

# Značaj određivanja kortizola u mokraći

---

Melvan, Lara

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:270939>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE

**Lara Melvan**

**ZNAČAJ ODREĐIVANJA KORTIZOLA U MOKRAĆI**

**Završni rad**

Split, 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE

**Lara Melvan**

**ZNAČAJ ODREĐIVANJA KORTIZOLA U MOKRAĆI  
THE IMPORTANCE OF CORTISOL MEASUREMENT IN  
URINE**

**Završni rad/Bachelor's thesis**

Mentor:

**doc. dr. sc. Nada Bilopavlović**

Split, 2023.

Sveučilište u Splitu

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija

Preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike

**Znanstveno područje:** Biomedicina i zdravstvo

**Znanstveno polje:** Kliničke medicinske znanosti

**Mentor:** doc.dr.sc. Nada Bilopavlović

### Značaj određivanja kortizola u mokraći

Lara Melvan

#### Sažetak:

**Cilj rada:** Cilj rada je odrediti koncentraciju kortizola u 24-satnoj mokraći pacijenata s uputnom dijagnozom poremećaja kore nadbubrežne žlijezde, interpretirati dobivene rezultate shodno patofiziološkim obilježjima pojedinih poremećaja kore nadbubrežne žlijezde te opisati važnost određivanja kortizola u uzorku 24-satne mokraće kao jednog od dijagnostičkih parametara za postavljanje dijagnoze i praćenje tijeka bolesti kod bolesnika s poremećajem kore nadbubrežne žlijezde.

**Materijali i metode:** Odabrano je 10 pacijenata KBC-a Split s uputnom dijagnozom koja je uključivala neki od poremećaja kore nadbubrežne žlijezde i zahtjev za određivanje koncentracije kortizola u 24-satnoj mokraći. Uzorci pacijenata obrađeni su i analizirani u Zavodu za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku prema protokolu proizvođača testa Roche „*Elecsys Cortisol*“ koji se odnosi na automatiziranu ECLIA metodu određivanja slobodnog kortizola u mokraći na analizatoru Cobas 6000.

**Rezultati:** Referentni interval za ovu metodu definiran od strane proizvođača je 100 – 379 nmol/dU. Četiri pacijenta imala su koncentraciju kortizola ispod 100 nmol/dU, pet pacijenata preko 379 nmol/dU, a jedan pacijent u rasponu 100 – 379 nmol/dU. Rezultati su tumačeni s obzirom na uputne dijagnoze pacijenata.

**Zaključak:** Koncentracija kortizola u mokraći nije dovoljan parametar za postavljanje dijagnoze, ali usmjerava daljnje pretrage i dovodi liječnika bliže odgovoru. Točnost i preciznost metode su preduvjeti ispravnog nalaza kao i pravilna obrada i rukovanje uzorkom o čemu ovisi ispravnost rezultata.

**Ključne riječi:** ACTH; ECLIA; kora nadbubrežne žlijezde; kortizol; 24-satna mokraća

**Rad sadrži:** 47 stranica, 17 slika, 3 tablice, 25 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR'S THESIS

**University of Split**

**University Department of Health Studies**

**Bachelor Study of Medical laboratory diagnostics**

**Scientific area:** Biomedicine and healthcare

**Scientific field:** Clinical medical sciences

**Supervisor:** Assistant professor Nada Bilopavlović

### **The importance of cortisol measurement in urine**

Lara Melvan

#### **Summary:**

**Objective:** The aim is to determine cortisol concentration in the 24-hour urine sample of patients with a referral diagnosis of adrenal cortex disorders, to interpret obtained results according to the pathophysiological characteristics of certain adrenal gland disorders and to describe the importance of determining cortisol in a 24-hour urine sample as one of the diagnostic parameters for establishing a diagnosis and monitoring the course of the disease for patients with adrenal gland disorder.

**Materials and methods:** 10 patients of UHC Split were selected with a referral diagnosis that included some of the adrenal cortex disorders and a request to determine the concentration of cortisol in 24-hour urine. Patient samples were processed and analyzed at the Department of Medical Laboratory Diagnostic according to the protocol of the manufacturer Roche "Elecsys Cortisol", using the automated ECLIA method for urinary free cortisol on the Cobas 6000 analyzer.

