

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER	iii
TABLolar	vi
1 GİRİŞ ve AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Adrenal Bezin Embriyolojisi	3
2.2 Steroidogenez	5
2.3 Adrenal Yetmezlik	7
2.3.1 Tanım	7
2.3.2 Primer adrenal yetmezlik	8
2.3.3 Sekonder adrenal yetmezlik	13
2.4 Steroid Hormon Ölçümünde Kullanılan Yöntemler	13
2.4.1 İmmunokimyasal Yöntemler	13
2.4.2 LC/MSMS	14
2.4.3 Quadropole	16
2.4.4 Steroid hormon metabolitlerinin ölçümünde LC/MSMS kullanımı	17
3 GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1 Hasta Seçimi	19
3.2 Analiz Edilen Hormonlar;	19
3.3 Kullanılan Cihaz Ve Malzemeler	19
3.4 Verilerin İstatistiksel Analizi	25
4 SONUÇLAR	26
4.1 Mineralokortikoid Yolağı	26
4.2 Glukokortikoid Yolağı	34
4.3 Androjen Yolağı	45
5 TARTIŞMA	59
6 SONUÇ	61
7 EKLER	62
8 KAYNAKLAR	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

%CV	: percent coefficient of variation
Amu	: atomic mass unit(s)
CE	: collision energy
CID	: collision-induced dissociation
CLSI	: Clinical & Laboratory Standards Institute
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	: electrospray ionization
GC	: gaz kromatografisi (gas chromatography)
HPLC	: yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IS	: internal standard
LC	: sıvı kromatografisi
LC/MSMS	: sıvı kromatografisi/sıralı kütle spektrometresi
LOQ	: limit of quantitation
m/z	: mass-to-charge ratio
MRM	: multiple reaction monitoring
MS	: kütle spektrometresi (mass spectrometry)
Q1	: quadrupole 1
Q3	: quadrupole 3
RF	: radio frequency
Rs	: çözünürlük (resolution)
S/N	: sinyal/gürültü oranı (signal-to-noise ratio)
SRM	: selected reaction monitoring
tr	: kolonda alıkonma zamanı (retention time)
17-OH progesteron	: 17-hidroksiprogesteron
17-OH pregnenolon	: 17-hidroksipregnenolon
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
DHEA-S	: Dehidroepiandrosteron

ŞEKİLLER

Şekil 1 Adrenal gelişim-prenatal ve postnatal dönem	5
Şekil 2 Steroidogenezde görevli enzimler	7
Şekil 3 Kromatografi	14
Şekil 4 LC/MSMS	15
Şekil 5 Örnek Kromatogram	15
Şekil 6 Yazılım tarafından oluşturulan kromatogram	16
Şekil 7-Quadrupole	16
Şekil 8 Progesteron değerinin yaşlara göre normalleri-kutu grafik	27
Şekil 9 Progesteron değerinin yaşlara göre normalleri-saçılım grafiği	27
Şekil 10 Progesteron değerinin yaşlara göre normalleri-saçılım grafiği-kız ve erkek	28
Şekil 11- 11 deoksikortikosteron değerinin yaşlara göre normalleri-kutu grafik	28
Şekil 12- 11 deoksikortikosteronun yaşlara göre normalleri-saçılım grafiği	29
Şekil 13- 11 deoksikortikosteronun yaşlara göre normalleri-saçılım grafiği kız ve erkek	29
Şekil 14- Kortikosteronun yaşlara göre normalleri-kutu grafik	30
Şekil 15 Kortikosteronun yaşa göre normalleri-saçılım grafiği	30
Şekil 16 Kortikosteronun yaşlara göre normalleri-saçılım grafiği-kız ve erkek	31
Şekil 17 Aldosteronun yaşa göre normalleri-kutu grafik	32
Şekil 18Aldosteronun yaşa göre normalleri-saçılım grafiği	32
Şekil 19 Aldosteronun yaşa göre normalleri-saçılım grafiği-kız ve erkek	33
Şekil 20- 17-hidroksipeogesteronun yaşa göre normalleri-kutu grafik	35
Şekil 21-17-hidroksiprogesteronun yaşa göre normalleri-saçılım grafiği	35
Şekil 22-17-hidroksiprogesteronun yaşa göre normalleri-saçılım grafiği-kız ve erkek	36
Şekil 23-21-deoksikortizolun yaşlara göre normalleri-kutu grafik	37
Şekil 24-21-deoksikortizolün yaşlara göre normalleri-saçılım grafiği	37
Şekil 25-21-deoksikortizolun yaşlara göre normalleri-saçılım grafiği-kız ve erkek	38

Şekil 26-11-deoksikortizolün yaşlara göre normalleri-kutu grafik	39
Şekil 27-11-deoksikortizolün yaşlara göre normalleri-saçılım grafiği	39
Şekil 28-11-deoksikortizolün yaşlara göre normalleri-saçılım grafiği-kız ve erkek	40
Şekil 29-Kortizolün yaşlara göre normalleri-kutu grafik	40
Şekil 30-Kortizolün yaşlara göre normalleri-saçılım grafiği	41
Şekil 31-Kortizolün yaşlara göre normalleri-saçılım grafiği-kız ve erkek	41
Şekil 32-Kortizonun yaşlara göre normalleri-kutu grafik	42
Şekil 33-Kortizonun yaşlara göre normalleri-saçılım grafiği	42
Şekil 34-Kortizonun yaşlara göre normal değerleri-saçılım grafiği-kız ve erkek	43
Şekil 35-Pregnenalonun yaşlara göre normal değerleri-kutu grafik	45
Şekil 36-Pregnenalonun yaşlara göre normal değerleri-saçılım grafiği	45
Şekil 37-Pregnenalonun yaşlara göre normal değerleri-saçılım grafiği-kız ve erkek	46
Şekil 38-17-hidroksipregnenolon yaşa göre normal değerleri-kutu grafik	47
Şekil 39-17-hidroksipregnenolon yaşla göre normal değerleri-saçılım grafiği	47
Şekil 40-17-hidroksipregnenolon yaşa göre normal değerleri-saçılım grafiği-kız ve erkek	48
Şekil 41-DHEA 'nın yaşa göre normal değerleri-kutu grafik	48
Şekil 42-DHEA'nın yaşa göre normal değerleri-saçılım grafiği	49
Şekil 43-DHEA'nın yaşa göre normal değerleri-saçılım grafiği-kız ve erkek	49
Şekil 44-DHEA-S'in yaşa göre normal değerleri-kutu grafik	50
Şekil 45-DHEA-S'in yaşa göre normal değerleri-saçılım grafiği	50
Şekil 46-DHEA-S'in yaşa göre normal değerleri-saçılım grafiği-kız ve erkek	51
Şekil 47-Androstenedionun yaşa göre normal değerleri-kutu grafik	52
Şekil 48-Androstenedionun yaşa göre normal değerleri-saçılım grafiği	52
Şekil 49-Androstenedionun yaşa göre normal değerleri-saçılım grafiği-kız ve erkek	53
Şekil 50-21-deoksikortizol ve 17-hidroksiprogesteron toplamının kortizole oranının yaşa göre normal değerleri-kutu grafik	55

Şekil 51- 11 deoksikortizolün kortizole oranının yaşa göre normal değerleri- kutu grafik	56
Şekil 52- Pregnenolon, 17-OH pregnenolon ve DHEA toplamının progesteron, 17-OH progesteron, androstenedion ve kortizol toplamına oranının yaşa göre normal değerleri-kutu grafik	57
Şekil 53- Testesteronun dihydrotestesterona oranının yaşa göre normal değerleri-kutu grafik	58



TABLÖLAR

Tablo 1 Çocuklarda adrenal yetmezlik etyolojisi	12
Tablo 2 Kullanılan internal standardlar	20
Tablo 3 Ölçülen hormonların LLOQ ve dinamik aralıkları	21
Tablo 4 Ölçülen analitlerin doğruluk ve kesinlik değerleri	22
Tablo 5 Kesinlik ve doğruluk için kullanılan konsantrasyonlar	23
Tablo 6 Ana iyon ve product iyon kütleleri ve kullanılan collision enerjisi (mV)	24
Tablo 7 Çalışmaya alınan kız ve erkeklerin yaş gruplarına göre dağılımı	26
Tablo 8 Glukokortikoidlerin yaşa göre persantil değerleri	34
Tablo 9-Mineralokortikoidlerin yaşlara göre persantil değerleri	44
Tablo 10-Androjenlerin yaşlara göre persantil değerleri	54
Tablo 11-21 hidroksiaz eksikliği için kullanılan 21-deoksikortizol ve 17- hidroksiprogesteron toplamının kortizole oranının yaşa göre persantil değerleri.....	55
Tablo 12- 11-beta hidroksilaz eksikliği için kullanılan 11-deoksikortizolün kortizole oranının yaşa göre persantil değerleri.....	56
Tablo 13- 3 BHSD eksikliğinde kullanılan pregnonolon, 17-OH pregnenolon ve DHEA toplamının progesteron, 17-OH progesteron, androstenedion ve kortizol toplamına oranının yaşa göre persantil değerleri	57
Tablo 14-5 alfa hidroksilaz eksikliği için kullanılan testesteronun dihidrotesterona oranının yaşa göre persantil değerleri	58

ÖZET

GİRİŞ: Steroid hormon metabolizmasını etkileyen bozuklukların çoğu yenidoğan veya erken süt çocukluğu döneminde tuz kaybı veya belirsiz genitalya ile bulgu verir. Bu tabloya neden olan hastalıkların tanı ve ayırıcı tanısında endojen steroid hormonların ve prekürsörlerinin ölçümü önemlidir. Fetal adrenal zon involusyonundaki farklılıklar, düşük analit konsantrasyonları, plasental ve endojen steroid hormonların interferansı bu hormonların ölçümünde ana sorunlardır. Serum steroid hormon düzeylerinin likit kromatografi kütle spektrometri (LC-MS) yöntemi ile ölçümü aynı anda birçok steroid hormonun yüksek özgünlük ve duyarlılıkta ölçümüne hızlıca imkan sağlar.

YÖNTEM VE METOD: 325 tamamen sağlıklı (152 kız,173 erkek) yenidoğan ve infanttan alınan 0.4 mL plazmada 19 steroid hormon eş zamanlı çalışıldı ve bebekler 5 farklı gruba ayrıldı (3-7, 8-14, 15-28, 29-90, 91-180. gün). Yaş gruplarına göre 2.5, 50 ve 97.5 persantil değerleri nonparametrik istatistiksel yaklaşımlar ile belirlendi. 17 Hidroksiprogesteron+21-Deoksikortizol/Kortizol, 11-Deoksikortizol/Kortizol, 17-Hidroksipregnenolon/Kortizol, Kortizol/Kortizon ve erkeklerde Testosteron/Dihidrottestosteron oranları 21-alfa Hidroksilaz, 11-beta Hidroksilaz, 3-beta Hidroksilaz, 11 -Beta hidroksisteroid dehidrojenaz-2 ve 5-alfa reduktaz eksikliğinin biomarkerları olarak hesaplandı.

DEĞERLENDİRME: LC-MS yöntemi ile eş zamanlı ölçülen 19 steroid hormonun referans değerleri sunulacaktır. 17-hidroksile C21 glukokortikodler (17 hidroksipregnenalon,17-hidroksiprogesteron ve kortizol), Non17-Hidroksile C21-mineralokortikoid öncülleri (pregnenalone ve progesteron) ve C19 androjenler (dihidroepiandrostenedion ve dihidroepiandrostenedion sülfat, androstenedion) yaşa bağlı olarak 3 ve 180 gün aralığında çok büyük değişiklikler göstermiştir. Ancak C21-mineralokortikoidler (aldosteron, kortikosteron, 11-deoksikortikosteron) hayatın ilk 6 ayında belirgin değişiklik göstermemiştir.

SONUÇ: LC-MS bazlı steroid hormon paneli ölçümü, eş zamanlı olarak birçok steroid hormon ölçümüne olanak sağladığından steroidogenez bozukluklarının tanısında en modern tanısal veriyi sağlayacaktır. Ayrıca, çalışmamızda yenidoğan ve erken süt çocukluğu dönemine ait yaşa ve cinse bağlı olarak belirlenen referans değerleri hızlıca doğru tanı konması ve ayırıcı tanı yapılması açısından büyük fayda sağlayacak, genetik danışma ve prognoz hakkında bilgi verecek ve bozulmuş steroidogenezin hayati tehdit eden sonuçlarına karşı koruyucu olacaktır.



ABSTRACT

BACKGROUND: Many of the steroidogenic disorders present in newborn or early infancy with ambiguous genitalia and/or salt- wasting. Quantification of endogenous hormonal steroids and their precursors is essential for the diagnosis and differential diagnosis of these disorders. Rapid changes in steroid hormone concentrations due to fetal adrenal zone involution, low-concentration analytes and assay interference by endogenous or placental steroids are main diagnostic challenges of this critical life period. Analysis of serum steroids by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) can provide rapid, highly specific, and sensitive simultaneous analysis of multiple steroid analytes. However, reference data from healthy newborns and infants of precise age groups are a prerequisite for correct interpretation of the results.

OBJECTIVE AND METHOD: We employed LC-MS/MS to measure a panel of 19 steroids in 0.4 mL plasma from the samples of 325 healthy full-term newborns and babies (173 males, 152 females) grouped in five age groups (3-7th, 8-14th, 15-28th, 29-90th, 91-180th days). Nonparametric statistical approaches were used to generate the mean, 2.5th-97.5th percentile distributions for age groups. 17OH-Progesterone+21-deoxycortisol)/cortisol, 11-deoxycortisol/cortisol, 17OH-pregnenolone/cortisol, cortisol/cortisone and testosterone/dihydrotestosterone (only in boys) ratios were calculated as biomarkers of 21- α -hydroxylase, 11- β -hydroxylase, 3- β -hydroxylase, 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase-2 and 5- α -reductase activities, respectively.

RESULTS: Reference intervals of 19 steroids measured simultaneously by LC-MS/MS were established. 17-hydroxylated C21-glucocorticoids (17OH-pregnenolone, 17OH-progesterone and cortisol), non-17-hydroxylated C21-mineralocorticoid precursors (pregnenolone and progesterone) and C19-androgens (dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone-sulphate, Δ 4-

androstenedione) showed most significant age-related changes over 5 (age groups) from 3 to 180 days of life. However C21-mineralocorticoids (aldosterone, corticosterone, 11-deoxycorticosterone) remained constant during the first 6 months of life. Biomarkers of 21- α -hydroxylase, 11- β -hydroxylase, 3- β -hydroxylase activities were in favor of cortisol increase.

CONCLUSION: Implementation of LC-MS/MS based steroid panel will provide a state-of-art diagnostic tool to be targeted for a variety of diseases with disordered steroidogenesis. Therefore, the establishment of age-related reference intervals for newborn babies and early infancy in this study will allow rapid, noninvasive, accurate diagnosis and differential diagnosis, guide sex assignment, genetic counseling, predicting prognoses and prevent the potential life-threatening outcomes of impaired steroidogenesis.

1 GİRİŞ ve AMAÇ

Steroid hormon sentezi vücutta temel olarak adrenal bez, gonadlar, beyin ve plasentada gerçekleşmektedir. Glukokortikoidler, mineralokortikoidler ve cinsiyet hormonları temel steroid hormonlardır. Steroid hormonlar; erken embriyolojik gelişim, cinsiyet gelişimi ve farklılaşması, sıvı-elektrolit dengesi ve vücut metabolizması gibi temel hayati fonksiyonları düzenlemektedir.

Steroid biyosentez defektleri ise hayatı tehdit eden hastalıklara yol açmaktadır.

Çoğunlukla kalıtsal ve konjenital niteliği olan bu hastalıklar genellikle yenidoğan ve erken bebeklik döneminde kliniklere başvurmaktadır.¹

Hayatı tehdit eden steroidogenez bozukluklarının en sık sebebi konjenital adrenal hiperplazidir (KAH). Otozomal resesif geçişli olan bu hastalığın insidansı dünyada ortalama olarak 1/15,000 dir. Ancak bu oran, toplumlar arasında farklılıklar göstermekte ve Eskimolarda 1/300-1/700lere kadar çıkmaktadır.² Adrenal kortekste kolesterol 8 enzim tarafından çeşitli enzimatik reaksiyonlarla mineralokortikoid, seks steroidleri ve kortizole dönüştürülür. Bu enzimatik yollardaki herhangi bir defekt, ara metabolitlerin birikimine ve yolağın sonunda elde edilecek son ürünün sentezlenememesine neden olur. Sentezlenemeyen son ürünlerin eksikliği veya biriken ara metabolitler, KAH'ın klinikteki yansımaları oluşturur.

Beslenme güçlüğü, kilo alamama, kusma, hiperkalemi, hiponatremi, dehidratasyon, metabolik asidoz, hipoglisemi ve apati , yenidoğan ve erken bebeklik döneminde sıklıkla görülen klinik bulgulardır. 21 hidroksilaz eksikliği klasik formdaki KAH'ların %90'dan fazlasının nedenidir. İkinci sıklıkla 11 hidroksilaz eksikliği saptanır. Diğer enzim defektleri daha nadir görülür.³

KAH, yenidoğan döneminde ciddi su ve tuz kaybı ve şokla sonuçlanabileceği gibi uzun yıllar hafif klinik formlarda seyrederek adolesan dönemde de bulgu verebilir. Ancak ağır formları genelde yaşamın ilk 3-4 haftasında ciddi bulgularla yaşamı tehdit eder. Tedavisi hangi enzimatik yolda defekt olduğu ve hangi son ürünlerin sentezlenemediğine bağlı olarak değişmekle birlikte ana prensip eksik olan hormonun yerine konmasıdır.

Steroidogenez bozukluklarının tek tipi KAH değildir. 5alfa redüktaz eksikliği gibi seks steroid metabolizmasını etkileyen enzim eksiklikleri de cinsiyet gelişimini etkileyebilir.

Klinik laboratuvarlarda plazmadaki steroid hormon düzeyleri immünokimyasal veya kütle spektrometresi temelli yöntemlerle ölçülebilmektedir. Kütle spektrometrik yöntemler beraberinde kromatografik bir yöntemle birlikte uygulanmaktadır. Her iki yöntemin birlikte kullanımıyla duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek metotlar geliştirilmektedir. Son yıllarda LC/MSMS yöntemi ile plazmada steroid metabolizmasındaki ara ve/veya son ürünlerinin tek bir analizle miktar tayininin yapıldığı yöntemler geliştirilmiştir.⁴

Cinsiyet gelişim bozukluklarından şüphelenildiği durumda istenen hormonal testlerde anormallik saptanması durumunda ek steroid hormon testleri, uyarı testleri, çocuklardan tekrar tekrar kan alınmasına neden olmakta, alınan kanların çalışılma zamanı ve şartları aynı olmadığından diurnal ve sirkadiyen değişim gösteren bu hormonal testlerin sonuçları bir arada değerlendirirken optimizasyon sorun oluşturmaktadır. Ayrıca immünokimyasal yöntemlerle bakılan steroid ölçümlerinde benzer yapıya sahip olan hormonların gösterdiği çapraz reaksiyon yanlış yüksek sonuçlara neden olmaktadır. İnterferans problemleri özellikle yenidoğan ve erken bebeklik döneminde adrenal bezin fetal zonunun involusyonundaki fizyolojik farklılıklar ve plasentadan geçen steroidler sebebiyle dolaşımdaki tüm steroidlerin ölçümlerinde ciddi problemlere yol açmakta ve hastaların tanı alma ve tedaviye başlanması süreçlerinde gecikmelere neden olmaktadır.⁵ Bu hastalığı taşıyan hastaların özellikle erken bebeklik döneminde kliniklere başvurdıkları düşünülürse, bu laboratuvar bazlı sorunların ve ölçümlerde yaşanan problemlerin çözülmesi kritik önem arz etmektedir.

Steroid hormon düzeylerinin belirlenmesinde kullanılabilen LC/MSMS yöntemi ile 0,5 mL plazmayla, hedeflenen çok sayıda steroid hormon, aynı anda ölçülebilmektedir. İmmünokimyasal yöntemlerde kullanılan antikorların, ölçülmek istenilen maddeye benzer yapıdaki moleküllere de çapraz reaksiyon vermesi sonucu interferanslarla karşılaşılabilir. LC/MSMS yöntemi ile hem kromatografik olarak benzer moleküller ayrılabilen hem

de sıralı kütle spektrometresinde maddelerin öncü (precursor) ve ürün (product) iyon geçişleri birlikte analiz edildiğinde özgüllüğü yüksek sonuçlar elde edilebilmektedir.⁶ Ayrıca hastalıkla ilgili olarak arttığı veya azaldığı öngörülen birkaç steroid ya da metabolitin bir arada değerlendirilmesi özellikle tanıya ve ayırıcı tanıya yaklaşımdaki sensitivite ve spesifisiteyi arttırmaktadır. Ancak bu sonuçların değerlendirilmesinde kullanılacak referans değerler tanı koymanın hayati önem taşıdığı yenidoğan ve erken bebeklik dönemi için bulunmamaktadır. Özellikle yenidoğan ve erken bebeklik dönemi, steroid hormonlar açısından kişiden kişiye ciddi değişkenlikler gösteren, plasentadan geçen ve fetal adrenal zonun yüksek steroid üretimine bağlı olarak yüksek hormon düzeylerinin saptanması nedeniyle kendine özgü bir dönemdir.

