 0.268 µg/dl upper bound and lower bound 0.16 µg/dl. For a confidence interval of 99%, upper bound and lower bound levels were 0.28 µg/dl and 0.14 µg/dl, respectively. The mean midnight salivary cortisol of the healthy population (100 individuals) was 0.21 ± 0.03 µg/dl. A statistically significant difference between midnight salivary cortisol levels and 1mg dexamethasone suppression test was found between the patients and the healthy group. The pseudo-Cushing patients that can be separated as obesity and hirsutism groups, had also statistically significant differences of midnight salivary cortisol levels and levels following 1mg dexamethasone suppression.

As a conclusion, accepted normal levels of midnight salivary cortisol can be used in conjunction with 1mg DST in the differential diagnosis of Cushing and PseudoCushing Syndromes.

KAYNAKLAR

1. Cushing H. The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations (pituitary basophilism). Johns Hopkins Hospital Bull 1932;50:137-95
2. Shute AM. The evolution of Cushing's syndrome as a clinical entity. Adv Intern Medicine 1969;15:155-75.
3. Newell-Price J ,Trainer P, Besser M, Grossman A. The diagnosis and Newell-Price differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states. Endocr Rev 1998;19: 647-672.
4. Musselman DL, Nemeroff CB: Depression and endocrine disorders: focus on the thyroid and adrenal system. Br J Psychiatry Suppl 1996;123-128.
5. Wand GS, Dobs AS: Alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in actively drinking alcoholics. J Clin Endocrinol Metab 1991;72: 1290-1295,.
6. Tsigos C, Young RJ, White A: Diabetic neuropathy is associated with increased activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. J Clin Endocrinol Metab 1993;76: 554-558.
7. Gold PW, Goodwin FK, Chrousos GP: Clinical and biochemical manifestations of depression.Relation to the neurobiology of stress . N Engl J Med 1988;319:348-53.
8. Chrousos GP, Schuermeyer TH, Doppman J, Oldfield EH, Schulte HM, Gold PW, Loriaux DL:NIH conference. Clinical applications of corticotropin-releasing factor. Ann Intern Med 1985;102:344-58.
9. Gold PW, Loriaux DL, Roy A, Kling MA, Calabrese JR, Kellner CH, Nieman LK, Post RM, Pickar D, Gallucci W, et a: Responses to corticotropin-releasing hormone in

the hypercortisolism of depression and Cushing's disease. Pathophysiologic and diagnostic implications. *N Engl J Med* 1986;314:1329-35.

10. Lindholm J, Juul S, Jorgensen Jo ve ark. Incidence and late prognosis of Cushing's syndrome: a population-based study. *JCEM* 2001;86 (1):117-23 .
11. Leibowitz G, Tsur A, Chayen SD ve ark. Preclinical Cushing's syndrome: an unexpected frequent cause of poor glycemic control in obese diabetic patients. *Clin Endocrinol* 1996; 44 (6):717-22.
12. Kadioğlu P, Tiryakioğlu O, Yirmibeşçik S ve ark. Screening for Cushing's syndrome in obese patients: is it really necessary? Presented at the Endocrine Society Meeting. New Orleans, Louisiana 2004 June 16-19.
13. Findling JW, Raff H. Diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin Noerth Am* 2001;30 (3):729-47.
14. Plotz CM, Knowlton AI, Ragan C. The natural history of Cushing's syndrome. *Am J Med* 1952; 13:597-614.
15. Popovic V, Micic D, Nesovic M, Howlett T, Doniach I, Kendereski A, Djordjevic P, Manojlovic D, Micic J, Besser M. Cushing's disease cycling over ten years. *Exp Clin Endocrinol*. 1990 Nov;96(2):143-8.
16. Ritchie M, Sheridan B, Fraser R, Hadden DR, Kennedy AL, Riddell J, Atkinson AB. Studies on the Pathogenesis of Hypertension in Cushing's Disease and Acromegaly *Q J Med* 1990; 76: 855-867C.
17. Magiakou MA, Smyrnaki P, Chrousos GP. Hypertension in Cushing's syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2006 Sep;20(3):467-82.