**Results:** The reference interval for this method defined by manufacturer is 100 – 379 nmol/dU. Four patients had a cortisol concentration below 100 nmol/dU, five patients above 379 nmol/dU, and one patient in the range 100 – 379 nmol/dU. The results were observed in the context of the referral diagnoses of the patients.

**Conclusion:** The cortisol concentration in urine is not a sufficient parameter to make a diagnosis, but it directs further diagnostic procedure and brings the doctor closer to the answer. The accuracy and precision of the method, correct sample processing and handling as well as proper sample are essential for correct results.

**Keywords:** ACTH; adrenal cortex; cortisol; ECLIA; 24-hour urine

**Thesis contains:** 47 pages, 17 figures, 3 tables, 25 references

**Original in:** Croatian

# SADRŽAJ

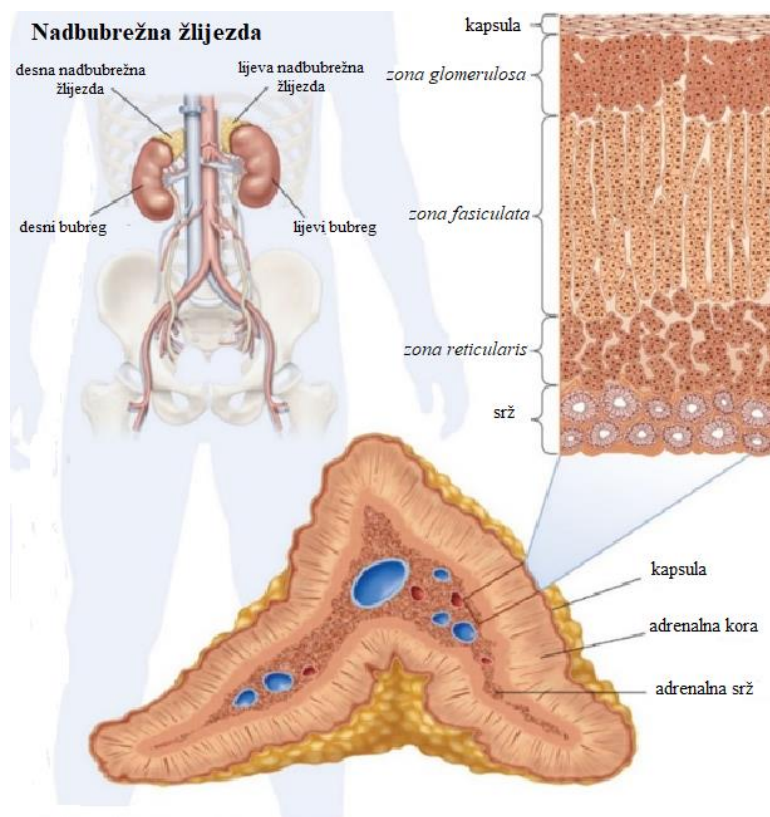
1. UVOD .....	1
1.1. Funkcija kore nadbubrežne žlijezde.....	1
1.2. Osovina hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda .....	3
1.3. Adrenokortikotropni hormon (ACTH) .....	4
1.4. Kortizol .....	5
1.5. Poremećaji funkcije kore nadbubrežne žlijezde .....	9
1.5.1. Adrenalna insuficijencija.....	10
1.5.2. Cushingov sindrom.....	11
1.5.3. Kongenitalna adrenalna hiperplazija (KAH).....	13
1.6. Kortizol u laboratorijskoj evaluaciji poremećaja kore nadbubrežne žlijezde..	13
2. CILJ RADA.....	16
3. MATERIJALI I METODE .....	17
3.1. Ispitanici.....	17
3.2. Metode .....	18
3.2.1. Protokol za prikupljanje 24-satne mokraće .....	18
3.2.2. Imunokemijsko određivanje kortizola u mokraći automatiziranom metodom ECLIA .....	20
3.2.2.1. Ekstrakcija i otapanje kortizola .....	21
3.2.2.2. Automatizirana ECLIA .....	22
4. REZULTATI.....	26
5. RASPRAVA.....	28
6. ZAKLJUČAK .....	35
7. LITERATURA.....	36
8. PRILOZI.....	39
9. SAŽETAK.....	40
10. SUMMARY .....	41
11. ŽIVOTOPIS .....	42