Literatürde referans değerleri belirlemek amacıyla çeşitli çalışmalar olmakla birlikte tanı koymanın hayati önem taşıdığı yenidoğan ve erken süt çocukluğu için adrenal steroidlerin tamamını bu kadar sık aralıklarla aynı anda çalışan bir çalışma yoktur. Bu nedenle bu çalışmada yenidoğan ve erken süt çocukluğu dönemini kapsayan ilk 6 ay için, on dokuz steroid hormonu eş zamanlı olarak ölçmeyi ve referans aralıklarını belirlemeyi amaçladık.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Adrenal Bezin Embriyolojisi

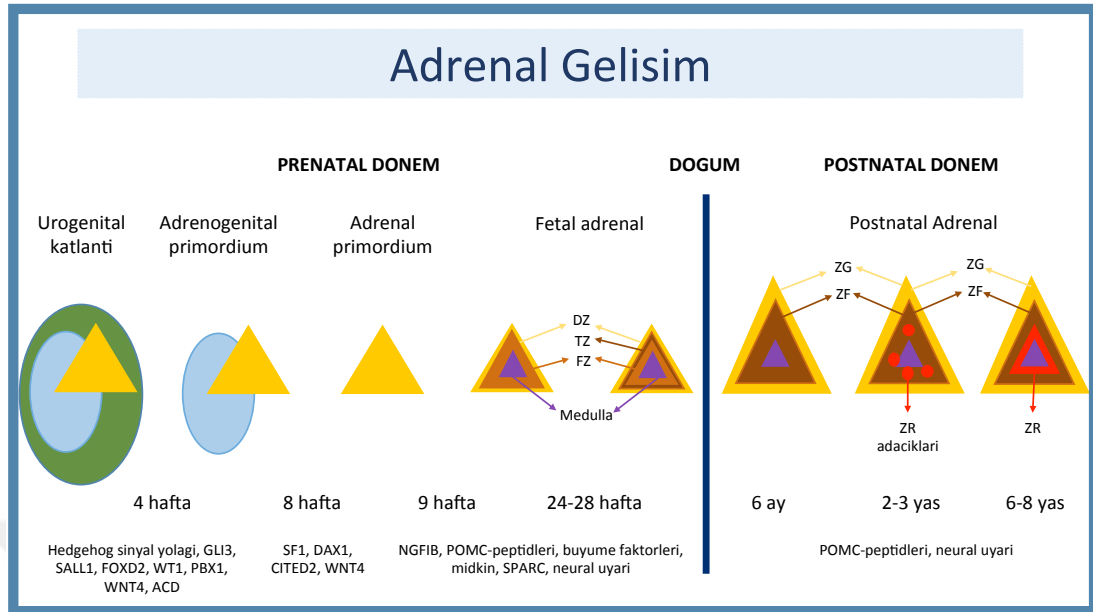
Adrenal bez , kökenleri farklı olan korteks ve medulla olarak iki bölümden oluşur. Adrenal medullayı dorsal aortadan köken alan nöral krest hücreleri oluştururken, adrenal korteks intermediate mesoderm kaynaklıdır.⁷ Mesoderm, ayrıca diğer bir steroidogenez kaynağı olan gonadların da kökenini oluşturur.

Adrenal bez, döllenme sonrası 28-30. günlerde adrenogenital primordiyum (AGP) hizasında , mezonefrozun üst kısmında belirir. Öncelikle ürogenital katlantı ve dorsal mezenter arasındaki çöломik epiteldeki bir kabarıklık şeklinde oluşur. 8. Hafta civarında adrenal korteksi oluşturacak hücreler, mezonefrozun üst kısmına göç eder ve primitif adrenal gland

oluşur. Oluşan bu ilk tabaka, büyük sitoplazmalı eozinofilik hücrelerden oluşan fetal zon (FZ) dur. Fetal zon, CYP 11A ve 17 Hidroksilaz enzimlerini içerir ancak 3 beta hidroksi steroid dehidrojenaz içermediği için bu dönemde DHEA ve DHEA-S üretiminin başlıca merkezidir. Bu iki hormon, plasenta tarafından sentezlenen estradiolün prekürsörüdür ve gebeliğin devamı için oldukça önemlidir. Kısa bir süre sonra dış kısımda yoğun bir şekilde paketlenmiş, lipitten fakir hücrelerden oluşan bir tabaka daha oluşur. Bu tabaka definitive zon (DZ) olarak adlandırılır. Bu iki tabaka arasında ise transient zon (TZ) bulunur. Eş zamanlı olarak adrenal gland kapsülle kaplanır ve dorsal aorta hizasındaki nöral krest hücreleri adrenal primordiyuma göç eder. Nöral krestten göç eden hücreler, korteksten salınan glukokortikoidlerin de etkisi ile katekolamin salgılayan kromaffin hücrelere dönüşür ve hücre adacıkları şeklinde varlığını sürdürür.⁸ Kapsül yapısı oluşuktan sonra fetal adrenal korteks hızla genişlemeye başlar.

Doğum sonrası adrenal remodelling gelişir. Fetal zon, postnatal 3.aya kadar apoptoz ile regrese olur , DZ ve TZ ise erişkin adrenalini oluşturur. Günümüzde adrenal bezin gelişimine dair en çok kabul gören bu teoriye göre, DZ zona glomerulosayı, TZ ise zona fasciculatayı oluşturur. Postnatal dönemde regrese olan FZ artıkları ise adolesan dönemde organize olarak zona reticularisi oluşturur. İşte zona reticularis, adrenal androjenlerin ana kaynağıdır.⁵

Adrenal glandın gelişiminde çeşitli faktörler rol oynar. İnsanlarda adrenal hipoplazi ile ilişkili 3 transkripsiyon faktörü mevcuttur. Steroidogenik factor-1 (SF-1; NR5A1), DAX-1 (Dosage sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenital, X kromozomu) ve GLI3 onkogeni. SF-1, 9q33 üzerinde kodlanır ve eksikliğinde hipofizer gonadotrop eksikliği ve ventral medial hipotalamusun az gelişmesine bağlı olarak gonadal ve çoğunlukla da adrenal agenezi gelişir. Xp21 de kodlanan DAX-1 mutasyonu ise benzer şekilde konjenital adrenal hipoplazi ve hipogonadotroik hipogonadizm ile sonuçlanır. GLI3 onkogeni 7p13 üzerinde kodlanır ve hipotalamik hamartom hipopituitarizm, imperfore anüs ve postaksiyal polidaktili ile karakterize Pallister Hall Sendromu ile sonuçlanır⁹



Şekil 1 Adrenal gelişim-prenatal ve postnatal dönem

2.2 Steroidogenez

Kolesterolden biyolojik olarak aktif steroid hormonların sentezlenmesine steroidogenesis denir ve sitokrom P450 enzimi taşıyan tüm hücreler steroid hormon sentezleme yetisine sahiptir. İnsanlarda adrenal korteks, testisin Leydig hücreleri, overin granulosa ve teka hücreleri ve plasantanın sinsisyotrofoblastları steroid hormon sentezleyebilir. Yağ doku ve cilt, steroid hormonların dönüşümünü sağlasa da bu yapılar sitokrom P450 enzimi içermez ve bu dönüşüm steroid hormon sentezi olarak kabul edilmez.¹⁰

Steroidogenesis dinamik bir süreçtir. Erişkin adrenalinde zona glomerulosa(ZG), zona fasciculata (ZF) ve zona reticularis (ZR) aldosteron kortizol ve DHEA/DHEA-S sentezinden sorumludur. Bazı enzimler ve kofaktörleri adrenalın tüm tabakalarında ortak olsa da , zon spesifik enzimler sadece kendi tabakalarında sentezlenir Böylece zonlara spesifik steroid hormonların sentezi gerçekleşmiş olur.

Steroidogenezde görevli enzimler iki gruba ayrılır: sitokrom P450 enzimleri (CYP450) ve hidroksisteroid dehidrogenaz enzimleri(HSD) . CYP enzimleri hem halkası içeren oksidatif enzimlerdir ve hücre içinde bulundukları yere göre mitokondriyal (tip1) ve endoplazmik retikulum (tip2) olarak sınıflandırılır. Steroidogenezde yer alan CYP enzimlerinden P450 scc,

11 hidroksilaz ve aldosteron sentaz tip1 iken 17 hidroksilaz/17-20 liyaz, 21 hidroksilaz ve aromataz enzimleri tip 2 dir. HSD enzimleri ise kısa zincirli dehidrojenaz/redüktaz (SDR) ve aldo/ketoreduktaz(AKR) olarak ikiye ayrılır. ¹⁰

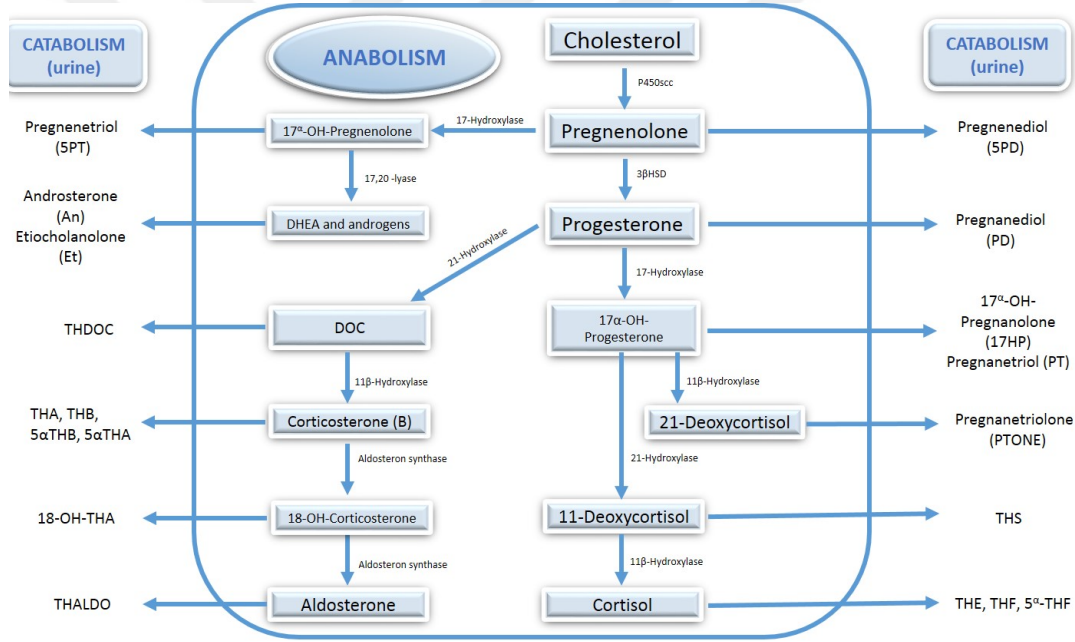
Tüm steroid hormonlar kolesterolden sentezlenir. Dolaşımda bulunan ve yüksek miktarda kolesterol içeren LDL, adrenal korteks hücresine endositozla alınır. Ardından lizozomlarla birleşen veziküllerden kolesterol serbestleştirilir. Bu basamak ACTH ile düzenlenir. Kanda artan ACTH, LDL reseptör sayısını ve LDL' den kolesterolün serbestleşmesini sağlayan enzimleri aktive eder.¹¹. Hücre içerisine giren kolesterolün mitokondriye taşınması gereklidir. Bu aşamada StaR (steroid acute regulatuar protein) kolesterolün dış mitokondri membranından iç mitokondri membranına geçişini sağlar.¹² Mitokondrinin içerisinde CYP11A1 ile kolesterol pregnenolona dönüştürülür. Bu aşama steroidogenezin hız kısıtlayıcı aşamasıdır.

Aldosesteron sentezi: ZG'da pregnenolondan , 3 BHSD enzimi ile progesteron sentezlenir. Bu enzim irreversibl olarak hidroksil grubunu keto grubuna dönüştürür. Ardından CYP21A2 (21 hidroksilaz) enzimi ile progesteron, 11 deoksikortizona çevirilir. Son olarak da 11 beta hidroksilaz, 18 hidroksilaz ve 18 HSD in katalize ettiği bu 3 basamaklı enzimatik reaksiyonla 11 deoksi kortizolden aldosteron sentezlenir. ZG tabakası aldosteron sentezi için özelleşmiştir. Bu tabaka 11 hidroksilazı içeren tek tabakadır. Minimal düzeyde 17 hidroksilaz/17-20 liyaz enzimi içerir. Aldosteron sentezinin başlıca uyarıcısı ekstraselüler potasyum ve anjiyotensin 2 dir. ¹²

Kortizol sentezi: Kortizol sentezi ZF'da gerçekleşir ve ACTH' nın kontrolü altındadır. CYP17A1 enzimi, pregnenolon ve progesteronun 17 hidroksilasyonunu sağlar. 17 hidroksiprogesteron, 21 hidroksilazla 11 deoksikortizole dönüşür. Son olarak da 11 deoksikortizol, CYP11A1 enzimi ile kortizole dönüştürülür.

Androjen sentezi: C19 steroidlerin başlıca sentez yeri zona reticularistir. Pregnenalondan DHEA ve Progesterondan Androstenedion

sentezi için gerekli olan tek enzim CYP17A1'dir. Bu enzim ZF ve ZR'de bulunmakla birlikte bu enzimin bir komponenti olan ve 17 hidroksisteroidlerden DHEA ve Androstenedion sentezlenmesini sağlayan 17,20 liyaz aktivitesini arttıran kofaktör olan sitokrom b5 sadece ZR tabakasında bulunur.¹³ Bu nedenledir ki androjen sentezi başlıca ZR'de gerçekleşir. Sentezlenen Dehidroepiandrosterone (DHEA) ve sulfotransferazla onun konjugasyonundan sentezlenen Dehidroepiandosteron sülfat (DHEA-S) başlıca adrenal androjenlerdir. ZR'de androjen sentezi başlıca ACTH'nın kontrolündedir. Androjen sentezini etkileyen başka büyüme faktörleri olduğu bilinse de bunun mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır.¹²



Şekil 2 Steroidogeneze görevli enzimler

2.3 Adrenal Yetmezlik

2.3.1 Tanım

Adrenal yetmezlik, adrenal korteks tarafından sentezlenen başta kortizol olmak üzere steroid hormonların sentezlenememesi olarak tanımlanır ve oldukça heterojen bir grup hastalıktır.¹⁴ Patoloji adrenal bez kaynaklı ise primer, hipotalamo-hipofizer aks kaynaklı ise sekonder olarak sınıflandırılır.

Primer ve sekonder adrenal yetmezlik arasındaki en önemli farklardan biri primerde kortizol salınımının yanında mineralokortikoid sentezinin de bozulması iken sekonder formda bu fonksiyon korunmuştur. Adrenal yetmezlik geç tanı konulduğunda ölümle sonuçlanabilen acil bir durumdur.¹⁵

Geçtiğimiz yıllarda genetik alanındaki gelişmelerle adrenal yetmezliğe neden olan genlerin tanımlanma oranı artmış, hastalıkların genetik temelini anlamak ise bireyselleştirilmiş tedavilerin önünü açmıştır.

2.3.2 Primer adrenal yetmezlik

Çocukluk çağında primer adrenal yetmezliğin en sık nedeni Konjenital adrenal hiperplazidir. Daha sonraki yaşlarda otoimmün nedenli bez destrüksiyonu en sık neden haline gelir. Bunların yanı sıra ACTH direnci, adrenal bezin gelişim sorunları da çocuklarda adrenal yetmezlik nedeni olabilir.¹⁶

Primer adrenal yetmezlik nedeni olan başlıca durumlar tablo 1 de özetlenmiştir.

DURUM/EKSİKLİK	Gen	İlişkili semptomlar ve hastalıklar
1- Steroidogenez bozuklukları		
Bozulmuş kolesterol transport		
Steroidogenic Acute Regulatory Protein (Konjenital lipoid adrenal hiperplazi)	<i>StAR</i>	46, XY CGB gonadal yetmezlik
Konjenital adrenal hiperplaziye neden olan enzim veya kofaktör eksikliği		
21 α -hidroksilaz eksikliği	<i>CYP21A2</i>	46, XX CGB, hiperandrojenizm
11 β -hidroksilaz eksikliği	<i>CYP11B1</i>	46, XX CGB, hiperandrojenizm, arteriyel hipertansiyon
17 α -hidroksilaz eksikliği	<i>CYP17A1</i>	46, XY CGB, arteriyel hipertansiyon, gonadal yetmezlik
P450 oksidoredüktaz eksikliği	<i>POR</i>	46, XX and 46, XY CGB, gonadal yetmezlik, kemik malformasyonları, tüm CYP450 enzim sistemini etkiler
3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz eksikliği	<i>HSD3B2</i>	46, XX and 46, XY CGB, kadında hiperandrojenizm
P450 side-chain cleavage enzyme (P450scc)	<i>CYP11A1</i>	46, XY CGB, gonadal yetmezlik
Kolesterol sentez veya metabolizmasında defektler		
Smith Lemli Opitz Sendromu	<i>DHCR7</i>	Mental retardasyon, büyüme geriliği, kraniyofasyal anomaliler
Abetalipoproteinemi	<i>MTTP</i>	Ataksi, retinopati, akantositoz, yağ malabsorbsiyonu
Familiyal hiperkolesterolemi	<i>LDLR</i>	Tendon ksantomları, ksantelesma, korneal arkus
Sitosterolemi (Fitosterolemia)	<i>ABCG5</i> <i>ABCG8</i>	Kısa boy, gonadal yetmezlik, ksantomlar, hemolitik anemi, artrit, artmış ateroskleroz ve prematur kardiyak ölüm
2- Adrenal Disgenezi/Hipoplazi		
Sendromik olmayan		
X'e bağlı konjenital Adrenal Hipoplazi (AHC)	<i>NR0B1</i> (DAX1)	Erkeklerde hipogonadotropik hipogonadizm. Bazı vakalarda gonadotropin bağımsız puberte prekoks
Xp21komşu gen delesyon sendromu	Duchenne Muskuler distrofi, Gliserol Kinaz ve <i>NR0B1</i> gen delesyonu	Duchenne muskuler distrofi, gliserol kinaz gen delesyonu, psikomotor retardasyon (eğer delesyon <i>IL1RAPL1</i> genini de kapsıyorsa)
Adrenal hipoplazi steroidogenik factor-1 eksikliği	<i>NR5A1</i> (SF1)	46, XY ve 46, XX CGB, primer ovaryan yetmezlik, spermatogenik yetmezlik

Sendromlarla ilişkili		
IMAGE sendromu	<i>CDKN1C</i>	İntrauterin gelişme geriliği, metafizyal displazi, adrenal yetmezlik, genital anomaliler
MIRAGE sendromu	<i>SAMD9</i>	Miyelodiplazi, infeksiyon, büyüme geriliği, adrenal hipoplazi, genital fenotipler and ve enteropati
Pallister-Hall sendromu	<i>GLI3</i>	Hipotalamik hamartoblastom, hipopituitarizm, imperfore anus, mesoaksiyal ve postaksiyal polidaktili, laringotrakeal kleft, bifid epiglottis
Meckel Sendromu	<i>MKSI</i>	Oksipital ensefalosel, polikistik böbrek, hepatic fibrosis, polidaktili
Pena-Shokeir sendromu 1	<i>DOK7</i>	Artrogripozis, fetal akinezi, IUGR, kistik higroma, pulmoner hipoplazi, karpodaktili, polihidroamniyos, intestinal malrotasyon
Psödotrizomi 13	<i>RAPSN</i>	Holoprosensefali, fasyal anomaliler, postaksiyal polidaktili
Hidroletharus Sendromu	<i>HYLS1</i>	Prenatal başlangıçlı şiddetli hidrosefali, polidaktili, mikrogati, genital anomaliler, konjenital kalp hastalığı ve pulmoner defektler
Galloway-Mowat sendromu	<i>WDR73</i>	Erken başlangıçlı ensefalopati, şiddetli epilepsi, nefrotik sendrom, mikrosefali, hiatal herni
Kromozomal anomaliler	Tetraploidi triploidi, trisomi18, trisomi 21, 5p dup, ve 11q sendrom	Çoğunlukla merkezi sinir sistemi anomalileri ve prenatal başlangıçlı büyüme geriliği ile ilişkili
3- ACTH direnci		
Ailesel glukokortikoid direnci (FGD) Tip 1	<i>MC2R</i>	Genellikle izole glukokortikoid eksikliği, mineralokortikoidler normal, uzun boy, subklinik hipotiroidi, frontal bossing, hipertelorizm, mediyal epikantus gibi karakteristik yüz şekli
Ailesel glukokortikoid eksikliği (FGD) Tip 2	<i>MRAP</i>	Genellikle izole glukokortikoid eksikliği
4- Adrenal Destruksiyon		
Bozulmuş Redox Homeostazis		
Nukleer kılıf defektleri		
Triple A sendromu (Allgrove sendromu)	<i>AAAS</i>	Alakrima, akalazya, bozulmuş otonomik sistem; ek olarak nörolojik bozukluklar, sağırılık, hiperkeratozis ve mental retardasyon

Mitokondriyal defektler		
Nikotinamid Nukleotid Transhidrojenaz eksikliği	<i>NNT</i>	<i>Genellikle</i> izole glukokortikoid eksikliği, subklinik hipotiroidi, insulin bağımlı diyabetes mellitus
Tioredoksin reduktaz eksikliği	<i>TXNRD2</i>	Izole glukokortikoid eksikliği
Glutasyon peroksidaz eksikliği+ peroksiredoksin eksikliği	<i>GPX1</i> + <i>PRDX3</i>	Her iki gende homozigot defekt olan tek bir hasta tanımlanmış.
Kompleks lipid metabolizması defektleri		
<i>a) Peroksizomal defektler</i>		
X'e bağlı adrenolökodistrofi (X-ALD)	<i>ABCD1</i> <i>ABCD2</i>	Progresif nörodejeneratif kognitif ve davranışsal değişiklikler, progresif işitme ve görme kaybı, demans, spastisite, nöbet
Neonatal Adrenolökodistrofi (Otozomal resesif)	<i>PEX1</i>	Şiddetli hipotoni, nöbet ve ensefalopati, körlük ve sağırılık, hepatic disfonksiyon, peroksizomal agenezi
Zellweger sendromu	<i>PEX1</i> , 2, 3, 5, 6, 12, 14, 26	Şiddetli nöromotor ve büyüme geriliği, hipotoni, körlük, sağırılık, kraniofasyal anomaliler, hepatomegali, Down fenotipi
Refsum hastalığı	<i>PHYH</i> , <i>PEX7</i>	Multipl epifiz displazisi, kardiyomyopati, anosmia, retinitis pigmentosa, nöropati, sağırılık, iktiyozis
<i>b) Lizozomal defektler</i>		
Wolman hastalığı	<i>LIPA</i>	Diffuz punktat adrenal kalsifikasyon, karaciğerde ksantamatoz değişiklikler, adrenal, dalak, lenf nodu, kemik iliği, timus, akciğer, retina, merkezi sinir sisteminde değişiklikler
<i>c) Endoplazmik retikulum defektleri</i>		
Sfingozin-1 fosfat liyaz eksikliği	<i>SGPL1</i>	Steroid dirençli nefrotik sendrom, iktiyozis, lenfopeni, nörolojik bozukluklar, primer hipotiroidi, kriptoorşidizm
Otoimmün Yıkım		
Izole otoimmün adrenalit	<i>CLTA-4</i> , <i>HLA-DR3</i> , <i>HLA-DR4</i> , <i>HLA-B8</i> <i>BACH2</i> ile ilişkili	
Otoimmün poliglanduler sendromlar (APS)		
APS Tip 1	<i>AIRE</i>	Kronik mukokutanöz kandidiyazis, hipoparatiroidizm, diğer otoimmün hastalıklar, nadiren lenfomalar
APS Tip2	<i>HLA-DR3</i> ,	Hipotiroidi, hipertiroidi, premature

	CTLA-4 ilişkili	ovaryan yetmezlik, vitiligo, tip1 diyabetes mellitus, pernisiyöz anemi
APS Tip 4	HLA-DR3, CTLA-4 <i>BACH2 ile ilişkili</i>	Diğer otoimmün hastalıklar, tiroid hastalıkları ve diyabet dışında (çocukta nadir)
5- Diğer		
DNA onarım bozuklukları	<i>MCM4</i> [¶]	Natural killer hücre eksikliği, kısa boy, mikrosefali, tekrarlayan viral enfeksiyonlar, kromozomal kırıklar
Bioinaktif ACTH	<i>POMC</i>	POMC eksikliği belirti ve bulguları, kırmızı saç, yüksek ACTH ve düşük kortizol.
Mitokondriyal hastalıklar		
Kearns-Sayre sendromu	<i>MTTL1</i>	Progresif eksternal oftalmopleji, ptosis, retinal dejenerasyon ve kardiak ileti defektleri, mikrosefali ve diğer endokrinopatiler, kaslarda ragged red fiber görülebilir
Mitokondrial DNA polimeraz eksikliği	<i>POLG1</i>	İnfanıl epilepsi, metabolik inme, kronik ataksi, oftalmopleji, hipotiroidizm ve tip2 diyabetes mellitus
Bozulmuş mitokondriyal düzenleyici sistem	<i>GFER</i>	Ensefalomyopati, konjenital katarakt, hipotoni, gelişme geriliği, sensorinöral işitme kaybı, laktik asidoz, solunum bozuklukları
MELAS sendromu	<i>MTTL1, MTTQ, MTH, MTK, MTC, MTTS1-2, MTND1,5,6</i>	<u>M</u> itokondriyal miyopati, <u>e</u> nsefaopati, <u>l</u> aktik <u>a</u> sidoz, <u>s</u> troke (inme)
Bozulmuş translasyon	<i>MRPS7, QRSL1</i>	Sensorinöral işitme kaybı, primer ovaryan yetmezlik, progresif karaciğer ve böbrek yetmezliği, laktik asidoz
Pearson sendromu	Delesyon/ duplikasyon	Düşük doğum ağırlığı, büyüme geriliği, sideroblastik anemi, ekzokrin pankreas yetmezliği

Tablo 1 Çocuklarda adrenal yetmezlik etyolojisi

2.3.3 Sekonder adrenal yetmezlik

Çocuklarda sekonder adrenal yetmezliğin en sık nedeni eksojen steroid kullanımının ani kesilmesidir. Bunun dışında hipotalamo hipofizer tümörler de sekonder adrenal yetmezlik nedeni olabilir.