18. W. Tenschert, P. Baumgart, P. Greminger, W. Vetter, H. Vetter. Pathogenetic Aspects of Hypertension in Cushing's Syndrome 1985 *Cardiology* Vol 17 sup 1
19. Karbonits M, Chahal HS, Kaltsas G. Expression of phosphorylated p27(Kip 1) protein and jun activation domain-binding protein 1 in human pituitary tumors. *JCEM* 2002;87:2635-2643.
20. Beuschlein F, Reincke M, Karl M. Clonal composition of human adrenocortical neoplasms. *Cancer Res* 1994; 54:4927-4932.
21. Kirschner LS, Sandrini F, Monbo J. Genetic heterogeneity and spectrum of mutations of the PRKAR1A gene in patients with the Carney complex. *Hum Mol Genet* 2000;9:3037-3046.
22. Lacroix A, Ndiaye N, Tremblay J, Hamet P. Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endocr Rev* 2001;22:75-110.
23. Ronald J. M. Crougths, Pierre M. J. Zelissen, Theo J. M. V. van Vroonhoven, Leo J. Hofland, Nina N'diaye, André Lacroix & Wouter W. de Herder GIP-dependent adrenal Cushing's syndrome with incomplete suppression of ACTH *Clinical Endocrinology* Volume 52 Issue 2, Pages 235 – 240.
24. Lacroix A, Tremblay J, Touyz R, et al. Abnormal adrenal and vascular responses to vasopressin mediated by a V1-vasopressin receptor in a patient with adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia, Cushing's syndrome and orthostatic hypotension. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2414-2422
25. Ross EJ, Linch DC. Cushing's syndrome--killing disease: discriminatory value of signs and symptoms aiding early diagnosis. *Lancet* 1982; 2(8299):646-649.

26. Orth DN. Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 1995; 332(12):791-803.
27. Wajchenberg BL, Mendonca BB, Liberman B et al. Ectopic adrenocorticotrophic hormone syndrome. *Endocr Rev* 1994;15(6):752-787.
28. Starkman MN, Schteingart DE. Neuropsychiatric manifestations of patients with Cushing's syndrome. Relationship to cortisol and adrenocorticotrophic hormone levels. *Arch Intern Med* 1981;141:215-219.
29. Bouzas EA, Mastorakos G, Friedman TC, Scott MH, Chrousos GP, Kaiser-Kupfer ML. Posterior Subcapsular Cataract in Endogenous Cushing Syndrome: An Uncommon Manifestation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34:3497-3500.
30. Bouzas EA, Mastorakos G, Chrousos GP, Kaiser-Kupfer MI. Lisch nodules in Cushing's disease. *Arch Ophthalmol* 1993, April, 111(4):439-40.
31. Boscaro, M., Barzon, L., Fallo, F. & Sonino, N. (2001) Cushing's syndrome. *Lancet*, 357, 783–791
32. Pivonello R, Faggiano A, Lombardi G et al, The metabolic syndrome and cardiovascular risk in Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2005;34:327-329
33. Faggiano A, Pivonello R, Melis D et al. Nephrolithiasis in Cushing's disease: prevalence, etiopathogenesis, and modification after disease cure. *JCEM* 2003;88 (5):2076-80.

34. Ohmori N, Nomura K, Ohmori K, Kato Y, Itoh T, Takano K. Osteoporosis is more prevalent in adrenal than in pituitary Cushing's syndrome. *Endocr J.* 2003 Feb;50(1):1-7.
35. M. Minetto, G. Reimondo, G. Osella, M. Ventura, A. Angeli and M. Terzolo Bone loss is more severe in primary adrenal than in pituitary-dependent Cushing's syndrome osteoporosis international *Osteoporos Int* (2004) 15: 855–861
36. The Diagnosis of Cushing's Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline, The Endocrine Society, 2008.
37. James Findling, Hershel Raff. Cushing's Syndrome. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2005; 6: (34).
38. Papanicolaou DA, Yanovski JA, Cutler GB, Jr., Chrousos GP, Nieman LK. A single midnight serum cortisol measurement distinguishes Cushing's syndrome from pseudo-Cushing states. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1163-1167.
39. Cunningham JM, Buxton OM, Weiss RE. Circadian variation in Cushing's disease and pseudo-Cushing states by analysis of cortisol and adrenocorticotropin pulsatility. *J Endocrinol Investig* 2002;25:791-799.
40. Pituitary Disorders, *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, March 2008 (37), number 1;138 .
41. Arnaldi G, Angeli A, Atkinson AB. Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *JCEM* 2003;88(12):5593-602.
42. Murphy BEP. Urinary free cortisol determinations: what they measure. *Endocrinologist* 2002;12:143-50.