# 1. UVOD

## 1.1. Funkcija kore nadbubrežne žlijezde

Nadbubrežna žlijezda, lat. *glandula suprarenalis*, parna je žlijezda u sklopu endokrinog sustava smještena retroperitonealno iznad svakog bubrega. Svaka žlijezda je od pridruženog bubrega odijeljena tankim slojem masnog tkiva. Zajedno s bubregom obavijene su masnom čahurom što rezultira njihovom žutom bojom. (1)

Nadbubrežna žlijezda sastoji se od dva osnovna dijela koja su vidljiva na presjeku kao što je prikazano na slici 1 – srž (lat. *medulla*) i kora (lat. *cortex*). Srž i kora nadbubrežne žlijezde imaju različito embriološko podrijetlo te se razlikuju građom i funkcijom. Srž je središnji dio nadbubrežne žlijezde, a čini samo 10% njene ukupne mase. Kora nadbubrežne žlijezde odraslog čovjeka čini otprilike 90% cjelokupne mase žlijezde. Prevladava žljezdani epitel sastavljen od tri strukturno različite koncentrične zone. Od van prema unutra poredane su *zona glomerulosa*, *fasciculata* i *reticularis*. (1, 2)



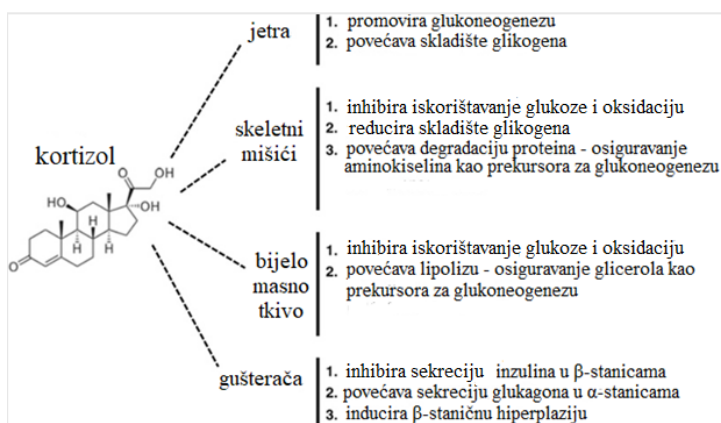
Slika 1. Histološki i anatomski prikaz nadbubrežnih žlijezda

Hormoni kore nadbubrežne žlijezde su steroidni hormoni, odnosno derivati kolesterola. Luči se tridesetak različitih hormona koji se skupno nazivaju kortikosteroidi. Mogu se podijeliti u tri skupine prema funkcijama pa tako razlikujemo mineralokortikoide, glukokortikoide i androgene. (4)

Mineralokortikoidi se luče iz *zone glomerulose*, a najpotentniji mineralokortikoidni hormon je aldosteron. Njegova primarna funkcija je održavanje homeostaze soli i vode poticanjem bubrega na zadržavanje natrija i vode, a izlučivanje kalija. (2, 4)

*Zona fasciculata* i *zona reticularis* djeluju kao funkcionalna jedinica koja stvara druge dvije vrste hormona. Adrenalni androgeni imaju znatno manji fiziološki značaj u odnosu na druge dvije vrste hormona. Luče se uglavnom prekursori testosterona: androstendion, dehidroepiandrosteron (DHEA) i DHEA-sulfat. Pretvaraju se u testosteron u drugim tkivima. Kod žena su odgovorni za neke sekundarne spolne karakteristike. Također su potrebni za sintezu estrogena. (2, 4)

Glukokortikoidi su najpoznatiji po svom protuupalnom i imunosupresivnom djelovanju. Osnovna funkcija im je podizanje koncentracije glukoze u krvi, ponajprije procesom glukoneogeneze koji predstavlja sintezu glukoze iz neugljikohidratnih spojeva, najčešće aminokiselina, laktata i glicerola. Sudjeluju u regulaciji metabolizma ugljikohidrata, masti i bjelančevina. Najvažniji predstavnik je kortizol, tzv. „*hormon stresa*“, koji glukokortikoidnim i vazokonstriktivnim djelovanjem priprema tijelo na stres. Njegovo djelovanje na pojedina tkiva prikazano je na slici 2. Učinci kortizola usmjereni su na osiguravanje dovoljne količine energije i održavanje visokog krvnog tlaka kako bi se tijelo moglo nositi sa stresnim situacijama (fizički, emocionalni, socijalni, biološki stres...). (4, 5, 6)