2.4 Steroid Hormon Ölçümünde Kullanılan Yöntemler

Günümüzde steroid hormon ve metabolitlerinin ölçümünde immünokimyasal, ve kütle spektrometrik yöntemler kullanılmaktadır. Son yıllarda steroid hormon ve metabolitlerinin ölçümünde, kromatografik yöntemlerin kütle spektrometresi ile birlikte kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır.¹⁷

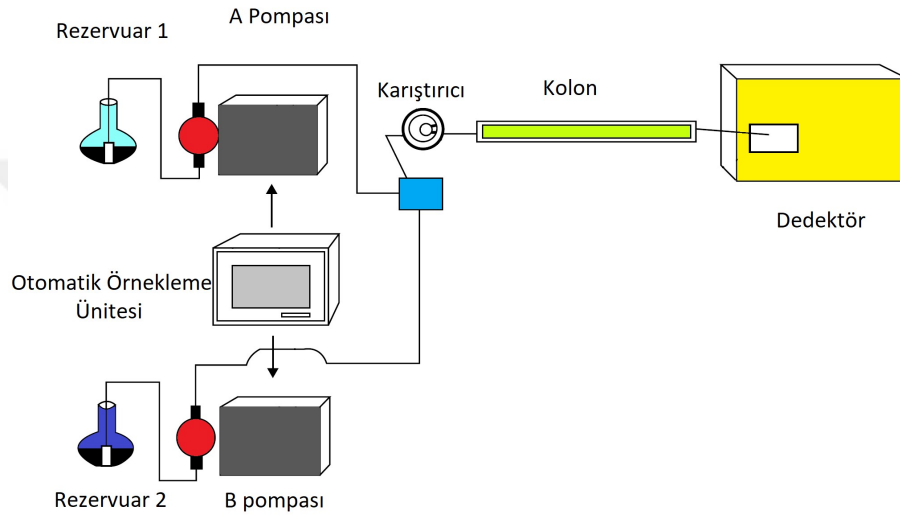
2.4.1 İmmünokimyasal Yöntemler

Steroid ölçümünde uzun yıllardır kullanılan immünokimyasal yöntemler, ölçümü yapılmak istenen moleküle karşı geliştirilen antikorların ölçümü yapılacak madde (antijen) ile birleşmesi esasına dayanır. Bu yöntemde steroid hormonlar bağlı oldukları steroid bağlayıcı proteinlerden ayrıştırıldıktan sonra ölçülmek istenen hormona özgü antikorlar ile antijen antikor kompleksi oluşur. Yine aynı moleküle özgü fakat molekülün farklı bir epitopuna bağlanan işaretli antikorlar ortama eklenir. Plazmanın yıkanması ile antijene bağlanmayan işaretli antikorlar ortamdan uzaklaştırılır. Antikor işaretleyicisi olarak kullanılan enzim veya kemilüminesans maddeler aracılığıyla miktar tayini gerçekleştirilir. ¹⁸ LC/MSMS yöntemi ile karşılaştırıldığında immünokimyasal yöntemlerin; ön hazırlık işlemi yapılmadan serum veya plazma örneklerinde hızlı bir şekilde sonuç üretmeleri, aynı anda birden fazla hasta örneğinin analiz edilebilmesi, aynı anda farklı birçok testin analizine imkan vermesi gibi avantajları bulunmaktadır. Bununla birlikte duyarlılıklarının düşük olması, ölçüm aralığının dar olması, yapıları birbirine çok benzer olan steroid hormon metabolitlerinin interferansı immünokimyasal yöntemlerin dezavantajlarıdır.

2.4.2 LC/MSMS

LC ile ölçülmek istenen analitler, kolon üzerinde sabit faz (hareketsiz ortam) ve mobil faz (kolonda akan solvent) arasındaki alıkonma dengesine göre ayrılır.¹⁹

Kolona maddelerin pozitif bir basınçta pompalanması ve kesintisiz bir mobil akış sağlanması ile yüksek performanslı likit kromatografi (HPLC) yöntemi elde edilmiş olur.



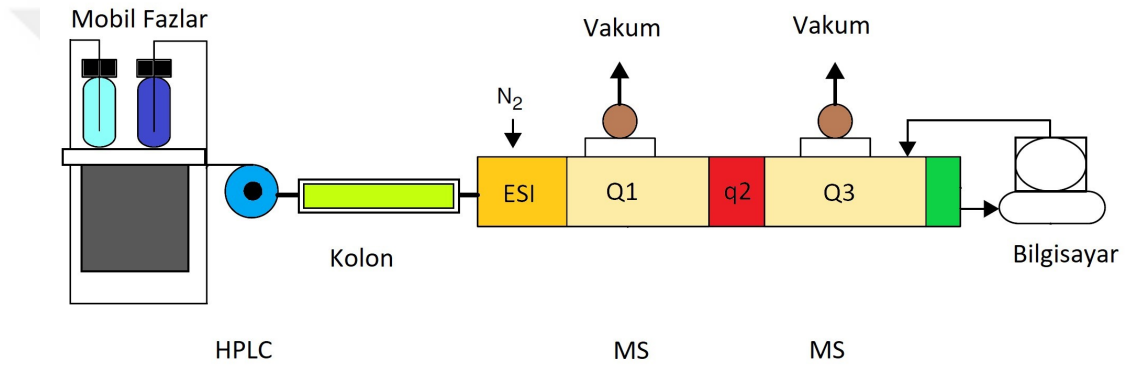
Şekil 3 Kromatografi

Kütle spektrometri (MS) ise bir iyonu, kütle/yük oranına (m/z) göre diğer iyonlardan ayıran bir tekniktir. Ölçülmek istenen karışım, MS'in iyon kaynağında iyonlaştırıldıktan sonra iyonların kütle/yük oranlarına (m/z) göre seçildiği MS'in quadripole bölümüne girer. Ölçülmek istenen iyon bu alanda ortama verilen voltaj sayesinde ilerletilerek dedektörde ölçülür. MS, HPLC ile kombine edildiğinde ölçülmek istenen analitin ölçüldüğü dedektör görevini görür.²⁰

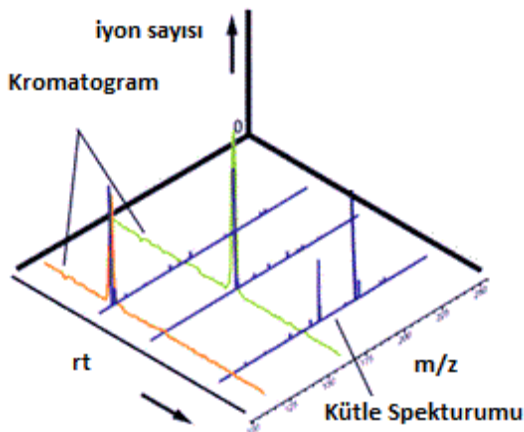
MS'de bir maddeyi ölçebilmek için iyonlaştırılmış olması gerekmektedir. Bunun için değişik teknikler kullanılır. Elektrospray iyonizasyon (ESI), klinik laboratuvarlarda MS'de sıkça kullanılan, iyonizasyon tekniklerinden biridir.. Bu teknikte, HPLC'de ayrılan maddeler, yüksek gerilim potansiyelinin uygulandığı kapillere aktarılır ve burada çoğunlukla azot gazı ile püskürtülür. İyon kaynağında iyonlaştırılırken aynı

zamanda uygulanan yüksek sıcaklığın etkisi ile ölçülen solvent sıvı fazdan gaz hale geçer.²⁰

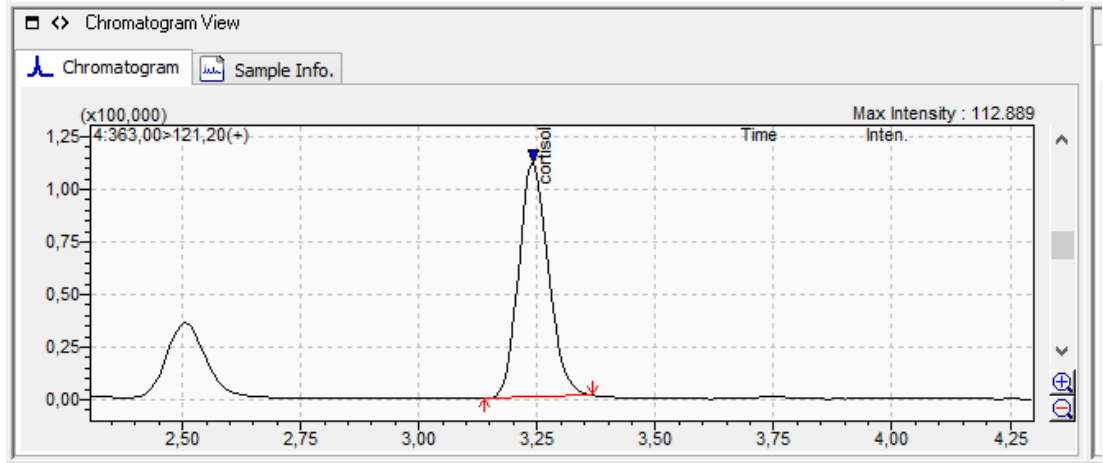
HPLC ile mobil faz aracılığıyla kolandan geçip, iyon kaynağında iyonlaştırılıp, m/z oranına göre bir veya birden fazla quadrupole'de seçilen iyonlar; vakum uygulanan bir yolu takip ederek detektöre ulaşır (Şekil 4). Detektörden alınan sinyaller; x-ekseni üzerinde, iyonun kolonda alıkonma zamanının [retention time (rt)], y ekseninde ise detektöre ulaştırılan iyon sayısının gösterildiği grafik (kromatogram), LC/MSMS yazılımı tarafından oluşturulur (Şekil 5).



Şekil 4 LC/MSMS



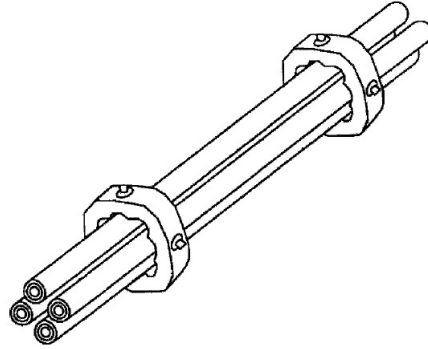
Şekil 5 Örnek Kromatogram



Şekil 6 Yazılım tarafından oluşturulan kromatogram

2.4.3 Quadrupole

Quadrupole, ortasında bir boşluk bulunan, paralel düzenlenmiş dört iletken çubuk setidir. Çubuklara Uygulanan voltajlar sürekli olarak değiştirilerek birden fazla moleküle ait m/z değeri taranabilir.



Şekil 7-Quadrupole

MS de bir veya daha fazla quadrupole kullanılabilir. Tek quadrupole kullanıldığında sadece ana kütle ölçülür bu nedenle yöntemin özgüllüğü düşüktür.. Birden fazla quadrupole kullanıldığında iyonlaşan maddeler sadece ana kütlelerine göre ayrılmaz. İlk quadrupolede analitlerin ana iyonları filtrelenir. Ardından çarpışma hücresi de denen q2 alanında , çarpışmayla indüklenen ayrılma (collision induced dissociation) olarak bilinen süreç gerçekleşir ve Argon gazı kullanarak ana iyon parçalanarak ürün iyon açığa çıkarılır. Oluşan ürün iyon ikinci bir quadrupoleden (Q3) geçirilir. Böylece

sadece belirlenmiş öncü ve ürün iyon geçişine izin verilerek ölçülmek istenen molekül daha özgül olarak ölçülür.

MS detektörüne ulaşan veriler tek bir analitin iyon geçişi için toplandığında bu moda “selected reaction monitoring (SRM)” adı verilirken; birden fazla analit aynı anda ölçüldüğünde ise bu moda, “multiple reaction monitoring (MRM)” denilir. SRM kullanımı duyarlılığı ve sinyal tekrarlanabilirliğini artırır, çünkü tüm geçiş zamanlarında cihaz yalnızca tek bir maddeye odaklanır.

2.4.4 Steroid hormon metabolitlerinin ölçümünde LC/MSMS kullanımı

Steroid hormon ölçümünde LC/MSMS yöntemleri referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Hem kromatografi hem de kütle spektrometresi tekniğinin kombinasyonunun kullanılması analiz duyarlılığı ve özgüllüğünü artırmaktadır. İmmünoassay yöntemlerde olduğu gibi tek bir madde değil birden çok steroid hormon aynı anda ölçülebilmektedir. Gelişen kromatografi ve kütle spektrometresi teknolojisiyle daha kısa örnek hazırlığı ve analiz süresi ile miktarı çok düşük olan steroid metabolitlerinin dahi tayini mümkün olmaktadır.

Avantajları

- Duyarlılığının ve özgüllüğünün yüksek olması
- Tek bir analizde birden fazla analitin ölçülebilmesi
- Ölçülecek analitin izotopunun (internal standart) miktar tayini hesabında kullanılması nedeniyle daha doğru sonuçlar elde edilmesi
- Kantitatif analiz için referans ölçüm yöntemi olarak kabul edilmesi
- İnterferansların daha az olması

Dezavantajları

- Karmaşık bir yöntem olması nedeniyle standardizasyonu zor
- Otomasyona uygun değil
- Uzun bir örnek hazırlama süresi mevcut
- Cihazı kullanabilmek için uzun süreli eğitimlerin gerekmesi
- Cihaz ve teknik servis maliyetinin yüksek olması

-Analizlerin doğruluğu için gerekli internal standartların piyasada bulunamayabilmesi, temininin zor olması veya maliyetlerinin yüksek olması



3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Hasta Seçimi

Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Sosyal Pediatri Bilim Dalı ve Yenidoğan Bilim Dalı polikliniklerine gelen 3 gün ile 6 ay arasındaki bebekler prospektif olarak çalışmaya alındı. Bebekler term ve AGA bebeklerdi ve yapılan ayrıntılı fizik muayenelerinde patolojik bulgu yoktu. Gebelik sırasında annesi steroid hormon kullanan bebekler, prematüre bebekler, o anda ciddi bir hastalığı olan bebekler çalışmaya alınmadı.

Kan almak için bebeklerin birinci derece yakınlarından aydınlatılmış onam alındı. Çalışma protokolü Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı. (Protokol no: 09.2016.34, Tarih: Nisan 2016) (Ek 1).

Yaş grupları 3-7 gün, 8-14 gün, 15-28 gün, 29-90 gün ve 91-180 gün olarak belirlendi. 1 yıl süresince her yaş grubundan 30 kız 30 erkek olmak üzere toplamda 300 bebekten kan alınması hedeflendi. Referans değerlerin oluşturulması sırasında standardizasyon amacı ile sabah 08:00-10:00 aralığında EDTA'lı tüpe kan alındı.

Kanlar alındıktan sonra santrifüj edilerek -20 derecede saklandı. Çalışma üç ayrı günde aynı kişiler tarafından aynı koşullarda gerçekleştirildi. Plazma örneklerinde adrenal bez tarafından salınan 19 steroid hormon eş zamanlı olarak LC-MS yöntemi ile çalışıldı.

3.2 Analiz Edilen Hormonlar;

Pregnenolon, 17-OH pregnenolone, Progesteron, 17-OH progesterone, Kortikosteron, Aldosteron, 11 deoksikortizol, Kortizol, Dihidroepiandrosteron (DHEA), dihidroepiandrosteron sülfat (DHEA-S), Androstenedion, Estrone, estradiol, Testesteron, 21 deoksikortizol, Kortizon, Androsteron, 11 deoksikortikosteron, Dihidrottestesteron.

3.3 Kullanılan Cihaz Ve Malzemeler

Çalışmamızda LC-MS/MS 8050 Schimadzu, Japan) cihazı kullanıldı. Analizlerde S.r.l Steroid hormon kiti. (Eureka Lab Division, Italy) kullanıldı Plazma örnekleri internal standardlar içeren reaktifler kullanılarak

ekstraksiyon işleminden sonra LC/MSMS ile analiz edildi. Her plazma örneğine , kalibratör ve kontrol materyaline mineralokortikoid, glukokortikoid ve androjen ölçümü sırasında üç internal standard eklendi: aldosterone (aldo d 7), cortisol (corti d4), testosterone (testo d3) . HPLC metodu için Eclipse Plus C18 kolon (50x2.1 mm, 1.8 um) kullanıldı .Analiz süresi 15 dakika idi. Pozitif mod elektrosprey iyonizasyon kullanıldı ve her hormon için Precursor ve product iyonlar ölçüldü ve her hormon için iki MRM zamanı kaydedildi.

Tabloda kullanılan internal standartları ve kalibrasyonu için kullanıldıkları hormonları görmekteyiz.

Solusyon içeriği: Aldosterone-d7, Cortisol-d4, Testosterone-d3	
Hormonlar:	Kalibrasyon için kullanılan internal standartlar
ANDROSTENEDIONE	Testosterone-d3
DHEAS	Testosterone-d3
DHEA	Testosterone-d3
TESTOSTERONE	Testosterone-d3
DIHYDROTESTOSTERONE	Testosterone-d3
ANDROSTERONE	Testosterone-d3
ESTRONE	Testosterone-d3
ESTRADIOL	Testosterone-d3
PROGESTERONE	Aldosterone-d7
11-DEOXYCORTICOSTERONE	Aldosterone-d7
CORTICOSTERONE	Aldosterone-d7
ALDOSTERONE	Aldosterone-d7
11-DEOXYCORTISOL	Cortisol-d4
PREGNENOLONE	Cortisol-d4
17-OH-PREGNENOLONE	Cortisol-d4
CORTISOL	Cortisol-d4
17-OH-PROGESTERONE	Cortisol-d4

Tablo 2 Kullanılan internal standartlar

Kullandığımız kite ait firmanın belirlediği sensitivite değerleri ve ölçüm yapılabilen dinamik aralıklar tabloda belirtilmiştir. LLOQ değerleri firmanın verilere göre 0.001 ng/ml (Androsteron) ile 0.6 ng/ml (DHEA-S) arasında değişmekteydi.

	LLOQ	Dinamik aralıklar
17-OH-Progesterone	0,015 ng/ml	0,015-125 ng/ml
Androstenedione	0,003 ng/ml	0,003-100 ng/ml
DHEAS	0,6 ng/ml	0,6-100 ng/ml
DHEA	0,1 ng/ml	0,1-500 ng/ml
Testosterone	0,003 ng/ml	0,003-150 ng/ml
Cortisol	0,3 ng/ml	0,3-6000 ng/ml
Corticosterone	0,045 ng/ml	0,045-250 ng/ml
Aldosterone	0,01 ng/ml	0,01-50 ng/ml
11-Deoxycortisol	0,05 ng/ml	0,05-200 ng/ml
Dihydrotestosterone	0,02 ng/ml	0,02-150 ng/ml
Androsterone	0,001 ng/ml	0,001-100 ng/ml
Estrone	0,002 ng/ml	0,002-20 ng/ml
Estradiol	0,002 ng/ml	0,002-50 ng/ml
Pregnenolone	0,025 ng/ml	0,025-30 ng/ml
17-OH-Pregnenolone	0,035 ng/ml	0,035-100 ng/ml
Progesterone	0,3 ng/ml	0,3-5000 ng/ml
11-Deoxycorticosterone	0,005 mg/ml	0,005-100 ng/ml

Tablo 3 Ölçülen hormonların LLOQ ve dinamik aralıkları

Firma verilerine göre Gün içi ve günler arası kesinlik değerleri (%CV) CLSI C62-A rehberine göre belirtilen limit olan %15 in altındaydı. Doğruluk değerleri ise %80 ile %98.4 arasında idi.