43. Lin CL, Wu TJ, Machacek DA ve ark. Urinary free cortisol and cortisone determined by high liquid chromatography in the diagnosis of Cushing's syndrome. *JCEM* 1997;82:151-5.
44. Findling JW, Pinkstaff SM, Shaker JL ve ark. Pseudohypercortisoluria: spurious elevation of urinary cortisol due to carbamazepine. *Endocrinologist* 1998;8:51-4.
45. Meikle AW, Findling J, Kushnir MM ve ark. Pseudo-Cushing's syndrome caused by fenofibrate interference with urinary cortisol assayed by high-performance liquid chromatography. *JCEM* 2003;88:3521-4.
46. Castro M, Moreira A. Screening and diagnosis of Cushing syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007; 51, (8).
47. Yanovski JA, Cutler GB, Jr., Chrousos GP, Nieman LK: Corticotropin-releasing hormone stimulation following low-dose dexamethasone administration. A new test to distinguish Cushing's syndrome from pseudo-Cushing's states. *JAMA* 1993; 269: 2232-2238.
48. Carroll BJ, Curtis GC, Davies BM, Mendels J, Sugerman AA: Urinary free cortisol excretion in depression. *Psychol Med* 1976;6: 43-50.
49. Yaneva M, Mosnier-Pudar H, Dugue MA, Grabar S, Fulla Y, Bertagna X. Midnight Salivary Cortisol for the Initial Diagnosis of Cushing's Syndrome of Various Causes. *JCEM* 2004; 89(7):3345–3351.
50. Terzolo M, Osella G, Ali A, Borretta G, Cesario F Subclinical. Cushing's syndrome in adrenal incidentaloma; *Clin Endocrinol* 1998; 48:89-97.
51. Tsagarakis, S. ; Roboti, C. ; Kokkoris, P. ; Vasiliou, V. ; Alevizaki, C.; Thalassinou, N. Elevated post-dexamethasone suppression cortisol concentrations correlate with

hormonal alterations of the hypothalamo-pituitary adrenal axis in patients with adrenal incidentalomas. *Clinical Endocrinology*. 1998; 49(2):165-171.

52. Dimitris A. Papanicolaou, Nancy Mullen, Ioannis Kyrou, and Lynette K. Niemann
Nighttime salivary cortisol: a useful test for the diagnosis of Cushing's syndrome.
JCEM 2002;87(10):4515-4521.

53. Al-Saadi N, Diederich S, Oelkers W A very high dose dexamethasone suppression test
for the differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol* 1998; 48:45-51.

54. Mary R. Flack, MD; Edward H. Oldfield, MD; Gordon B. Cutler, Jr., MD; Mark H.
Zweig, MD; James D. Malley, PhD; George P. Chrousos, MD; D. Lynn Loriaux, MD,
PhD; and Lynnette K. Nieman, MD. Urine Free Cortisol in the High-Dose
Dexamethasone Suppression Test for the Differential Diagnosis of the Cushing
Syndrome .*Annals of internal medicine* 1992 ; 116 : (3) : 211-217 .

55. Yanovski JA, Cutler Jr GB, Chrousos GP, Nieman LK The dexamethasone-
suppressed corticotropin-releasing hormone stimulation test differentiates mild
Cushing's disease from normal physiology. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:348–
352.

56. Wiggam MI, Heaney AP, McIlrath EM, McCance DR, Sheridan B, Hadden DR,
Atkinson AB Bilateral inferior petrosal sinus sampling in the differential diagnosis of
adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome: A comparison with other
diagnostic tests. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1525-1532.