Slika 2. Biokemijska djelovanja kortizola (7)



Rad kore nadbubrežne žlijezde reguliran je učinkom dva mehanizma. Renin-angiotenzin-aldosteron sustav (RAAS) utječe na lučenje mineralokortikoida. S druge strane, hipofiza kontrolira rad kore preko adrenokortikotropnog hormona, odnosno kortikotropina (ACTH), sastavnog dijela „hormonske osovine“ koja se aktivira kao reakcija na različite podražaje koje skupnim nazivom zovemo stres. (4, 5)

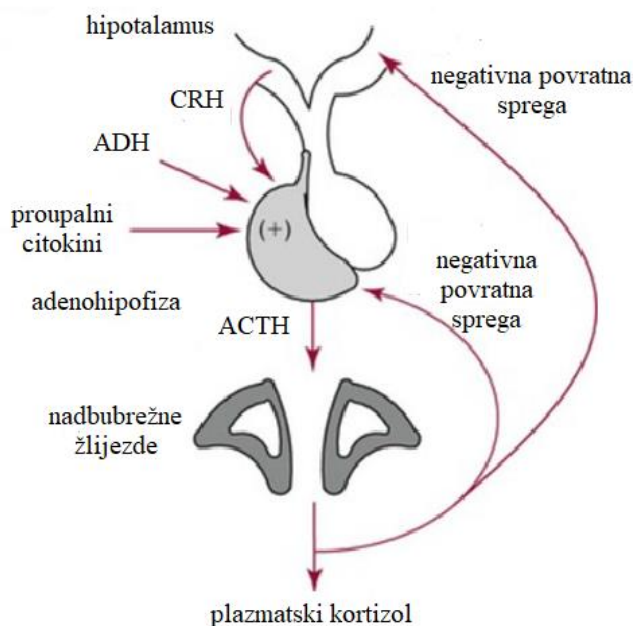
## **1.2. Osovina hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda**

Lučenje glukokortikoida regulirano je djelovanjem osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (eng. „*hypothalamic-pituitary-adrenal axis*“, HPA osovina). Podražaji za pokretanje osovine su neuroendokrini i psihofizički čimbenici kao npr. stres, strah, nesreće, traume itd. Takvi čimbenici djeluju na prijenos neurotransmitora; acetilkolina, serotoninina i noradrenalina, iz neurona na stanice hipotalamusa gdje reguliraju cirkadijalno i epizodno otpuštanje kortikotropin-oslobađajućeg hormona (CRH). Taj hormon stiže u prednji režanj hipofize (adenohipofizu) hipotalamičko-hipofiznim portalnim sistemom gdje regulira isto tako cirkadijalno lučenje polipeptidnog adrenokortikotropnog hormona (ACTH). (4, 5, 6)

Kortikotropin (ACTH) se na poticaj CRH otpušta u hipofizne kapilare iz kojih ulazi u sistemski krvotok i tako dolazi do nadbubrežne žlijezde. Djeluje na stanice kore nadbubrežne žlijezde stimulirajući ih na biosintezu kortizola. Manjim dijelom utječe i na sintezu aldosterona. Veže se na specifične receptore koji se nalaze na površini stanica kore čime aktivira enzim adenil-ciklazu te se stvara ciklički adenozin-monofosfat (cAMP), drugi hormonski glasnik, koji dalje prenosi hormonsku poruku. Stimulira protein-kinazu na fosforilaciju i aktivaciju kolesterol-ester-hidroksilaze stvarajući malu enzimsku kaskadu koja dovodi do oslobađanja kolesterola iz estera koji tako postaje dostupan za sintezu kortizola. Dužim djelovanjem ACTH pokreće se transkripcija gena drugih enzima koji sudjeluju u sintezi kortizola. (4, 5, 6, 8, 9)