ANALİT	Doğruluk			Gün içi kesinlik			CV% günler arası kesinlik		
	(Hata %)			(CV%)			(Error %)		
	Calibrator			Calibrator			Calibrator		
	Low	Medium	High	Low	Medium	High	Low	Medium	High
17-OH-Progesterone	4,3%	1,6%	4,9%	5,7%	2,3%	6,7%	9,1%	2,6%	6,9%
Androstenedione	6,3%	4,2%	3,9%	10,2%	5,6%	5,6%	11,6%	5,9%	6,0%
DHEAS	2,6%	2,3%	1,8%	3,7%	3,5%	2,0%	4,2%	3,7%	2,2%
DHEA	12,8%	9,7%	4,8%	15,2%	12,2%	6,3%	15,9%	12,8%	6,7%
Testosterone	10,5%	5,3%	4,8%	3,6%	7,2%	5,6%	15,4%	7,4%	5,8%
Cortisol	5,6%	3,0%	2,7%	7,6%	3,6%	3,3%	7,7%	3,7%	3,4%
Corticosterone	18,4%	5,7%	5,4%	8,5%	7,5%	7,2%	12,5%	10,6%	8,8%
Aldosterone	6,5%	2,8%	2,8%	8,7%	3,7%	4,4%	12,4%	5,1%	5,2%
11-Deoxycortisol	9,1%	7,7%	6,0%	11,6%	11,5%	8,2%	15,2%	12,8%	8,6%
DHT	10,0%	7,0%	5,2%	13,9%	8,8%	7,3%	13,9%	8,8%	7,5%
Androsterone	12,9%	4,5%	6,1%	5,4%	5,4%	8,7%	16,7%	5,7%	9,1%
Estrone	20,0%	4,5%	4,1%	4,4%	5,8%	4,6%	15,6%	6,7%	5,4%
Estradiol	11,1%	5,6%	4,8%	2,8%	6,8%	6,1%	14,1%	9,6%	6,9%
Pregnenolone	8,3%	4,7%	5,3%	0,5%	6,3%	4,3%	11,4%	6,8%	4,8%
17-OH-Pregnenolone	8,5%	7,4%	1,7%	2,3%	9,0%	2,1%	14,1%	9,9%	2,4%
Progesterone	6,4%	1,6%	1,4%	9,1%	2,0%	1,7%	9,5%	2,3%	1,9%
11-DOC	7,1%	3,5%	7,0%	10,7%	5,4%	4,3%	11,4%	7,8%	4,4%

Tablo 4 Ölçülen analitlerin doğruluk ve kesinlik değerleri

Maddelerin precursor ve product iyonları, quadripole voltajları, collision energy voltajları tablo 1’de gösterilmiştir.

ANALİT	KESİNLİK VE DOĞRULUK İÇİN KULLANILAN KONSTRASYONLAR		
	KALİBRATÖR		
	Düşük	Orta	Yüksek
17-hidroksiprogesteron	0.125	1	12.5
Androstenedion	0.1	0.8	10
DHEA	67.5	540	6750
DHEA-S	0.5	4	50
Testesteron	0.15	1.2	15
Kortizol	6.25	50	625
Kortikosteron	0.25	2	25
Aldosteron	0.05	0.4	5
11-Deoksikortizol	0.1	0.8	10
Dihidrotesteron	0.15	1.2	15
Androsteron	0.2	1.6	20
Estron	0.02	0.16	2
Estradiol	0.05	0.4	5
Pregnenalon	0.025	0.2	2.5
17-hidroksipregnenalon	0.125	1	12.5
Progesteron	5	40	500
11-Deoksikortikosteron	0.6	4	50

Tablo 5 Kesinlik ve doğruluk için kullanılan konsantrasyonlar

	Ana iyon (m/z)	Product iyon (m/z)	Q1 (mV)	Collison enerjisi (mV)	Q3 Mav
Aldo d7	368.3	350	-14	-20	-27
Aldosteron	361.1	109.1	-12	-33	-25
Kortizon	361.3	163	-21	-27	-29
Korti d4	367.4	121	-23	-23	-23
Kortizol	363	121.2	-23	-23	-24
21-deoksikortizol	347.1	121	-12	-17	-22
Kortikosteron	347	329.2	-22	-15	-16
11-deoksikortizol	347.2	97.1	-22	-26	-18
DHEA-S	271	79	-17	-30	-14
Androstenedion	287	97.1	-28	-21	-19
11-deoksikortikosteron	331.3	97.1	-21	-22	-19
Testo d2	292	97.1	-19	-22	-17
Testesteron	289.2	97.1	-19	-21	-10
DHEA	289	213	-29	-12	-18
Estradiol	255.2	133	-26	-19	-14
Estrone	289	213	-26	-12	-18
17-OH progesteron	331	97.2	-22	-27	-21
17-OH pregnenolon	315	297	-22	-12	-11
DHT	293	147	-13	-20	-19
Progesteron	315	97	-20	-21	-18
Androsteron	273	255	-18	-12	-18
Pregnenalom	299	261	-30	-53	-18

Tablo 6 Ana iyon ve product iyon kütleleri ve kullanılan collision enerjisi (mV)

3.4 Verilerin İstatistiksel Analizi

Veriler, Sosyal Bilimler İçin İstatistik Paket Programı (GraphPad v5.0) kullanılarak analiz edildi. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotların (frekans, yüzde, ortalama, standart sapma-ss) yanı sıra parametrelerin yaşla ilişkisi için Lineer Regresyon testi, parametrelerin yaş ve cinsiyet ile ilişkisi için lineer regresyon ve t test, yaş grupları arasındaki farklılıkları belirlemek için One way ANOVA testleri kullanıldı.



4 SONUÇLAR

Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Sosyal Pediatri Bilim Dalı ve Yenidoğan Bilim Dalı polikliniklerine Nisan 2016-Nisan 2017 tarihleri arasına gelen toplamda 325 term ve yaşına göre AGA bebek çalışmamıza alındı. Hastaların yaş ve cinsiyete göre dağılımı tablo 7 dedir.

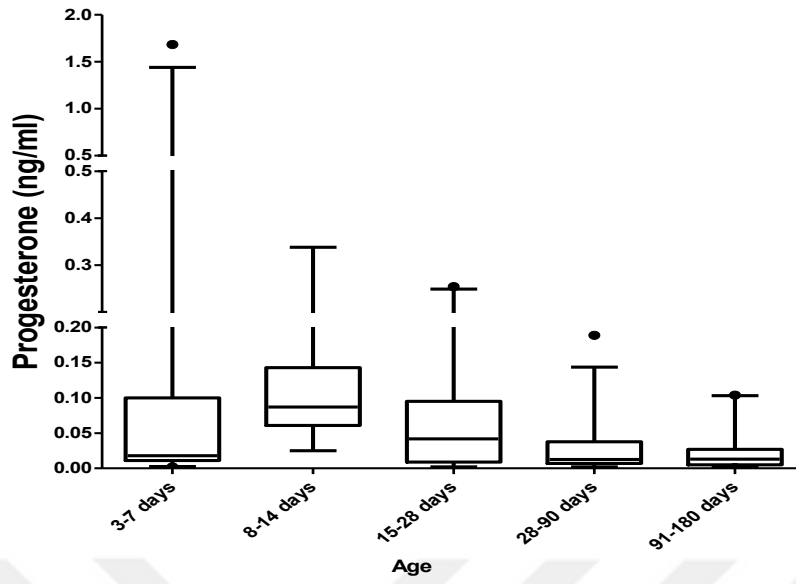
	Erkek (n)	Kız(n)	TOTAL (n)
3-7 gün	30	34	64
8-14 gün	37	24	61
15-28 gün	36	31	67
28-90 gün	35	31	66
91-180 gün	35	32	67
TOPLAM	173	152	325

Tablo 7 Çalışmaya alınan kız ve erkeklerin yaş gruplarına göre dağılımı

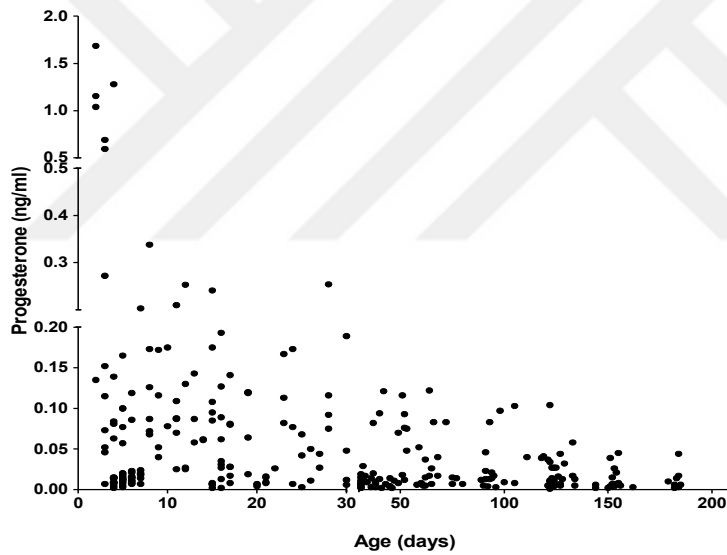
4.1 Mineralokortikoid Yolağı

Bu yolakta başlıca progesteron, 11-deoksikortikosteron, kortikosteron ve aldosteron değerlendirilmiştir.

PROGESTERON: Yaş gruplarına göre ortalama, 25 ve 75 persantil değerleri, üst ve alt güvenilirlik indeksi hesaplandı. Şekil 8 de gösterilmektedir.

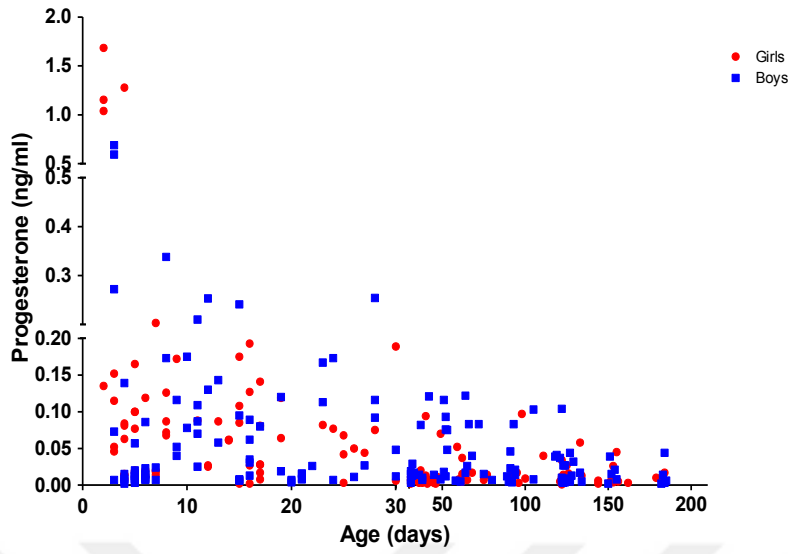


Şekil 8 Progesteron değerinin yaşlara göre normalleri-kutu grafik



Şekil 9 Progesteron değerinin yaşlara göre normalleri-saçılım grafiği

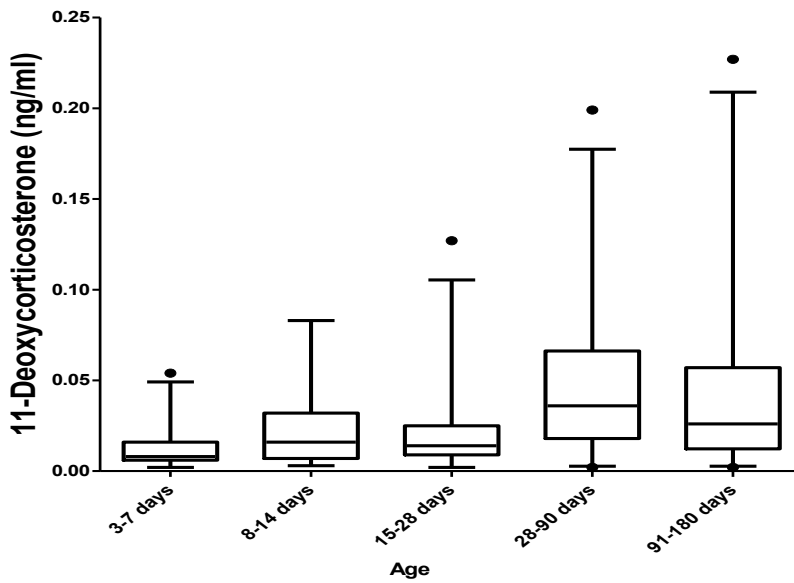
Kızlar ve erkekler arasında anlamlı farklılık olmadığı için tüm yaş grupları için tek bir değer hesaplandı



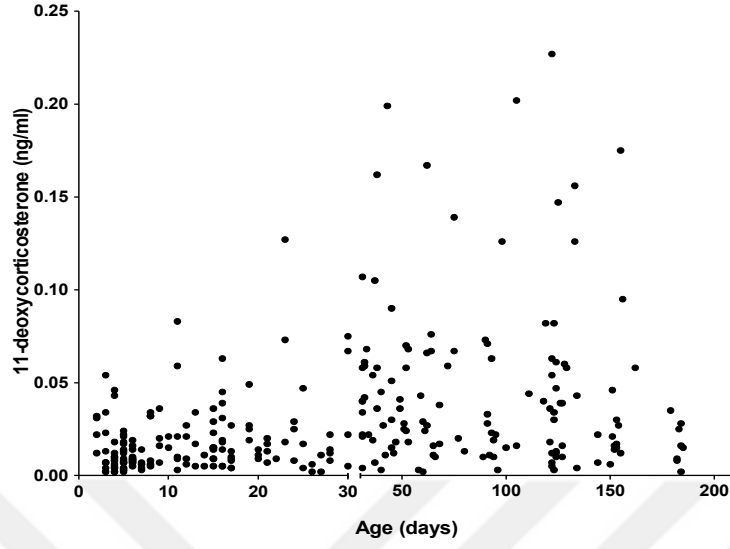
Şekil 10 Progesteron değerinin yaşlara göre normalleri-saçılım grafiği-kız ve erkek

3-7 gün aralığı için 0.143 ng/ml, 8-14 gün aralığı için 0.108 ng/ml, 15-28 gün aralığı için 0.063 ng/ml, 29-90 gün aralığı için 0.029 ng/ml ve 91-180 gün aralığı için 0.020 ng/ml ortalama olarak hesaplandı. Progesteron için hesaplanan değerler yaşa göre anlamlı olarak değişmekteydi.

11-DEOKSİKORTİKOSTERON: Yaş gruplarına göre ortalama, 25 ve 75 persantil değerleri, üst ve alt güvenilirlik indeksi hesaplandı. Şekil 11 de gösterilmektedir.

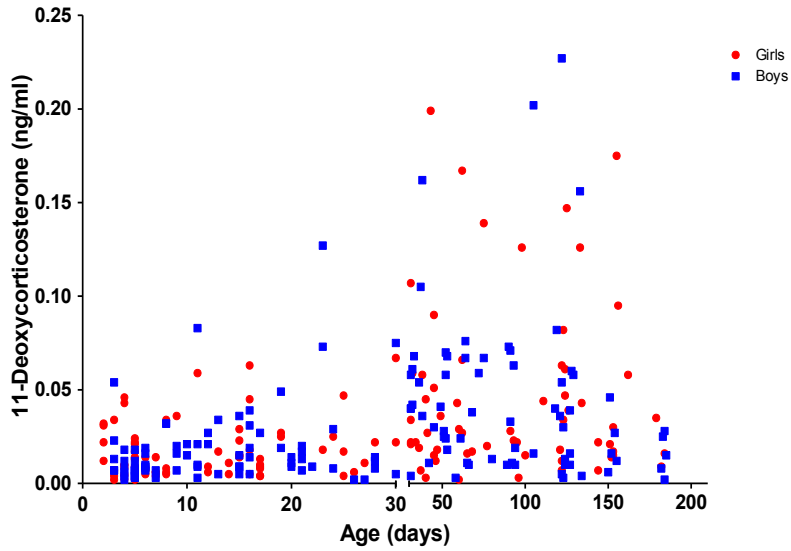


Şekil 11- 11 deoksikortikosteron değerinin yaşlara göre normalleri-kutu grafik



Şekil 12- 11 deoksikortikosteronun yaşlara göre normalleri-saçılım grafiği

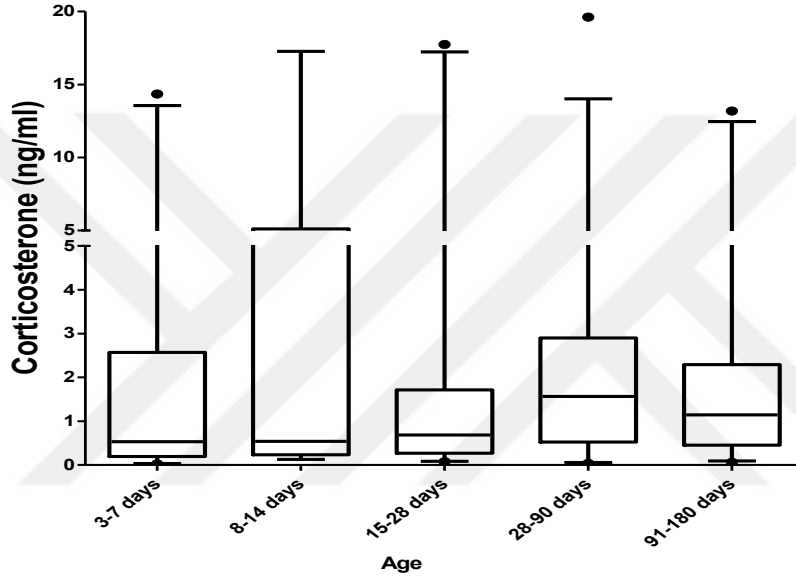
Kızlar ve erkekler arasında anlamlı farklılık olmadığı için tüm yaş grupları için tek bir değer hesaplandı



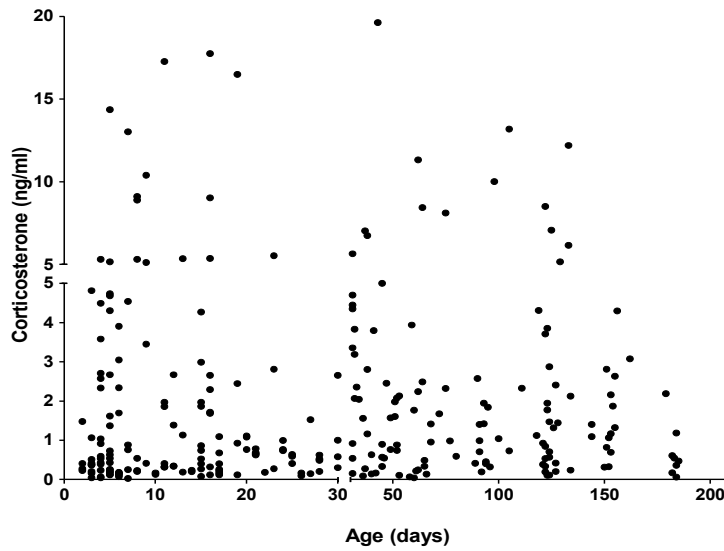
Şekil 13- 11 deoksikortikosteronun yaşlara göre normalleri-saçılım grafiği kız ve erkek

3-7 gün aralığı için 0.012 ng/ml, 8-14 gün aralığı için 0.020 ng/ml , 15-28 gün aralığı için 0.020 ng/ml , 29-90 gün aralığı için 0.045 ng/ml ve 91-180 gün aralığı için 0.042 ng/ml ortalama değerler olarak hesaplandı. Hesaplanan değerler yaşa göre anlamlı olarak değişmekteydi.

KORTİKOSTERON: Yaş gruplarına göre ortalama, 25 ve 75 persantil değerleri, üst ve alt güvenilirlik indeksi hesaplandı. Şekil 14 'te gösterilmektedir.

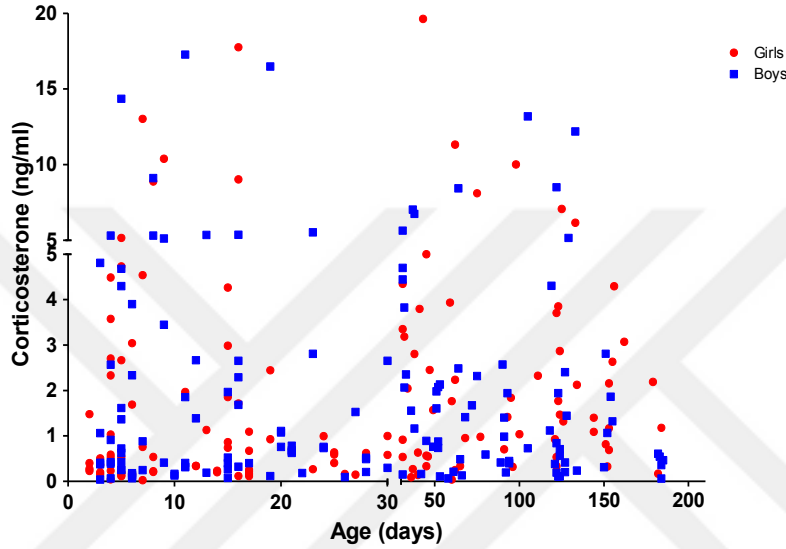


Şekil 14- Kortikosteronun yaşlara göre normalleri-kutu grafik



Şekil 15 Kortikosteronun yaşa göre normalleri-saçılım grafiği

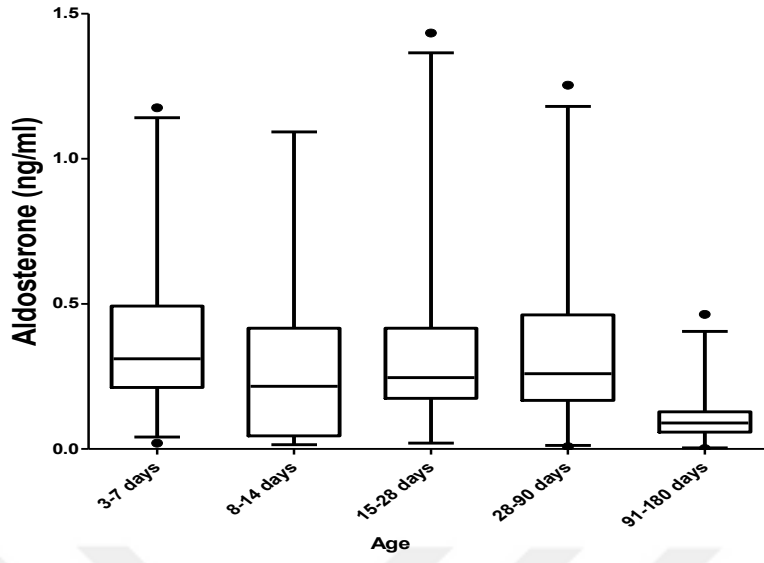
Kızlar ve erkekler arasında anlamlı farklılık olmadığı için tüm yaş grupları için tek bir değer hesaplandı.