57. Manni A, Latshaw RF, Page R, Santen RJ Simultaneous bilateral venous sampling for adrenocorticotropin in pituitary-dependent Cushing's disease: Evidence for lateralization of pituitary venous drainage. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:1070-1073.
58. Obuobie K, Davies JS, DOgunko A, Scanlon MF Venous thrombo-embolism following inferior petrosal sinus sampling in Cushing's disease. *J Endocrinol Invest* 2000; 23:542-544.
59. Colao A, Faggiano A, Rivonelo R, Giraldi FP, Cavagnini F, Lombardi G Inferior petrosal sinus sampling in the differential diagnosis of Cushing's syndrome: Results of an Italian multicenter study. *Eur J Endocrinol* 2001;144:499-507.
60. Pituitary Disorders. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2008; 1(37):140 .
61. Mulherin SA, Miller WC: Spectrum bias or spectrum effect? Subgroup variation in diagnostic test evaluation. *Ann Intern Med* 2002; 137:598-602.
62. Niemann LK: Diagnostic tests for Cushing's syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 970:112-118.
63. Wood PJ, Barth JH, Freedman DB et al. Evidence for the low dose dexamethasone suppression test to screen for Cushing's syndrome: Recommendations for a protocol for biochemistry laboratories. *Ann Clin Biochem* 1997; 34:222-229.
64. Bos Kuil MJ, Endert E, Filers E et al. Establishment of reference values for endocrine tests. Cushing's syndrome. *Neth J Med* 1998; 53:153-163.
65. Nierenberg AA, Feinstein AR: How to evaluate a diagnostic marker test: Lessons from the rise and fall of dexamethasone suppression test. *JAMA* 1988; 259:1699-1702.

66. Newell-Price J, Trainer P, Beser M et al. The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states. *Endocr Rev* 1998;19:647-672.
67. Boscaro M, Barzon L, Sonino N: The diagnosis of Cushing's syndrome. Atypical presentations and laboratory shortcomings. *Arch Intern Med* 2000;160:3045-3053.
68. Castro M, Elias PC, Quidute Ar et al. Out-patient screening for Cushing's syndrome: the sensitivity of the combination of circadian rhythm and overnight dexamethasone suppression salivary cortisol tests. *JCEM* 1999; 84:878-882.
69. Raff H, Findling JW A physiologic approach to diagnosis of Cushing syndrome. *Ann Int Med* 2003; 138:980-991.
70. Taylor RL, Grebe SK, Findling JW, et al. Diagnosis of Cushing's syndrome with a sensitive and specific LC-MS/MS Method for late Night Salivary cortisol. Abstract, presented 2003 ENDO.
71. Papanicolaou DA, Mullen N, Kyrou I, et al. Nighttime salivary cortisol: A useful test for the diagnosis of Cushing's syndrome. *JCEM* 2002; 87:4515-4521.
72. Raff H, Raff JL, Findling JW. Late night salivary cortisol as a screening test for Cushing's syndrome. *JCEM* 1998; 83:2681-2686.
73. Putignano P, Dubini A, Toja P et al. Salivary cortisol measurement in normal-weight, obese and anorexic women. Comparison with plasma cortisol. *Eur J Endocrinol* 2001;145:165-171.

74. Raff H, Homar PJ, Burns EA. Comparison of two methods for measuring salivary cortisol [Letter]. *Clin Chem* 2002;48:207-8.
75. Liu H, Bravata DM, Cabacchan J, Raff H, Ryzen E. Elevated latenight salivary cortisol levels in elderly male type 2 diabetic veterans. *Clin Endocrinol* 2005;63:642-9.
76. Baid SK, Sinaii N, Wade M, Rubino D, Nieman LK. Radioimmunoassay and tandem mass spectrometry measurement of bedtime salivary cortisol levels: a comparison of assays to establish hypercortisolism. *JCEM* 2007;92:3102-7.
77. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet* 2006;367(9522):1605-17.
78. Crapo L. Cushing's syndrome: A review of diagnostic tests. *Metabolism* 1979; 28:955-977.
79. Klose M, Kofoed- Enevoldsen A, Ostergaard Kristensen L. Single determination of plasma ACTH using an immunoradiometric assay with high detectability differentiates between ACTH-dependent and independent Cushing's syndrome. *Scand J Clin Lab Invest* 2002; 62:33-37.
80. Invitti C, Giraldi FP, De Martin M et al. Diagnosis and management of Cushing's syndrome. Results of an Italian multicentre study. *JCEM* 1999; 84:440-448.
81. André Lacroix, Nina N'Diaye, Johanne Tremblay and Pavel Hamet Ectopic and Abnormal Hormone Receptors in Adrenal Cushing's Syndrome *Endocrine Reviews* 2001;22 (1): 75-110.
82. Pikkarainen L, Alfthan H, Markanken H et al. Midnight serum cortisol:comparison of healthy volunteers and hospitalized patients with Cushing's syndrome. *Scand J Clin Lab Invest* 2002;62:357-360.

83. Isidori MA, Kaltsas GA, Mohammed S, Moris DG, Jenkins P et al. Discriminatory value of the low-dose dexamethasone suppression test in establishing the diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2003; 88(11):5299–5306