Kortizol negativnom povratnom spregom utječe na lučenje CRH i ACTH. To znači da serumske koncentracije kortizola utječu na lučenje ta dva hormona tako da povećana koncentracija kortizola dovodi do smanjenog lučenja CRH i ACTH, a smanjena koncentracija do povećanog lučenja. Negativna povratna sprega je ključan način regulacije funkcioniranja cijele osovine. Njeno održavanje je osnova za održavanje

fizioloških koncentracija svih komponenti osovine. Cjelokupan proces regulacije prikazan je na slici 3. (4, 6, 8, 9)



Slika 3. Mehanizam HPA osovine (6)

### 1.3. Adrenokortikotropni hormon (ACTH)

Polipeptidni adrenokortikotropni hormon (ACTH), odnosno kortikotropin, hormon je prednjeg režnja hipofize koji se još naziva i adenohipofiza. Luči se na poticaj CRH u sklopu HPA osovine, a ime mu ukazuje na djelovanje obzirom da djeluje na koru nadbubrežne žlijezde. Proopiomelanokortin (POMC) koji je smješten u kortikotropnim i melanotropnim stanicama hipotalamusa i hipofize je prekursor ACTH. Njegovim cijepanjem u adenohipofizi nastaje pro-ACTH iz kojeg dalje nastaje ACTH. (4, 6)

Osnovna funkcija ovog hormona je stimulacija nadbubrežne žlijezde na lučenje kortikalnih hormona, odnosno steroida. Stimulira proliferaciju stanica kore te potiče njihovu sekreciju. Usko je povezan s kortizolom te uvjetuje njegovo lučenje u stresnim stanjima. Djeluje preko receptora kore nadbubrežne žlijezde, a vezanjem za receptore potiče sintezu i otpuštanje kortizola u krvotok. Lučenje samog ACTH regulirano je negativnom povratnom spregom koju stvara kortizol te povišene koncentracije kortizola inhibiraju lučenje ACTH. Obzirom da su poticaji za lučenje kortizola ujedno poticaji za

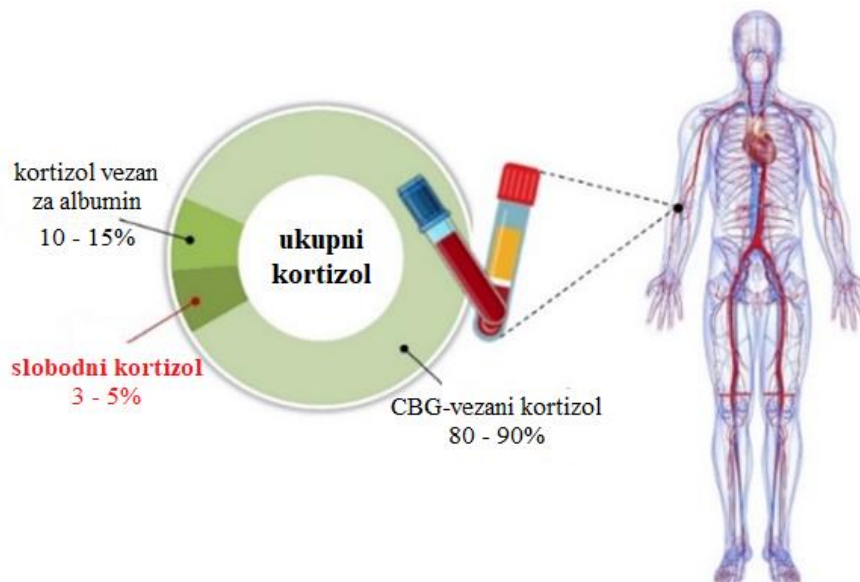
lučenje CRH, odnosno ACTH, ovaj hormon prati dnevno lučenje kortizola što znači da mu je najviša koncentracija otprilike dva sata prije buđenja. (4, 6, 8, 9)

Djelovanje kore nadbubrežne žlijezde uvelike ovisi o pravilnom lučenju i djelovanju ACTH, stoga je normalan bioritam tog hormona preduvjet za normalan bioritam steroidnih hormona nadbubrežne žlijezde. Svi poremećaji ACTH reflektiraju se na koru nadbubrežne žlijezde remeteći joj rad što je najočitiije u patološkim razinama kortizola. (8, 9)