Şekil 16 Kortikosteronun yaşlara göre normalleri-saçılım grafiği-kız ve erkek

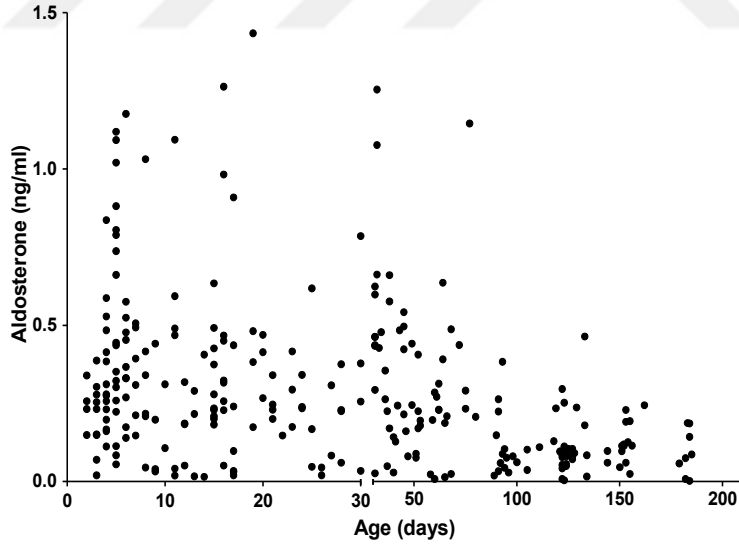
3-7 gün aralığı da 1.734 ng/ml, 8-14 gün aralığında 2.885 ng/ml, 15-28 gün aralığında 1.821 ng/ml, 29-90 gün aralığında 2.402 ng/ml ve 91-180 gün aralığında 2.067 ng/ml ortalama değerler olarak hesaplandı. Ancak kortikosteron için hesaplanan değerler arasında yaşa göre anlamlı farklılık bulunmadı.

ALDOSTERON: Yaş gruplarına göre ortalama, 25 ve 75 persantil değerleri, üst ve alt güvenirlilik indeksi hesaplandı. Şekil 17 de gösterilmektedir.

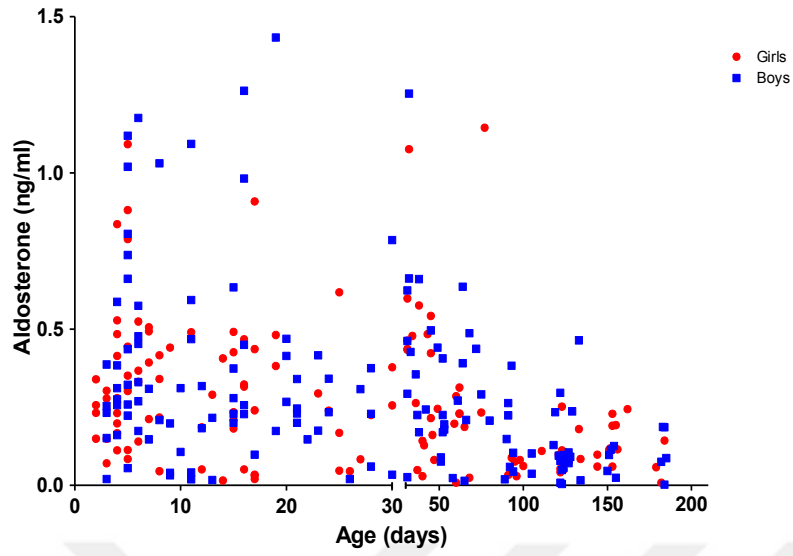


Şekil 17 Aldosteronun yaşa göre normalleri-kutu grafik

Kızlar ve erkekler arasında anlamlı farklılık olmadığı için tüm yaş grupları için tek bir değer hesaplandı.



Şekil 18 Aldosteronun yaşa göre normalleri-saçılım grafiği



Şekil 19 Aldosteronun yaşa göre normalleri-saçılım grafiği-kız ve erkek

3-7 gün aralığı için 0.390 ng/ml, 8-14 gün aralığı için 0.287 ng/ml, 15-28 gün aralığı için 0.327 ng/ml, 29-90 gün aralığı için 0.332 ng/ml ve 91-180 gün aralığı için 0.113 ng/ml ortalama değer olarak hesaplandı. Hesaplanan değerler yaşa göre anlamlı olarak değişmekteydi

Glukokortikoid yolağı için yaşa göre hesaplanan değerler aşağıdaki tabloda gösterilmektedir.

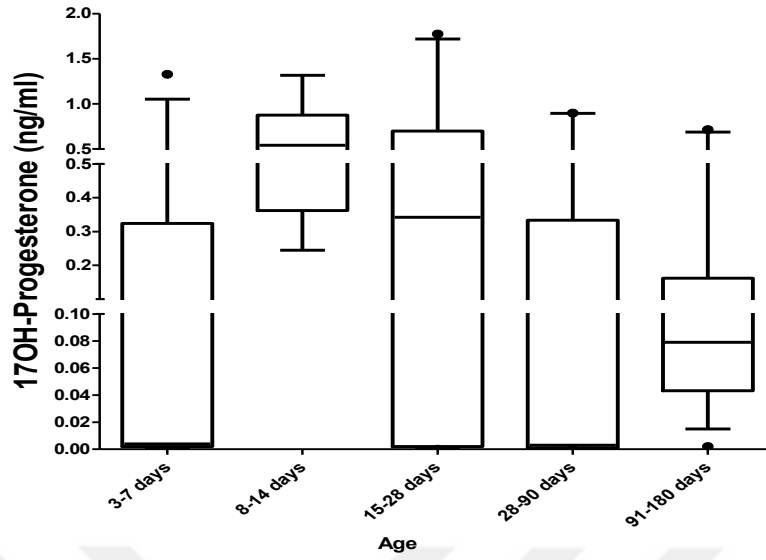
Parametre (ng/ml)	ortalama	25%	75%	2.5%	97.5%	Alt 95% GI	Üst 95% GI	p
Progesteron								
3-7 gün	0.143	0.011	0.100	0.004	1.209	0.060	0.226	< 0.0001
8-14 gün	0.108	0.061	0.143	0.025	0.282	0.079	0.137	
15-28 gün	0.063	0.009	0.095	0.002	0.224	0.046	0.080	
29-90 gün	0.029	0.007	0.037	0.002	0.121	0.019	0.038	
91-180 gün	0.020	0.005	0.027	0.002	0.098	0.015	0.026	
11-Deoksikortikosteron								
3-7 gün	0.012	0.006	0.016	0.002	0.044	0.009	0.015	< 0.0001
8-14 gün	0.020	0.007	0.032	0.004	0.067	0.013	0.027	
15-28 gün	0.020	0.009	0.025	0.002	0.069	0.014	0.026	
29-90 gün	0.045	0.018	0.066	0.003	0.163	0.036	0.055	
91-180 gün	0.042	0.012	0.057	0.003	0.183	0.031	0.054	
Kortikosteron								
3-7 gün	1.734	0.196	2.569	0.040	8.780	1.052	2.416	0.459
8-14 gün	2.885	0.234	5.113	0.151	12.79	1.226	4.544	
15-28 gün	1.821	0.269	1.715	0.101	13.87	0.898	2.742	
29-90 gün	2.402	0.525	2.900	0.082	9.519	1.627	3.176	
91-180 gün	2.067	0.454	2.291	0.107	10.71	1.413	2.721	
Aldosteron								
3-7 gün	0.390	0.212	0.493	0.063	1.104	0.322	0.458	< 0.0001
8-14 gün	0.287	0.045	0.416	0.016	1.052	0.177	0.398	
15-28 gün	0.327	0.175	0.416	0.023	1.164	0.251	0.403	
29-90 gün	0.332	0.167	0.462	0.017	1.101	0.267	0.397	
91-180 gün	0.113	0.058	0.128	0.006	0.324	0.091	0.134	

Tablo 8 Glukokortikoidlerin yaşa göre persantil değerleri

4.2 Glukokortikoid Yolağı

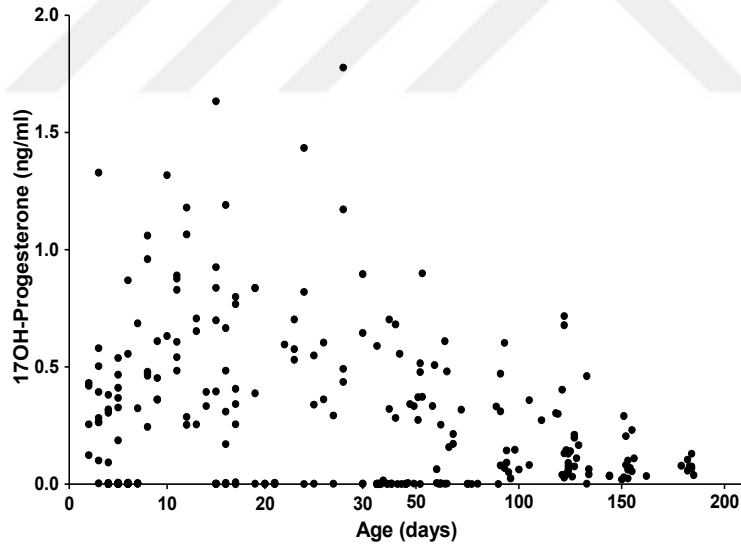
Bu yolakta başlıca 17-OH progesteron, 21-deoksikortizol, 11-deoksikortizol, kortizol ve kortizon değerlendirilmiştir.

17-HİDROKSİPROGESTERON: Yaş gruplarına göre ortalama, 25 ve 75 persantil değerleri, üst ve alt güvenirlilik indeksi hesaplandı. Şekil 20 de gösterilmektedir.

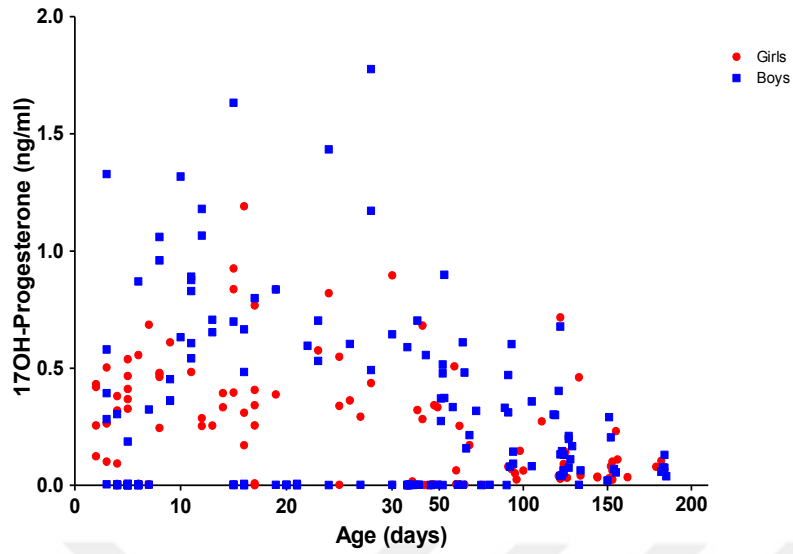


Şekil 20- 17-hidroksiprogesteronun yaşa göre normalleri-kutu grafik

Kızlar ve erkekler arasında anlamlı farklılık olmadığı için tüm yaş grupları için tek bir değer hesaplandı.



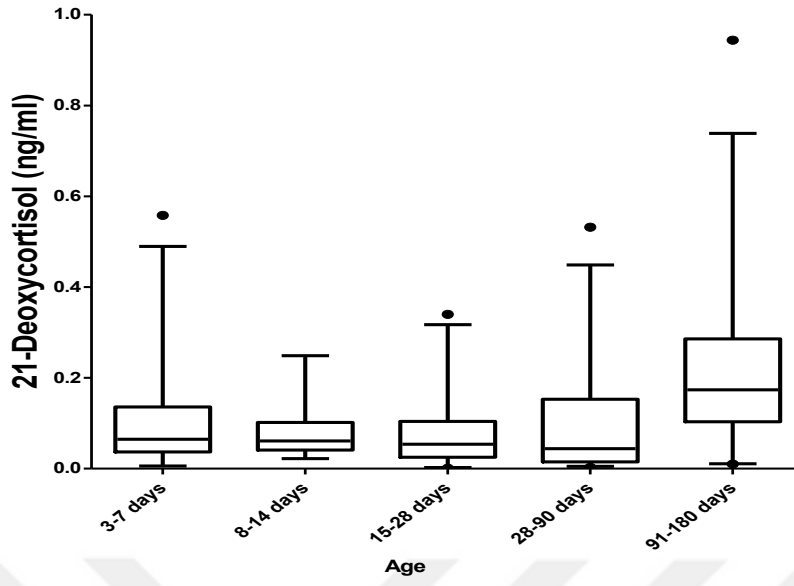
Şekil 21-17-hidroksiprogesteronun yaşa göre normalleri-saçılım grafiği



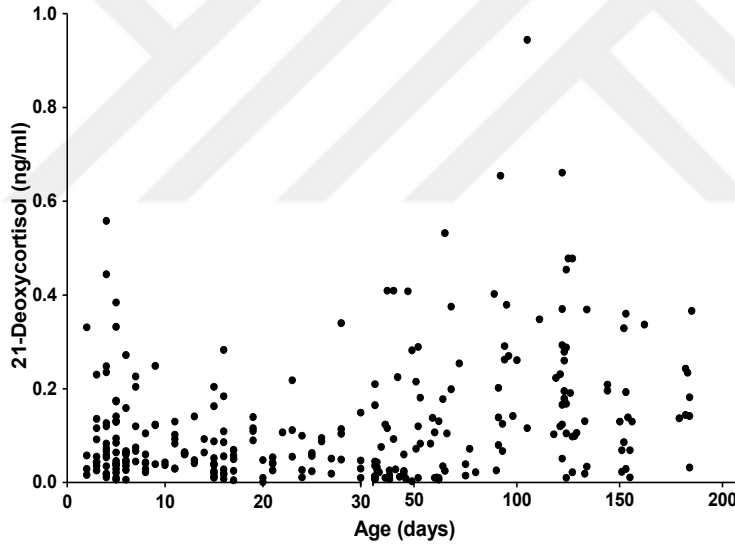
Şekil 22-17-hidroksiprogesteronun yaşa göre normalleri-saçılım grafiği-kız ve erkek

3-7 gün aralığında 0.177 ng/ml, 8-14 gün aralığında 0.621 ng/ml, 15-28 gün aralığında 0.412 ng/ml, 29-90 gün aralığında 0.178 ng/ml ve 91-180 gün aralığında 0.143 ng/ml ortalama değer olarak hesaplandı. Hesaplanan değerler yaşa göre anlamlı olarak değişmekteydi.

21-DEOKSİKORTİZOL: Yaş gruplarına göre ortalama, 25 ve 75 persantil değerleri, üst ve alt güvenilirlik indeksi hesaplandı. Şekil 23'te gösterilmektedir.

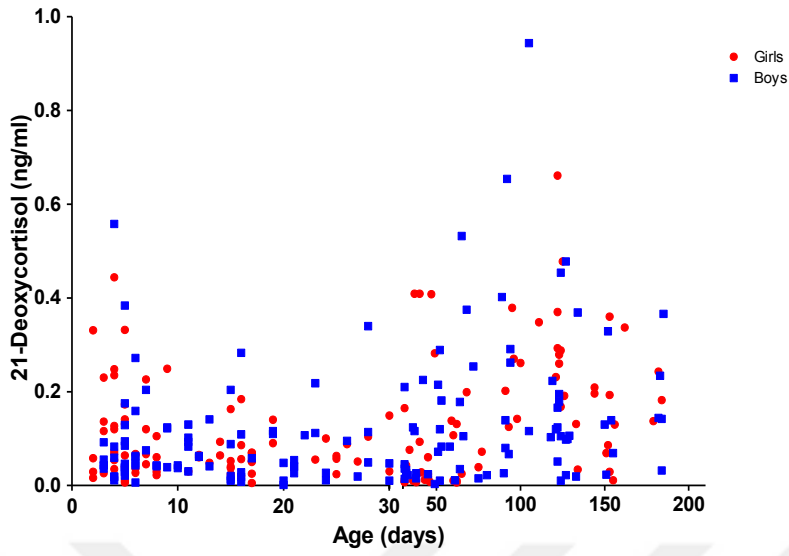


Şekil 23-21-deoksikortizolün yaşlara göre normalleri-kutu grafik



Şekil 24-21-deoksikortizolün yaşlara göre normalleri-saçılım grafiği

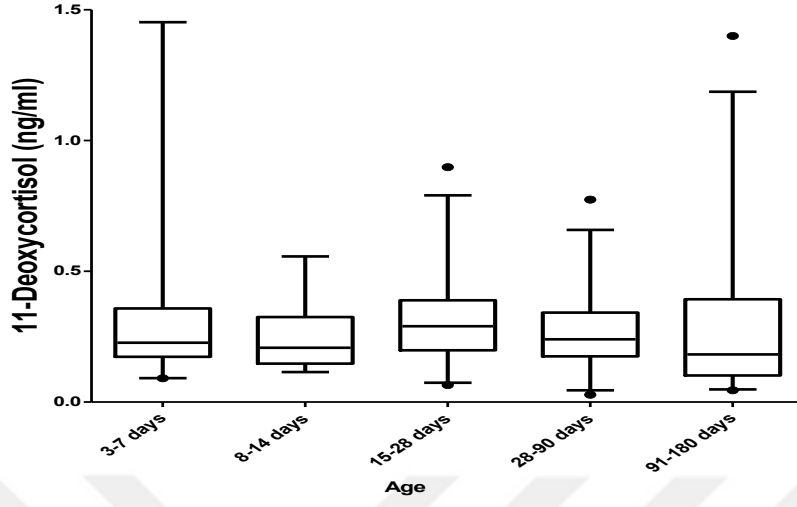
Kızlar ve erkekler arasında anlamlı farklılık olmadığı için tüm yaş grupları için tek bir değer hesaplandı.



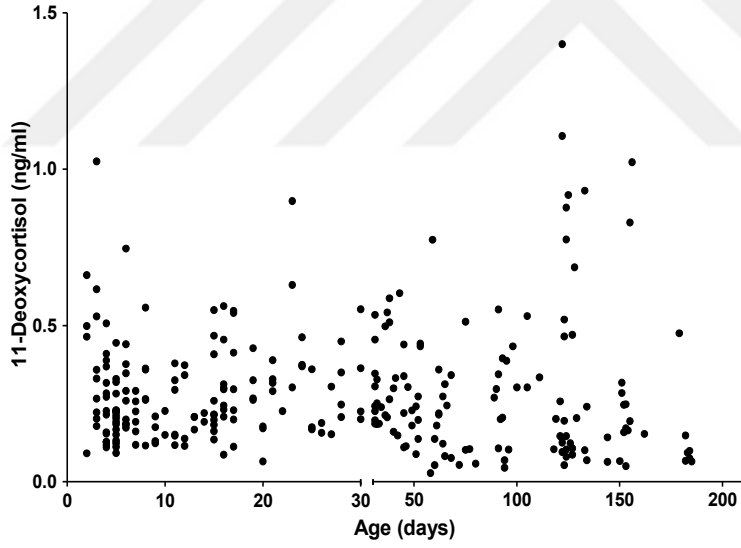
Şekil 25-21-deoksikortizolun yaşlara göre normalleri-saçılım grafiği-kız ve erkek

3-7 gün aralığı için 0.109 ng/ml, 8-14 gün aralığı için 0.074 ng/ml , 15-28 gün aralığı 0.074 ng/ml , 29-90 gün aralığı için 0.105 ng/ml ve 91-180 gün aralığı için 0.211 ng/ml olarak belirlendi. Hesaplanan değerler yaşa göre anlamlı olarak değişmekteydi.

11-DEOKSİKORTİZOL: Yaş gruplarına göre ortalama, 25 ve 75 persantil değerleri, üst ve alt güvenilirlik indeksi hesaplandı. Şekil 26 'da gösterilmektedir.

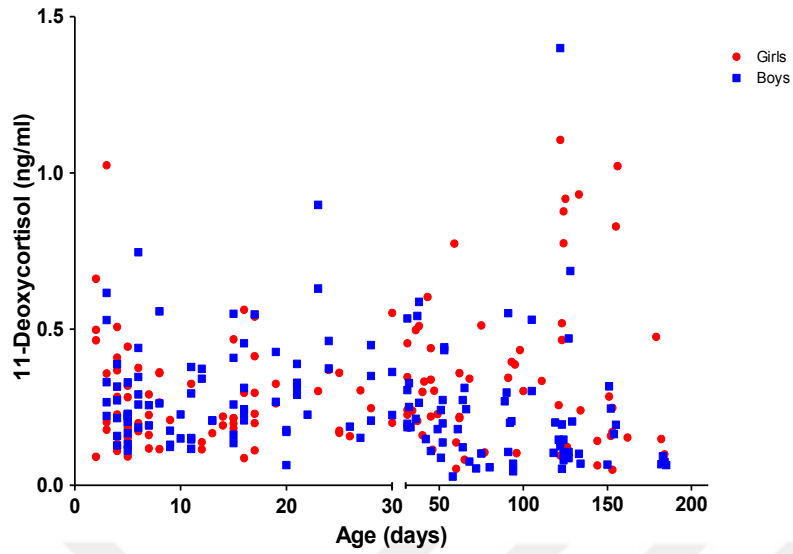


Şekil 26-11-deoksikortizolün yaşlara göre normalleri-kutu grafik



Şekil 27-11-deoksikortizolün yaşlara göre normalleri-saçılım grafiği

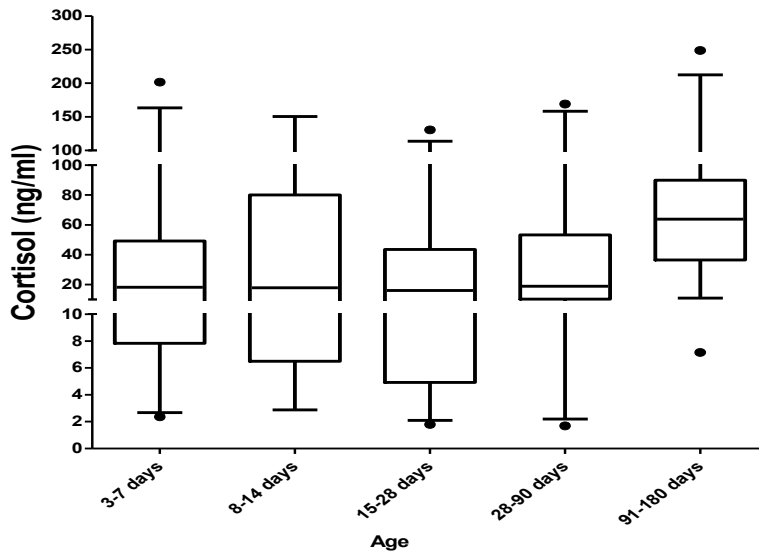
11-deoksikortizol düzeylerinde kız ve erkekler arasında anlamlı farklılık saptandı. Kızlarda 11-deoksikortizol düzeyleri yüksek saptandı.



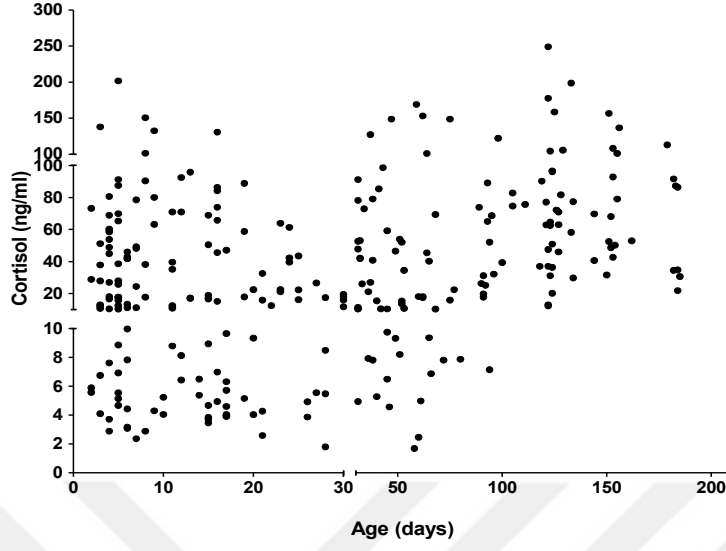
Şekil 28-11-deoksikortizolün yaşlara göre normalleri-saçılım grafiği-kız ve erkek

3-7 gün aralığı için 0.311 ng/ml, 8-14 gün aralığı için 0.233 ng/ml, 15-28 gün aralığı için 0.306 ng/ml, 29-90 gün aralığı için 0.271 ng/ml ve 91-180 gün aralığı için 0.299 ng/ml ortalama değer olarak hesaplandı. 11-deoksikortizol için hesaplanan değerler yaşa göre anlamlı olarak değişmemektedir.

KORTİZOL: Yaş gruplarına göre ortalama, 25 ve 75 persantil değerleri, üst ve alt güvenilirlik indeksi hesaplandı. Şekil 29'da gösterilmektedir.

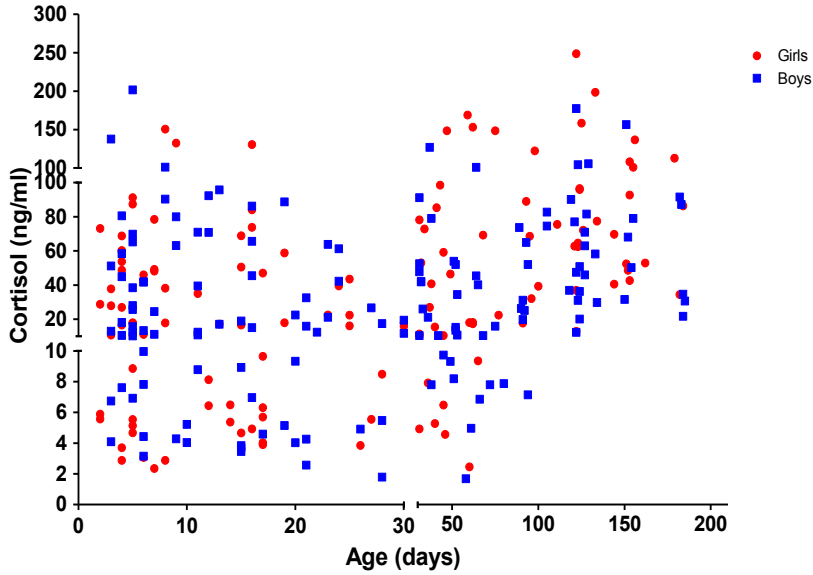


Şekil 29-Kortizolün yaşlara göre normalleri-kutu grafik



Şekil 30-Kortizolün yaşlara göre normalleri-saçılım grafiği

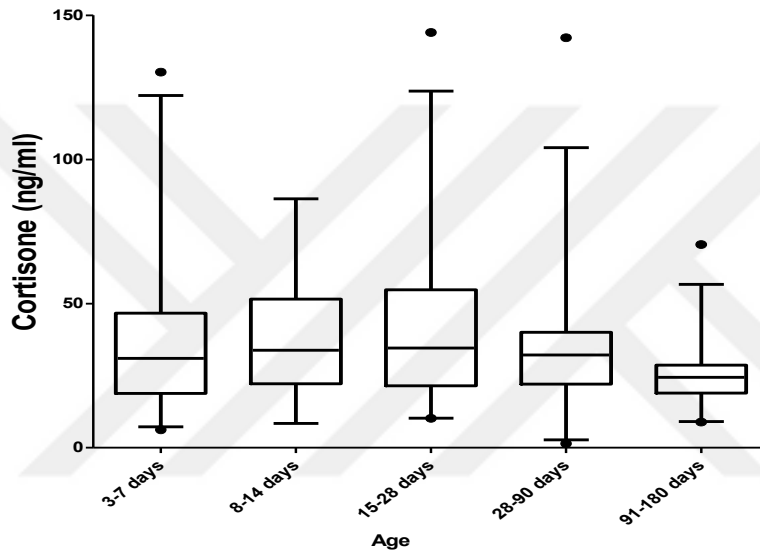
Kortizol düzeylerinde kızlar ve erkekler arasında anlamlı farklılık saptandı, kortizol düzeyleri tüm yaş grupları için kızlarda yüksek saptandı.



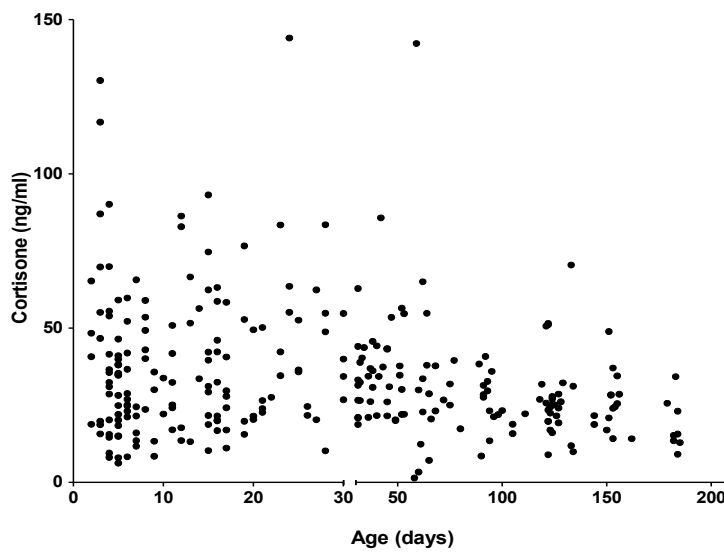
Şekil 31-Kortizolün yaşlara göre normalleri-saçılım grafiği-kız ve erkek

3-7 gün aralığında 33.78 ng/ml, 8-14 gün aralığında 43.98 ng/ml, 15-28 gün aralığında 26.76 ng/ml ,29-90 gün aralığında 39.18 ng/ml ve 91-180 gün aralığında 69.99 ng/ml ortalama değer olarak hesaplandı. Hesaplanan değerler yaşa göre anlamlı olarak değişmekteydi.

KORTİZON: Yaş gruplarına göre ortalama, 25 ve 75 persantil değerleri, üst ve alt güvenilirlik indeksi hesaplandı. Şekil 32’de gösterilmektedir.

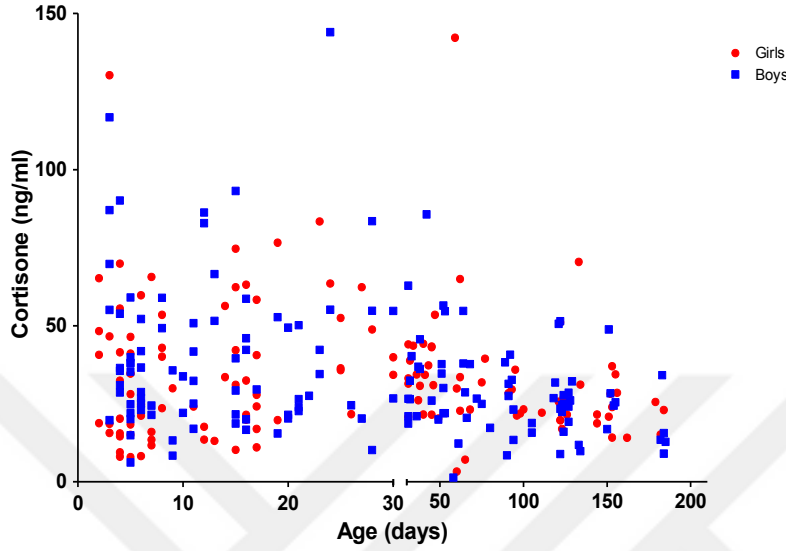


Şekil 32-Kortizonun yaşlara göre normalleri-kutu grafik



Şekil 33-Kortizonun yaşlara göre normalleri-saçılım grafiği

Kızlar ve erkekler arasında anlamlı farklılık olmadığı için tüm yaş grupları için tek bir değer hesaplandı



Şekil 34-Kortizonun yaşlara göre normal değerleri-saçılım grafiği-kız ve erkek

3-7 gün aralığında 36,53 ng/ml, 8-14 gün aralığında 37.93 ng/ml, 15-28 gün aralığında 40.59 ng/ml, 29-90 gün aralığında 34.45 ng/ml ve 91-180 gün aralığında 25.58 ng/ml ortalama değer olarak hesaplandı. Hesaplanan değerler yaşa göre anlamlı olarak değişmekteydi.

Mineralokortikoid yolağı için yaşa göre hesaplanan değerler aşağıdaki tabloda gösterilmektedir.

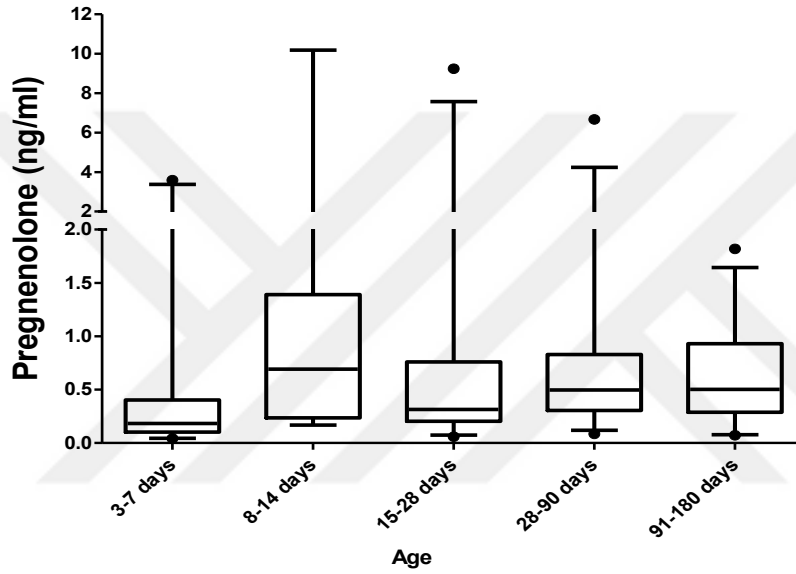
Parametre (ng/ml)	Ortalama	25%	75%	2.5%	97.5%	Alt 95% GI	Üst 95% GI	P
17OH-Progesteron								
3-7 days	0.177	0.002	0.324	0.001	0.768	0.111	0.243	< 0.0001
8-14 days	0.621	0.362	0.877	0.250	1.228	0.500	0.741	
15-28 days	0.412	0.002	0.699	0.001	1.563	0.290	0.534	
29-90 days	0.178	0.001	0.333	0.001	0.775	0.116	0.240	
91-180 days	0.143	0.043	0.162	0.022	0.627	0.105	0.180	
21-Deoksikortizol								
3-7 days	0.109	0.037	0.136	0.008	0.411	0.080	0.137	< 0.0001
8-14 days	0.074	0.041	0.102	0.026	0.178	0.055	0.094	
15-28 days	0.074	0.025	0.104	0.006	0.260	0.055	0.092	
29-90 days	0.105	0.015	0.153	0.006	0.409	0.074	0.136	
91-180 days	0.211	0.103	0.285	0.016	0.656	0.170	0.252	
11-Deoksikortizol								
3-7 days	0.311	0.173	0.358	0.101	0.871	0.239	0.382	0.54
8-14 days	0.233	0.147	0.325	0.115	0.441	0.190	0.276	
15-28 days	0.306	0.198	0.389	0.095	0.606	0.264	0.348	
29-90 days	0.271	0.175	0.342	0.053	0.593	0.233	0.310	
91-180 days	0.299	0.101	0.393	0.052	1.049	0.228	0.371	
Kortizol								
3-7 days	33.78	7.824	49.18	2.984	112.1	24.80	42.76	< 0.0001
8-14 days	43.98	6.491	80.02	3.632	138.7	26.58	61.38	
15-28 days	26.76	4.927	43.48	2.880	87.87	18.97	34.55	
29-90 days	39.18	10.22	53.27	3.772	150.2	29.02	49.35	
91-180 days	69.99	36.47	89.88	12.75	184.3	59.04	80.94	
Kortizon								
3-7 days	36.53	18.79	46.62	8.006	102.0	30.23	42.82	0.001
8-14 days	37.93	22.12	51.56	11.48	84.04	29.72	46.15	
15-28 days	40.59	21.46	54.78	10.53	89.78	33.82	47.35	
29-90 days	34.45	22.02	40.00	5.676	72.75	29.54	39.37	
91-180 days	25.58	18.93	28.57	9.596	51.18	22.94	28.22	

Tablo 9-Mineralokortikoidlerin yaşlara göre persantil değerleri

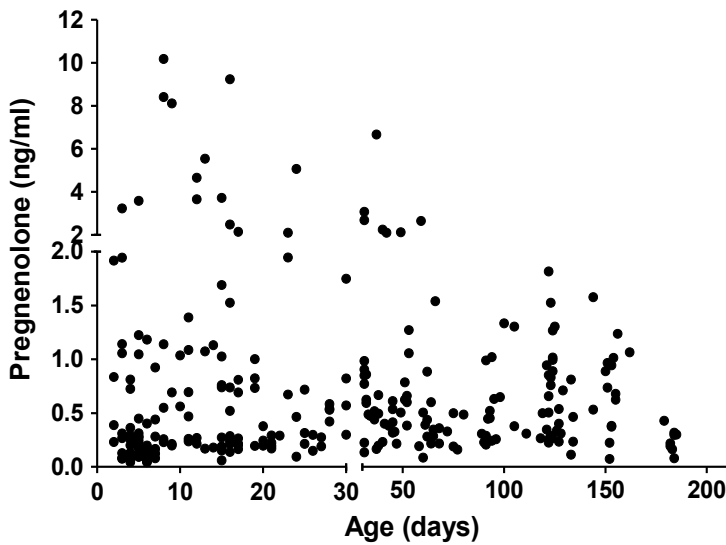
4.3 Androjen Yolağı

Bu yolakta başlıca pregnenolon, 17-hidroksipregnanolon, DHEA, DHEA-S, androstenedion değerlendirilmiştir.

PREGNENALON: Yaş gruplarına göre ortalama, 25 ve 75 persantil değerleri, üst ve alt güvenilirlik indeksi hesaplandı. Şekil 35' de gösterilmektedir.

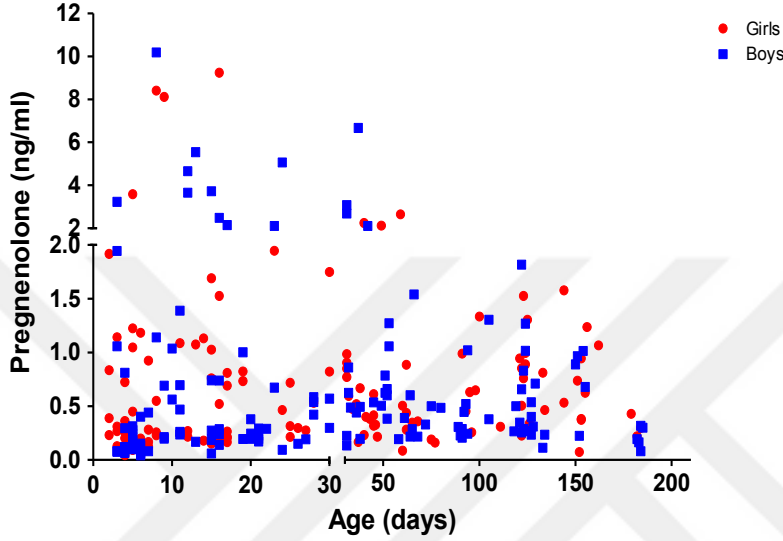


Şekil 35-Pregnenolonun yaşlara göre normal değerleri-kutu grafik



Şekil 36-Pregnenolonun yaşlara göre normal değerleri-saçılım grafiği

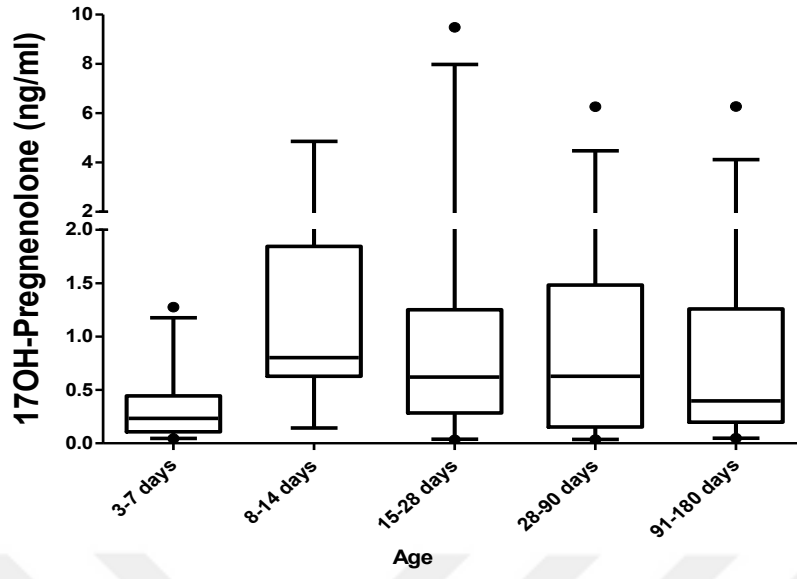
Kızlar ve erkekler arasında anlamlı farklılık olmadığı için tüm yaş grupları için tek bir değer hesaplandı



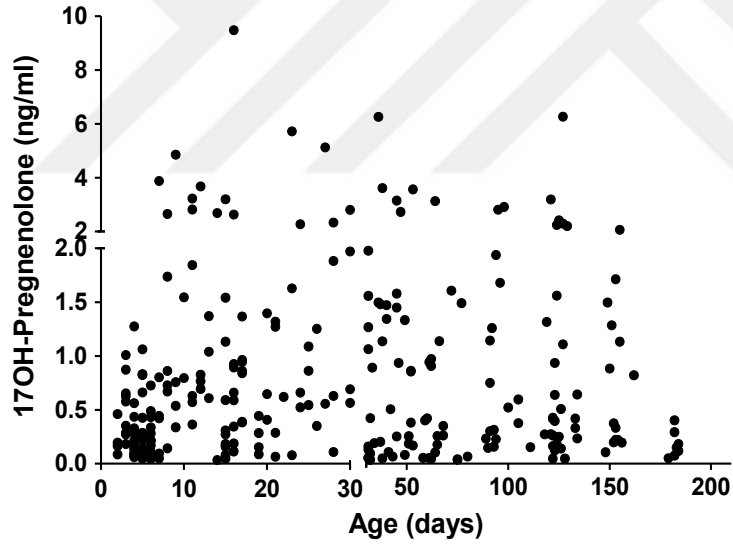
Şekil 37-Pregnenolonun yaşlara göre normal değerleri-saçılım grafiği-kız ve erkek

3-7 gün aralığında 0.0452 ng/ml, 8-14 gün aralığında 1.950 ng/ml, 15-28 gün aralığında 0.873 ng/ml, 29-90 gün aralığında 0.792 ng/ml ve 91-180 gün aralığında 0.618 ng/ml ortalama değer olarak hesaplandı. Hesaplanan değerler yaşa göre anlamlı olarak değişmekteydi.

17-HİDROKSİPREGNENOLON: Yaş gruplarına göre ortalama, 25 ve 75 persantil değerleri, üst ve alt güvenirlilik indeksi hesaplandı. Şekil 38' de gösterilmektedir.