#### **1.4. Kortizol**

Nadbubrežna žlijezda najviše doprinosi biokemijskom metabolizmu makromolekula preko kortizola. Kortizol čini 80% svih kortikosteroida u krvi. Nakon sinteze u konačni aktivni oblik odmah se izlučuje u krvotok jer ne postoji unutarstanično skladište ovog hormona. (4, 5, 6)

Zbog svoje kemijske strukture kortizol je lipofilan i hidrofoban što ga čini slabo topivim u krvnoj plazmi pa je njegov samostalan prijenos krvotokom usporen i otežan. Problem topivosti rješava proteinski nosač koji hormon prenosi do ciljnih stanica. Kortizol ne može biti metaboliziran dok je vezan za nosač što mu znatno produžuje poluvijek života u plazmi. Vrijeme poluraspada ( $t_{1/2}$ ) kortizola vezanog na nosač je 1,5 do 2 sata. Međutim, samo slobodan oblik je biološki aktivan. Glavni nosač u plazmi po svojoj kemijskoj strukturi je  $\alpha$ -globulin, a naziva se transkortin ili globulin koji veže kortikosteroide (eng. *corticosteroid binding globulin*, CBG). Osnovna zadaća CBG je da štiti kortizol od inaktivacije i jetrene konjugacije čime osigurava dovoljnu koncentraciju kortizola u cirkulaciji. Nosač, u manjoj mjeri, može biti i albumin. Kortizol se veže za CBG visokim afinitetom, dok je za albumin vezan niskim afinitetom. Nevezani, tj. slobodni kortizol u plazmi čini 3 do 5% ukupnog plazmatskog kortizola i predstavlja biološki aktivnu frakciju što znači da samo slobodni kortizol postiže fiziološke učinke. Za postizanje svojih učinaka kortizol se od proteinskih nosača mora odvojiti u kapilarama da bi mogao doći do svojih intracelularnih receptora ciljnih stanica. Udio kortizolskih frakcija u krvi prikazan je na slici 4. (5, 9, 10)



Slika 4. Kortizolske frakcije u plazmi (10)

Prekursor svih hormona kore nadbubrežne žlijezde je kolesterol, pa tako i kortizola. Kolesterol u nadbubrežnu žlijezdu dopijeva većim dijelom iz plazme, a manji dio nastaje *in situ* sintezom iz acetil-koenzima A (acetyl-CoA). Većina kolesterola u nadbubrežnoj žlijezdi je esterificirana i uskladištena u citoplazmatske lipidne kapljice. Iz tih kapljica oslobađa se na poticaj ACTH. Početak steroidogeneze isti je za sve steroidne hormone, a glavni enzim u tim stadijima je  $17\alpha$ -hidroksilaza. Biosinteza kortizola primarno je vezana za *zonu fasciculatu* kore. Glavni enzim koji sintezu usmjerava kortizolskim putem je  $21\alpha$ -hidroksilaza, a enzim koji završno stvara kortizol je  $11\beta$ -hidroksilaza. (4, 5, 6)

Jetra, manjim udjelom bubreg i probavni sustav odgovorni su za eliminaciju kortikosteroida. Kortizol u jetri podliježe redukciji u hidrofilnije spojeve preko reduktaza i dehidrogenaza. Konkretno iz kortizola nastaju 4 stereoizomera koji se skupno nazivaju kortoli. Ti se spojevi dalje mogu konjugirati s glukuronskom i sumpornom kiselinom čime se dodatno povećava topivost u vodi pa se tako konjugirani izlučuju mokraćom. Oko 2% kortizola, odnosno slobodna frakcija, izlučuje se nepromijenjeno mokraćom. (4, 6)