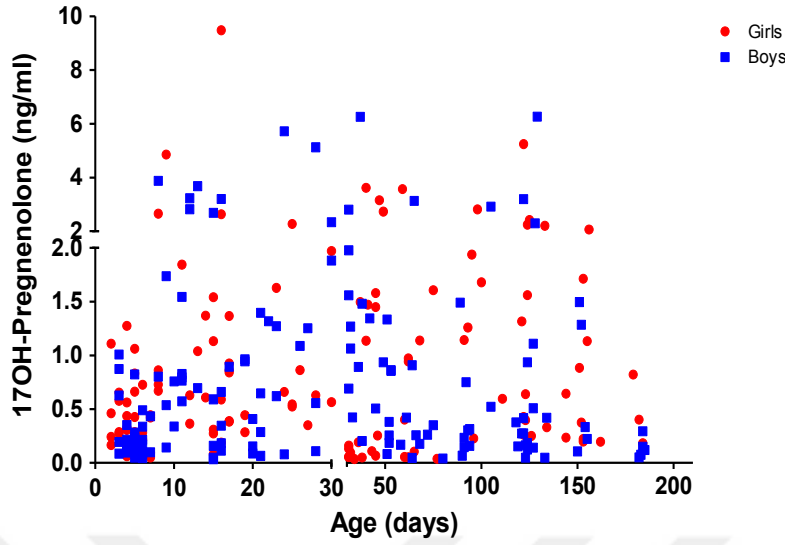


Şekil 38-17-hidroksipregnenolon yaşa göre normal değerleri-kutu grafik



Şekil 39-17-hidroksipregnenolon yaşla göre normal değerleri-saçılım grafiği

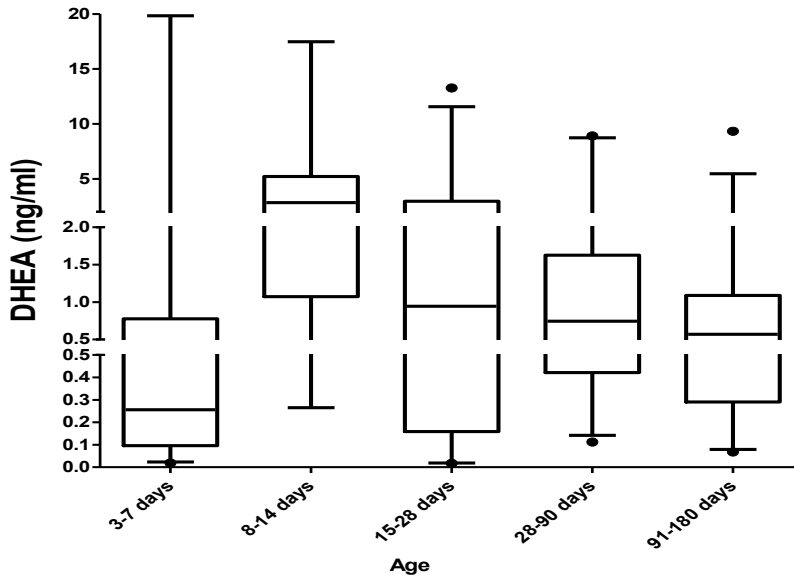
Kızlar ve erkekler arasında anlamlı farklılık olmadığı için tüm yaş grupları için tek bir değer hesaplandı



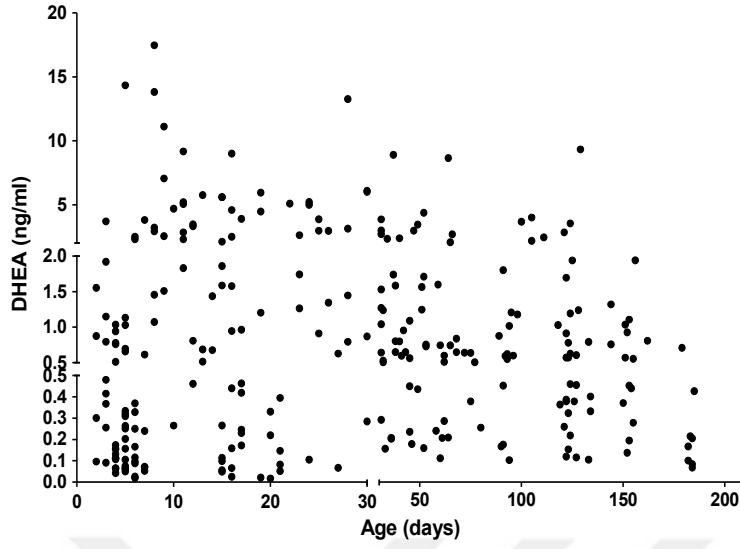
Şekil 40-17-hidroksipregnenolon yaşıa göre normal değeri-saçılım grafiği-kız ve erkek

3-7 gün aralığında 0.335 ng/ml, 8-14 gün aralığında 1.435 ng/ml, 15-28 gün aralığında 0.095 ng/ml, 29-90 gün aralığında 1.003 ng/ml ve 91-180 gün aralığında 0.854 ng/ml ortalama değeri olarak hesaplandı. Hesaplanan değeri yaşıa göre anlamlı olarak değerişmekteydi.

DHEA: : Yaşıa gruplarına göre ortalama, 25 ve 75 persantil değeri, üst ve alt güvenirlik indeksi hesaplandı. Şekil 41’de gösterilmektedir.

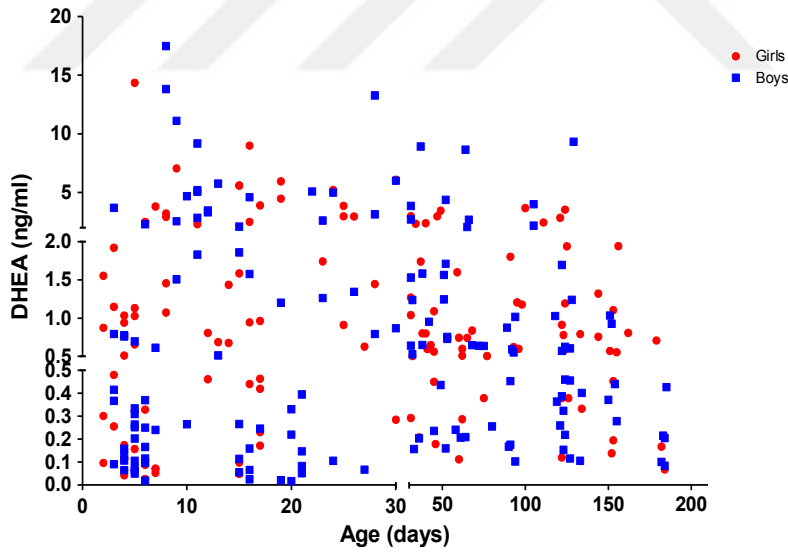


Şekil 41-DHEA ‘nın yaşıa göre normal değeri-kutu grafik



Şekil 42-DHEA'nın yaşa göre normal değerleri-saçılım grafiği

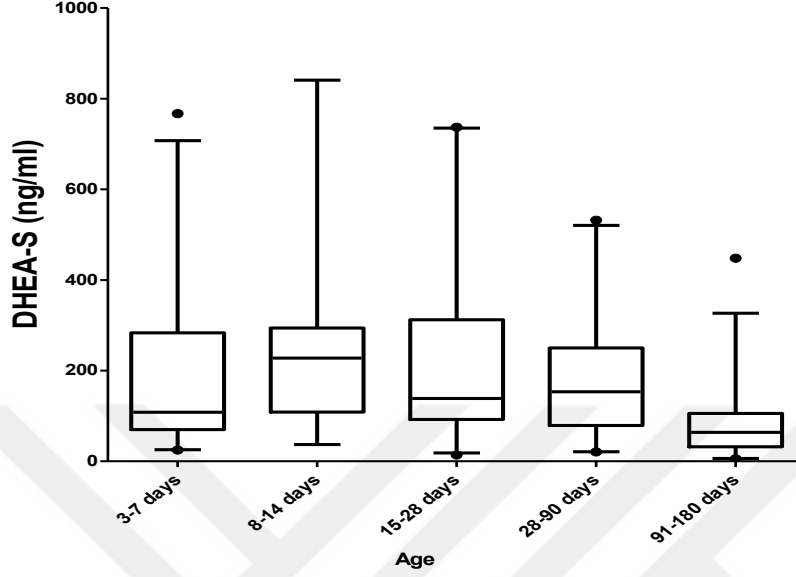
Kızlar ve erkekler arasında anlamlı farklılık olmadığı için tüm yaş grupları için tek bir değer hesaplandı



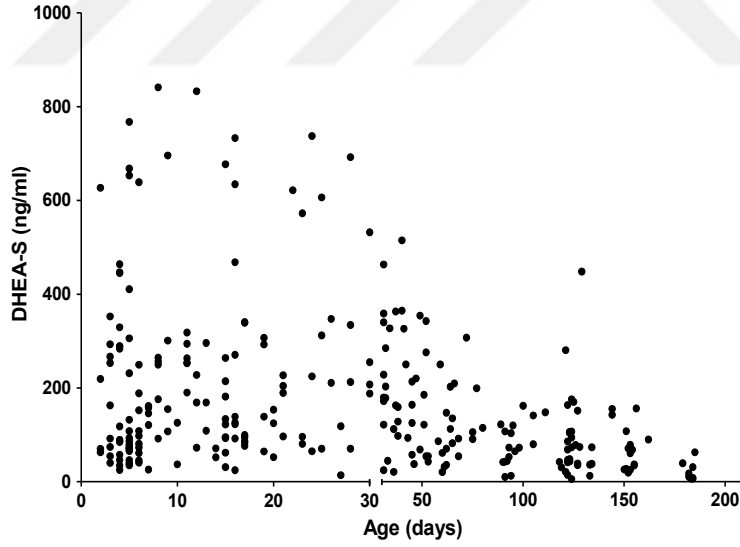
Şekil 43-DHEA'nın yaşa göre normal değerleri-saçılım grafiği-kız ve erkek

3-7 gün aralığında 1.212 ng/ml, 8-14 gün aralığında 4.099 ng/ml, 15-28 gün aralığında 1.968 ng/ml, 29-90 gün aralığında 1.444 ng/ml ve 91-180 gün aralığında 0.964 ng/ml ortalama değer olarak hesaplandı. Hesaplanan değerler yaşa göre anlamlı olarak değişmekteydi.

DHEA-S: Yaş gruplarına göre ortalama, 25 ve 75 persantil değerleri, üst ve alt güvenilirlik indeksi hesaplandı. Şekil 44 'de gösterilmektedir.

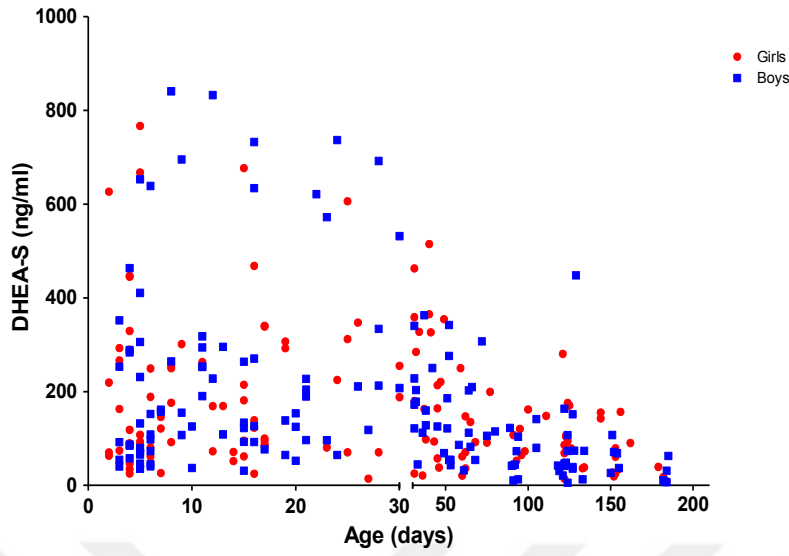


Şekil 44-DHEA-S'in yaşıya göre normal değerleri-kutu grafik



Şekil 45-DHEA-S'in yaşıya göre normal değerleri-saçılım grafiği

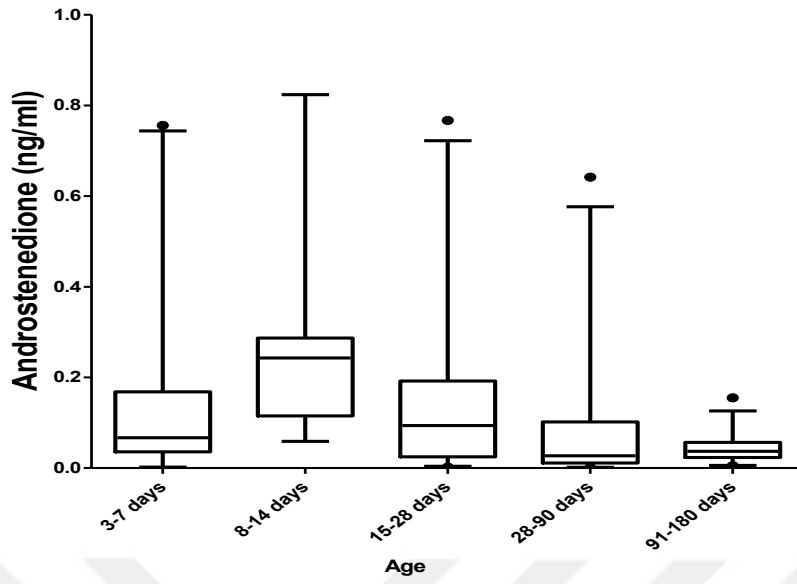
Kızlar ve erkekler arasında anlamlı farklılık olmadığı için tüm yaş grupları için tek bir değer hesaplandı



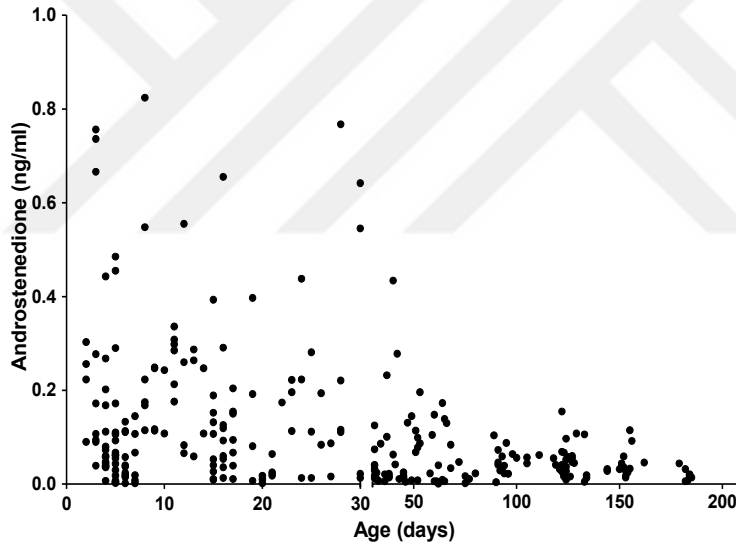
Şekil 46-DHEA-S'ın yaşa göre normal değerleri-saçılım grafiği-kız ve erkek

3-7 gün aralığında 192.1 ng/ml, 8-14 gün aralığında 254.5 ng/ml, 15-28 gün aralığında 233.5 ng/ml, 29-90 gün aralığında 175.4 ng/ml ve 91-180 gün aralığında 76.89 ng/ml ortalama değer olarak hesaplandı. Hesaplanan değerler yaşa göre anlamlı olarak değişmekteydi.

ANDROSTENEDİON: Yaş gruplarına göre ortalama, 25 ve 75 persantil değerleri, üst ve alt güvenilirlik indeksi hesaplandı. Şekil 47' de gösterilmektedir.

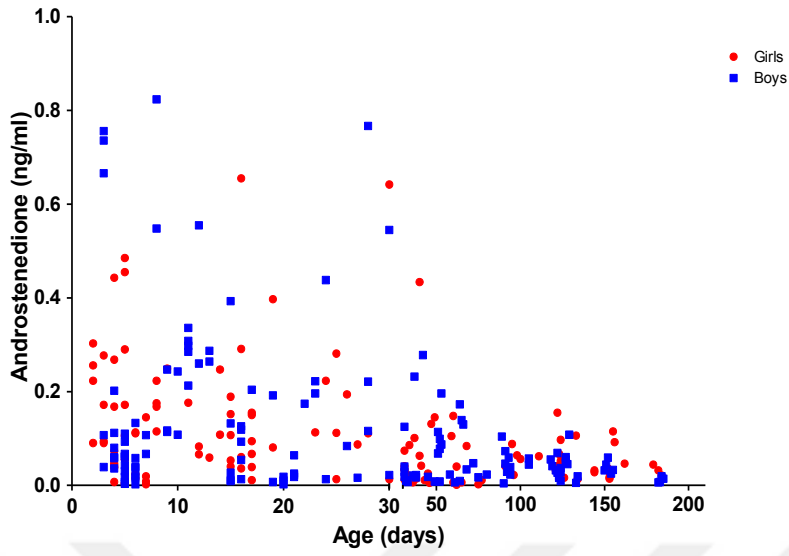


Şekil 47-Androstenedionun yaşa göre normal değerleri-kutu grafik



Şekil 48-Androstenedionun yaşa göre normal değerleri-saçılım grafiği

Kızlar ve erkekler arasında anlamlı farklılık olmadığı için tüm yaş grupları için tek bir değer hesaplandı



Şekil 49-Androstenedionun yaşa göre normal değerleri-saçılım grafiği-kız ve erkek

3-7 gün aralığında 0.134 ng/ml, 8-14 gün aralığında 0.247 ng/ml, 15-28 gün aralığında 0.136 ng/ml, 29-90 gün aralığında 0.077 ng/ml ve 91-180 gün aralığında 0.043 ng/ml ortalama değer olarak hesaplandı. Hesaplanan değerler yaşa göre anlamlı olarak değişmekteydi.

Androjen yolağı için yaşa göre hesaplanan değerler aşağıdaki tabloda gösterilmektedir

Parametre (ng/ml)	Ortalama	25%	75%	2.5%	97.5%	Alt 95% GI	Üst 95% GI	p
Pregnenolon								
3-7 gün	0.452	0.103	0.403	0.049	2.524	0.279	0.624	< 0.0001
8-14 gün	1.950	0.236	1.309	0.175	9.032	0.815	3.084	
15-28 gün	0.873	0.203	0.759	0.111	4.598	0.475	1.272	
29-90 gün	0.792	0.305	0.829	0.151	2.835	0.549	1.034	
91-180 gün	0.618	0.289	0.930	0.104	1.544	0.519	0.716	
17OH-pregnenolon								
3-7 gün	0.335	0.108	0.444	0.049	1.084	0.261	0.410	0.0001
8-14 gün	1.435	0.629	1.845	0.270	4.221	0.940	1.930	
15-28 gün	1.095	0.284	1.252	0.053	5.513	0.660	1.529	
29-90 gün	1.003	0.154	1.484	0.040	3.585	0.719	1.286	
91-180 gün	0.854	0.199	1.260	0.050	3.014	0.598	1.110	
DHEA								
3-7 gün	1.212	0.096	0.776	0.0348	8.544	0.222	2.202	< 0.0001
8-14 gün	4.099	1.072	5.209	0.3924	15.10	2.395	5.803	
15-28 gün	1.968	0.159	2.968	0.0224	7.928	1.271	2.665	
29-90 gün	1.444	0.423	1.628	0.1589	7.052	0.993	1.895	
91-180 gün	0.964	0.290	1.088	0.0955	3.777	0.639	1.289	
DHEA-S								
3-7 gün	192.1	69.81	283.6	30.74	659.8	146.1	238.0	< 0.0001
8-14 gün	254.5	108.8	294.2	46.70	835.5	171.0	338.0	
15-28 gün	233.5	92.33	312.2	26.88	718.4	178.6	288.4	
29-90 gün	175.7	79.20	250.1	23.46	482.4	145.5	205.9	
91-180 gün	76.89	32.04	105.7	6.710	209.8	59.79	93.98	
Androstenedion								
3-7 gün	0.134	0.036	0.168	0.002	0.698	0.091	0.177	< 0.0001
8-14 gün	0.247	0.115	0.287	0.063	0.650	0.180	0.314	
15-28 gün	0.136	0.025	0.192	0.007	0.580	0.094	0.177	
29-90 gün	0.077	0.011	0.101	0.003	0.475	0.047	0.106	
91-180 gün	0.043	0.023	0.056	0.006	0.110	0.036	0.050	

Tablo 10-Androjenlerin yaşlara göre persantil değerleri

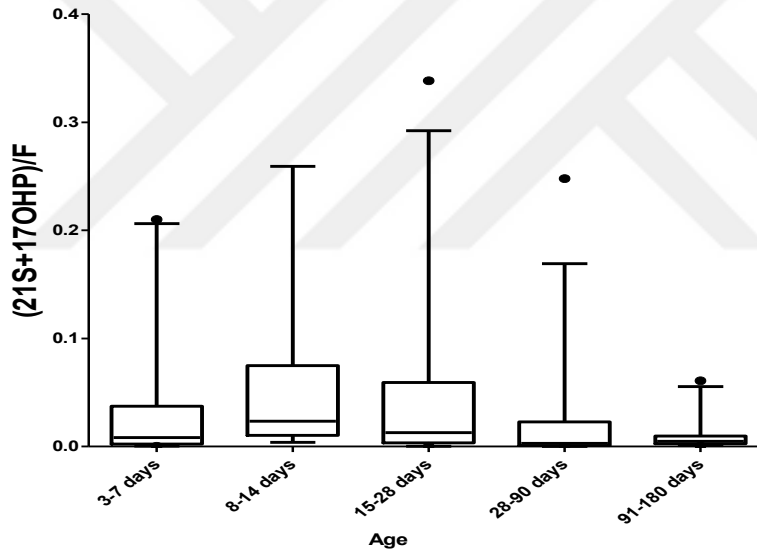
Tüm örnekler aynı kişiler tarafından aynı şartlarda çalışıldığı için spesifik hastalıklara özgü olarak oranlar geliştirildi.

21 deoksikortizol ve 17 hidrokspirogesteron toplamının kortizole oranı 21 hidrokstilaz eksikliği için önerdiğimiz oran olup aşağıdaki tabloda yaş

gruplarına göre bu oranın hesaplan ortalama değeri ve üst alt limit değeri görülmektedir.

	3-7 gün	8-14 gün	15-28 gün	28-90 gün	91-180 gün
Minimum	0.0002359	0.003879	0.0002845	0.00006534	0.0003608
25% Persentil	0.002398	0.01039	0.003445	0.0008438	0.002660
Medyan	0.008167	0.02357	0.01291	0.002921	0.004917
75% Persentil	0.03728	0.07487	0.05935	0.02289	0.009767
Maksimum	0.2101	0.2594	0.3384	0.2481	0.06088
Ortalama	0.02669	0.05286	0.04921	0.02075	0.008076
Std. Deviasyon	0.04375	0.06316	0.07244	0.04014	0.01013
Std. Hata	0.005512	0.01215	0.009768	0.004940	0.001228
Alt 95% güven aralığı	0.01567	0.02788	0.02962	0.01088	0.005624
Üst 95% güven aralığı	0.03771	0.07785	0.06879	0.03062	0.01053

Tablo 11-21 hidrosiaz eksikliği için kullanılan 21-deoksikortizol ve 17-hidroksiprogesteron toplamının kortizole oranının yaşa göre persantil değeri

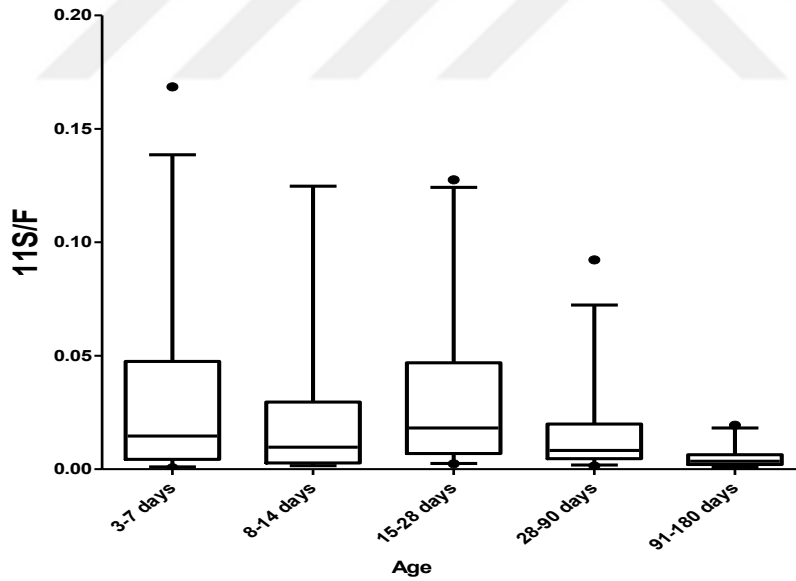


Şekil 50-21-deoksikortizol ve 17-hidroksiprogesteron toplamının kortizole oranının yaşa göre normal değeri-kutu grafik

11 deoksikortizolün kortizole oranı ise 11 beta hidroksilaz eksikliği için önerdiğimiz oran olup aşağıdaki tabloda yaşa göre hesaplanan ortalama değerler ve üst alt limitler verilmiştir.

	3-7 gün	8-14 gün	15-28 gün	28-90 gün	91-180 gün
Minimum	0.0006547	0.001578	0.002380	0.001431	0.0007318
25% Persentil	0.004338	0.002769	0.006931	0.004660	0.002042
Medyan	0.01461	0.009714	0.01815	0.008286	0.003521
75% Persentil	0.04754	0.02958	0.04690	0.01993	0.006418
Maksimum	0.1685	0.1247	0.1275	0.09227	0.01937
Ortalama	0.02908	0.01861	0.03315	0.01524	0.004525
Std. Deviasyon	0.03565	0.02530	0.03514	0.01610	0.003515
Std. Hata	0.004491	0.004869	0.004739	0.001981	0.0004263
Alt 95% güven aralığı	0.02011	0.008599	0.02365	0.01129	0.003674
Üst 95% güven aralığı	0.03806	0.02862	0.04265	0.01920	0.005376

Tablo 12- 11-beta hidroksilaz eksikliği için kullanılan 11-deoksikortizolün kortizole oranının yaşa göre persentil değerleri

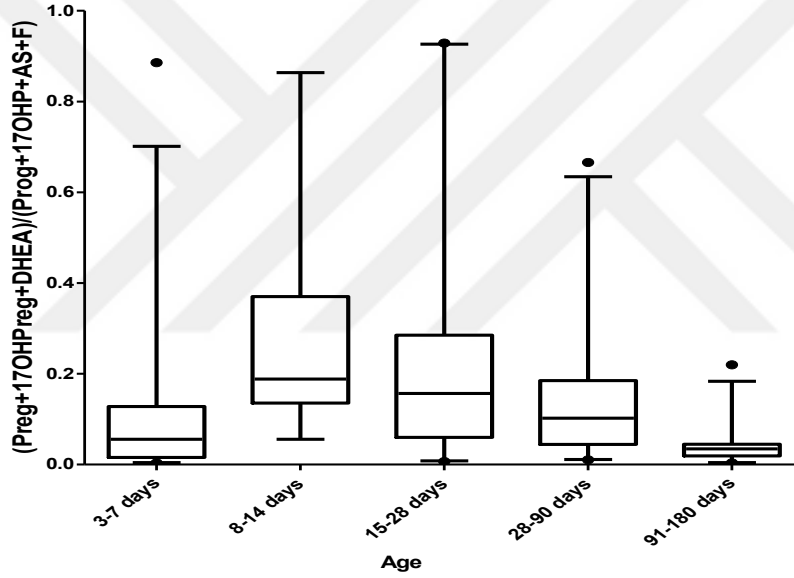


Şekil 51- 11 deoksikortizolün kortizole oranının yaşa göre normal değerleri-kutu grafik

Pregnenalon, 17 hidroksipregnenalon ve DHEA toplamının progesteron, 17-hidroksiprogesteron, androstenedion ve kortizol toplamına oranı 3 beta hidroksisteroid dehidrogenaz (3-BHSD) enzim eksikliği için önerdiğimiz oran olup yaşa göre değişen oranlar tabloda belirtilmiştir.

	3-7 gün	8-14 gün	15-28 gün	28-90 gün	91-180 gün
Minimum	0.003643	0.05588	0.006623	0.01040	0.003766
25% Persentil	0.01553	0.1353	0.05972	0.04450	0.01927
Medyan	0.05583	0.1884	0.1568	0.1021	0.03453
75% Persentil	0.1278	0.3700	0.2851	0.1849	0.04481
Maksimum	0.8858	0.8638	0.9288	0.6659	0.2199
Ortalama	0.1038	0.2642	0.2401	0.1514	0.04124
Std. Deviasyon	0.1511	0.2057	0.2369	0.1502	0.03906
Std. Hata	0.01904	0.03958	0.03194	0.01849	0.004737
Alt 95% güven aralığı	0.06572	0.1828	0.1760	0.1145	0.03179
Üst 95% güven aralığı	0.1418	0.3456	0.3041	0.1883	0.05070

Tablo 13- 3 BHSD eksikliğinde kullanılan pregnenolon, 17-OH pregnenolon ve DHEA toplamının progesteron, 17-OH progesteron, androstenedion ve kortizol toplamına oranının yaşa göre persantil değerleri

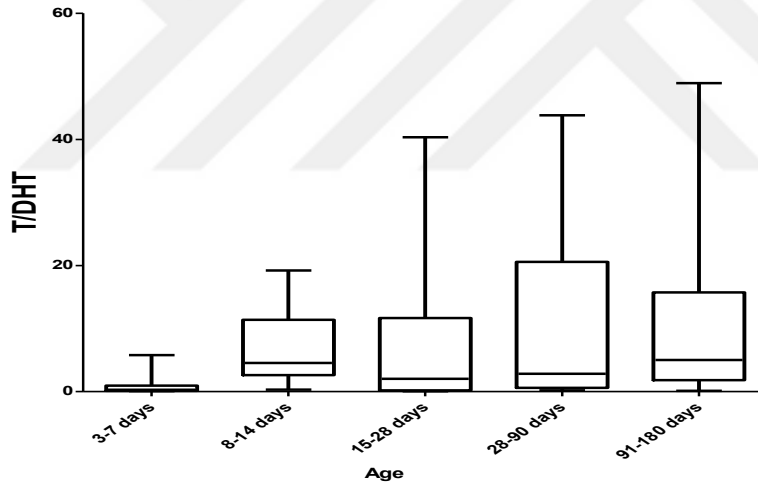


Şekil 52- Pregnenolon, 17-OH pregnenolon ve DHEA toplamının progesteron, 17-OH progesteron, androstenedion ve kortizol toplamına oranının yaşa göre normal değerleri-kutu grafik

Testesteronun dihidrotestesterona oranı ise 5 alfa reduktaz eksikliği için önerdiğimiz oran olup aşağıdaki tabloda yaşa göre ortalama değerleri ve üst alt limitleri belirtilmiştir. Bu oranların yaşla oranları belirgin değişkenlik göstermektedir. Ancak 5 alfa reduktaz aktivitesinin daha çok dokularda bulunduğu düşünülürse kanda hesaplanan oranlar 5 alfa reduktaz eksikliği tanısında yeterli olmayabilir.

	3-7 gün	8-14 gün	15-28 gün	28-90 gün	91-180 gün
Minimum	0.07229	0.2971	0.05263	0.1949	0.1317
25% Percentile	0.1293	2.612	0.1944	0.5783	1.813
Median	0.2750	4.558	2.026	2.831	4.990
75% Percentile	0.9518	11.36	11.67	20.55	15.73
Maksimum	5.800	19.19	40.32	43.79	48.90
Average	1.080	6.900	6.980	9.800	10.43
Std. Deviation	1.688	6.181	9.719	11.59	12.49
Std. error	0.3135	1.652	1.746	1.959	2.082
95% lower confidential interval	0.4382	3.331	3.415	5.819	6.204
95% upper confidential interval	1.723	10.47	10.55	13.78	14.66

Tablo 14-5 alfa hidroksilaz eksikliği için kullanılan testesteronun dihidrotestesterona oranının yaşa göre persantil değerleri



Şekil 53-Testesteronun dihidrotestesterona oranının yaşa göre normal değerleri-kutu grafik

5 TARTIŞMA

Steroid metabolizma bozukluğu olan hastalar hayatı tehdit eden krizlerle yenidoğan ve erken süt çocukluğu döneminde kliniklere başvuru edebileceği gibi uzun yıllar asemptomatik de kalabilir. Ölümle sonuçlanabilen bu hastalıkların tanısında, adrenal korteksten salınan hormonların plazmada doğru bir şekilde ölçümü çok önemlidir. Son yıllarda steroid ölçümünde referans yöntem olarak kullanılan LC/MSMS aynı anda birçok steroid hormonun ölçümüne olanak tanır ve oldukça hassas bir yöntemdir. Biz de çalışmamızda adrenal korteksten salınan 19 steroid hormonu eş zamanlı olarak ölçtük ve steroid hormon metabolizmasının en dinamik olduğu dönem olan yenidoğan ve erken süt çocukluğu için referans değerlerini belirlemeyi amaçladık. Literatürde ilk 6 ayda bu kadar fazla sayıda sağlıklı çocukta ve bu kadar sık aralıklarla ve altın standart ölçüm yöntemiyle referans değer belirleyen başka bir çalışma bulunmamaktadır.

Biz çalışmamızda Pregnenolon, 17-OH pregnenolone, Progesteron, 17-OH progesterone, Kortikosteron, Aldosteron, 11 deoksikortizol, Kortizol, Dihidroepiandrosteron (DHEA), dihidroepiandrosteron sülfat (DHEA-S), Androstenedion, Estrone, estradiol, Testesteron, 21 deoksikortizol, Kortizon, Androsteron, 11 deoksikortikosteron, Dihidrotesteron eş zamanlı olarak çalıştık. Literatürde bütün bu hormonları eş zamanlı ölçen bir çalışma bulunmamaktadır. Genel olarak ele alındığında glukokortikoidlerden sadece 11 deoksikortizol ve kortizol kız ve erkek arasında anlamlı farklılık göstermekteydi. Kızlarda 11-deoksikortizol ve kortizol düzeyleri daha yüksek bulundu. Diğer steroidlerde cinsiyetler arasında anlamlı farklılık bulunmadı ve konstanstrasyonları yaşa göre anlamlı farklılık göstermekteydi. Mineralokortikoid düzeyleri muhtemelen yaşla birlikte azalan renal tubuler direnç nedeniyle giderek azalmaktaydı. Adrenal androjenler ise gruplar arasında en çok varyabilite gösteren steroid hormonlardı. Genellikle ilk haftada en düşük düzeyde bulunan androjenler yaşamın ikinci haftasında en yüksek düzeye ulaştıktan sonra altıncı aya kadar muhtemelen fetal adrenal zonun involusyonu nedeni ile giderek azalmaktaydı.

Çalışmamıza birebir benzeyen bir çalışma bulunmamakla birlikte literatür incelendiğinde steroid referanslarını belirlemek için yapılan en geniş çalışma Fiet ve arkadaşlarının 2017’de yaptığı çalışma olup 28 klasik KAH tanılı hasta, 2 tane 21-hidroksilaz dışı KAH tanılı hasta ve 149 KAH olmayan yetişkinin yanında 10 normal preterm ve 20 normal term bebekte eş zamanlı olarak 16 steroid hormon LC-MS/MS yöntemi ile çalışılmıştır.²¹

Bizim çalışmamızda 17-hidroksiprogesteron değerleri 0.001 ng/ml ile 1.563 ng/ml değerleri arasında değişmekteydi. Çalışmamızda bulunan ortalama değerler ise 0.177 ng/ml ile 0.621 ng/ml arasında değişmekteydi. En yüksek ortalama 8-14 gün grubunda bulundu. Fiet ve arkadaşlarının (2017) çalışmasında da benzer alt ve üst değerler elde edilmiş olup ortalama değer çalışmamıza göre daha yüksek bulunmuştu.²¹ Ancak bu çalışmadan 10 günün altında 20 term bebekten alınan örneğin çalışıldığı düşünülürse aradaki farkın, fetal zonun involusyonundaki farklılığın kişiler arasında belirgin farklı olduğu bu dönemdeki örnek sayısının az olması nedeniyle olduğu düşünülebilir. Kulle ve arkadaşlarının (2013) te yaptığı çalışmada 17-hidroksiprogesteron değerleri 1 haftanın altındakilerde en yüksek iken 2 hafta- 2 ay ve 3-1 ay aralığında giderek azalmaktaydı²²

Çalışmamızda kortizol değerleri tüm yaş grupları ele alındığında 2,880 ng/ml ile 184 ng/ml arasında değişmekteydi. Fiet ve ark (2017) çalışmasında da 10 günün altındaki sağlıklı yenidoğanlarda bulunan değerler çalışmamızdaki 3-7 gün ve 8-14 gün grubu ile benzer özelliktedir.²¹

Progesteron değerleri yaptığımız çalışmada yaşla birlikte azalmaktadır. Kulle ve ark(2013) yaptığı çalışmada ise ilk 1 yaş içerisindeki hastalar 1 hafta altı, 2 hafta 2 ay ve 3-11 ay olarak sınıflandırılmış olup çalışmamızdakine benzer şekilde progesteron değerinin yaşla orantılı olarak azaldığı gösterilmiştir.²²

Çalışmamızda pregnanolon değerleri tüm yaş grupları ele alındığında 0,049 ng/ml ile 9,032 ng/ml değerleri arasında değişmekteydi. En yüksek değerler 8-14 gün grubunda saptanırken diğer gruplarda yaşla azalma eğilimindeydi. Magnisalli ve ark(2008) yaptığı çalışmada 16-40 gün aralığında bakılan değerler 9-15 güne göre daha yüksek bulunmuştu. Bu

çalışmada 9-15 gün aralığında 7 bebek, 16- 40 gün aralığında 9 erkek 10 erkek bebek toplamda 19 bebek çalışmaya alınmış ve çalışma GC-MS ile gerçekleştirilmiştir. Bu farklılık, hasta sayısının az olmasından kaynaklanıyor olabilir.²³

Çalışmamızda benzer şekilde DHEA düzeyleri de 8-14 gün aralığında en yüksek bulundu ve diğer yaşlarda giderek azalmaktaydı. Soldin ve ark(2009) yenidoğan ve 0-18 yaş arası 122 kişi arasında yaptığı çalışmada tek referans değeri verilmiş olup bu durum örneklemin küçük olmasına bağlanmıştır. Magnisalli ve arkadaşları ise ; pregnenolona benzer şekilde 16-40 gün aralığında 9-15 gün aralığına göre daha yüksek değerler elde etmiştir.

Androstenedion değerleri yaptığımız çalışmada 8-14 gün aralığında en yüksek değerlerde olup, yaşla birlikte giderek azalmaktadır. Kyriakopolou ve ark(2013) ise 0-19 yaş arasında 337 çocukta LC/MSMS yöntemi ile yaptıkları çalışmada 14 gün-1 yaş arasında ilk 14 güne göre daha yüksek değerler ölçmüşlerdir. Bu durum olasılıkla örneklem aralığının çok geniş olmasına bağlıdır.²⁴

6 SONUÇ

Steroidogenezin en değişken olduğu dönem ilk 6 ay olup, bu döneme ait normal değerlerin bilinmesi önemlidir. Bunun yanında steroidogenez bozukluğuna sahip hastaların büyük bir kısmı ilk 6 ayda kliniklere başvurmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız LC-MSMS yöntemi, steroid ölçümünde etkin bir yöntemdir ve az miktarda plazma ile ve farklı zamanlarda çeşitli uyarı testleri yapmadan , steroid metabolizmasına ve bu yolun hastalıklarına ilişkin oldukça spesifik bütüncül bir bilgi sağlar. Çalışmamızda bulduğumuz normatif değerlerin cinsiyet gelişim bozukluğu ve adrenal yetmezlik açısından tetkik edilen hastaların tanısına katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

7 EKLER

Çalışmaların yapılabilmesi için Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 09.2016.342 protokol kodlu başvuru yapılarak Nisan 2016 tarihinde onam alınmıştır.

Çalışmamız Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından finansmanı sağlanan, SAG-C-TUP-131216-0528 numaralı proje kapsamında yürütülmüştür.

ÖZGEÇMİŞ

Ad ve Soyad: Ece Öge ENVER

Doğum tarihi: 14.03.1989

Doğum Yeri : İstanbul, Türkiye

Adres : Yalı mah. Yalı-2 apartmanı no:7 daire:4
Maltepe/İstanbul

GSM : +90 532 717 36 38

E-mail : eceoge@gmail.com

Eğitim:

Lise:

İstanbul Köy Hizmetleri Anadolu Lisesi (2003-2007)-Okul birincisi

Üniversite:

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi (2007-2013)-Okul Altıncısı

Uzmanlık Eğitimi:

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları
Anabilim Dalı (2014 - halen)

Yabancı Diller:

İngilizce: İyi derecede

8 KAYNAKLAR

1. Hsieh S, White PC. Presentation of Primary Adrenal Insufficiency in Childhood. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011;96(6):E925-E928. doi:10.1210/jc.2011-0015.
2. Rossi C, Calton L, Hammond G, et al. Serum steroid profiling for Congenital Adrenal Hyperplasia using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 2010;411(3-4):222-228. doi:10.1016/j.cca.2009.11.007.
3. Kirac D, Guney AI, Akcay T, et al. The Frequency and the Effects of 21-Hydroxylase Gene Defects in Congenital Adrenal Hyperplasia Patients. *Annals of Human Genetics*. 2014;78(6):399-409. doi:10.1111/ahg.12083.
4. Galuska CE, Hartmann MF, Sánchez-Guijo A, et al. Profiling intact steroid sulfates and unconjugated steroids in biological fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Analyst*. 2013;138(13):3792–10. doi:10.1039/c3an36817c.
5. Belgorosky A, Baquedano MIAS, Guercio G, Rivarola MA. Adrenarche: Postnatal Adrenal Zonation and Hormonal and Metabolic Regulation. *Horm Res*. 2008;70(5):257-267. doi:10.1159/000157871.
6. Greaves RF, Jevalikar G, Hewitt JK, Zacharin MR. A guide to understanding the steroid pathway: New insights and diagnostic implications. *Clinical Biochemistry*. 2014;47(15):5-15. doi:10.1016/j.clinbiochem.2014.07.017.
7. Hammer GD, Parker KL, Schimmer BP. Minireview: Transcriptional Regulation of Adrenocortical Development. *Endocrinology*. 2005;146(3):1018-1024. doi:10.1210/en.2004-1385.
8. Anderson DJ. Molecular control of cell fate in the neural crest: the sympathoadrenal lineage. *Annu Rev Neurosci*. 1993;16(1):129-158. doi:10.1146/annurev.ne.16.030193.001021.
9. Kliegman RM, Stanton BMD, Geme JS, Schor NF, Behrman RE. *Nelson Textbook of Pediatrics*. Elsevier Health Sciences; 2011.
10. Miller WL, Auchus RJ. The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Endocrine Reviews*. 2011;32(1):81-151. doi:10.1210/er.2010-0013.
11. Hall JE, Guyton AC. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. Elsevier Health Sciences; 2015.

12. Turcu AF, Auchus RJ. Adrenal Steroidogenesis and Congenital Adrenal Hyperplasia. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2015;44(2):275-296. doi:10.1016/j.ecl.2015.02.002.
13. Auchus RJ, Lee TC, Miller WL. Cytochrome b5 augments the 17,20-lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(6):3158-3165. doi:10.1074/jbc.273.6.3158.
14. Guran T. Latest Insights on the Etiology and Management of Primary Adrenal Insufficiency in Children. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. December 2017. doi:10.4274/jcrpe.2017.S002.
15. Auron M, Raissouni N. Adrenal insufficiency. *Pediatr Rev*. 2015;36(3):92–102–quiz103–129. doi:10.1542/pir.36-3-92.
16. Guran T, Buonocore F, Saka N, et al. Rare Causes of Primary Adrenal Insufficiency: Genetic and Clinical Characterization of a Large Nationwide Cohort. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2016;101(1):284-292. doi:10.1210/jc.2015-3250.
17. Janzen N, Sander S, Terhardt M, et al. Rapid steroid hormone quantification for congenital adrenal hyperplasia (CAH) in dried blood spots using UPLC liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Steroids*. 2011;76(13):1437-1442. doi:10.1016/j.steroids.2011.07.013.
18. Taylor AE, Keevil B, Huhtaniemi IT. Mass spectrometry and immunoassay: how to measure steroid hormones today and tomorrow. *Eur J Endocrinol*. 2015;173(2):D1-D12. doi:10.1530/EJE-15-0338.
19. CLSI. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods; Approved Guideline*. CLSI Document C62-A. 2014.
20. Chace DH. *Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory: General Principles and Guidance; Approved Guideline*. 2007. doi:10.1016/b978-0-12-800871-3.00001-8.
21. Fiet J, Le Bouc Y, Guéchet J, the NHJO, 2017. A Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Profile of 16 Serum Steroids, Including 21-Deoxycortisol and 21-Deoxycorticosterone, for Management of *academicoupcom*
22. Kulle AE, Welzel M, Holterhus P-M, Riepe FG. Implementation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for eight adrenal C-21 steroids and pediatric reference data. *HRP*. 2013;79(1):22-31. doi:10.1159/000346406.

23. Magnisali P, Dracopoulou M, Mataragas M, Dacou-Voutetakis A, Moutsatsou P. Routine method for the simultaneous quantification of 17 α -hydroxyprogesterone, testosterone, dehydroepiandrosterone, androstenedione, cortisol, and pregnenolone in human serum of neonates using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2008;1206(2):166-177. doi:10.1016/j.chroma.2008.07.057.
24. Kyriakopoulou L, Yazdanpanah M, Colantonio DA, Chan MK, Daly CH, Adeli K. A sensitive and rapid mass spectrometric method for the simultaneous measurement of eight steroid hormones and CALIPER pediatric reference intervals. *Clinical Biochemistry*. 2013;46(7-8):642-651. doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.01.002.
25. CLSI. Mass spectrometry for Androgen and Estrogen Measurements in Serum. CLSI Document C57.2014.