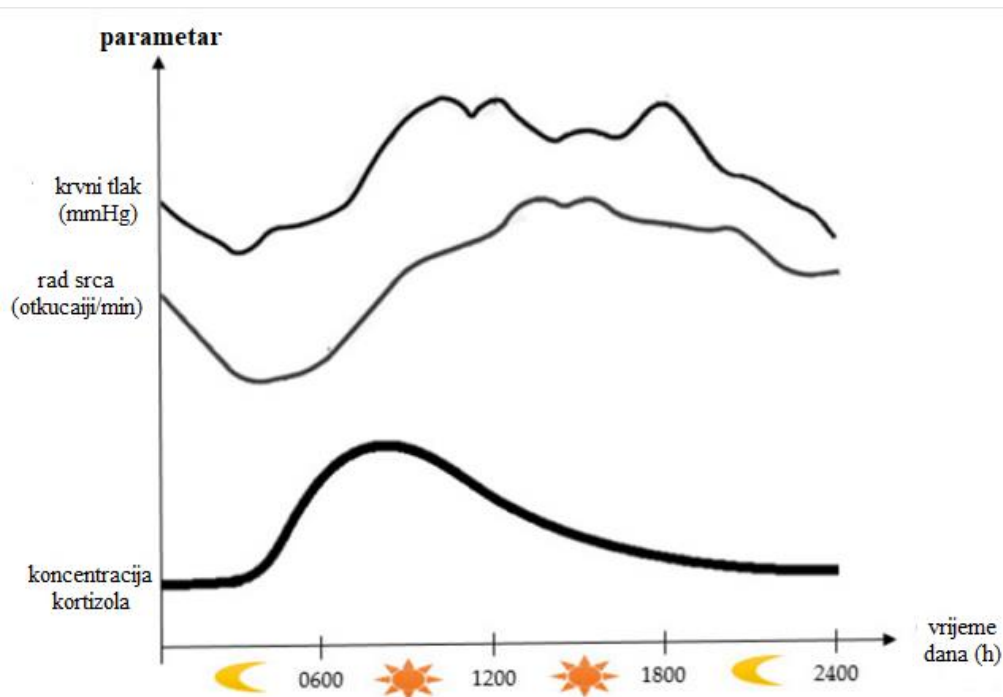
Kortizol pripada skupini glukokortikoida što znači da mu je osnovna zadaća podizanje razine glukoze u krvotoku, odnosno funkcionira kao „promotor“ glukoneogeneze. Ovaj hormon također uzročno-posljedično dovodi do povećane razgradnje proteina zbog povećane potražnje za aminokiselinama što rezultira

kataboličkim djelovanjem na koštani matriks i mišiće. Potiče odlaganje glikogena u jetri i lipolizu čime dovodi do povećanja slobodnih masnih kiselina. Svojim djelovanjem na metabolizam u mozgu utječe na ponašanje i raspoloženje. U manjoj mjeri pokazuje i neka mineralokortikoidna djelovanja. Povećava glomerularnu filtraciju i općenito protok krvi kroz bubrege. Glukokortikoidnim djelovanjem povećava lako dostupnu energiju u cirkulaciji jer je najbrži način dobave energije glikoliza. Dakle, doprema energiju nauštrb energetske zaliha tijela. Pojačava rad srca, mijenja kognitivne sposobnosti, inhibira rast, imunosni i upalni odgovor te reprodukciju. Takve promjene su osnovni adaptacijski odgovor na akutni stres jer se tako postiže manje iskorištavanje brze i lako dostupne energije u obliku glukoze. Odgađa anaboličke reakcije do uklanjanja stresnih podražaja. (4, 6, 11)

Među najvažnijim funkcijama kortizola nalazi se i imunosupresivno, odnosno protuupalno djelovanje. U akutnim stanjima kortizol inhibira vazodilataciju i povećava vaskularnu permeabilnost što usporava migraciju leukocita na mjesta upale. Mijenja distribuciju i promet leukocita, ali i u samome startu njihovu diferencijaciju te utječe na dužinu njihova života. Time ukupno usporava imunosni odgovor organizma. Osnova svih tih učinaka leži u potiskivanju transkripcije gena koji kodiraju za sintezu proinflammatoryh citokina i kemokina, staničnih adhezijskih molekula te enzima uključenih u bilo koji dio upalnog odgovora. (12)

Svoje fiziološke funkcije kortizol postiže preko glukokortikoidnih receptora (GR). Može djelovati i preko mineralokortikoidnih receptora (MR) koji imaju visok afinitet za kortizol čak i u malim koncentracijama. Ovi receptori se nalaze u citoplazmi ciljnih stanica te kortizol prvo mora difundirati u stanice da bi došao do svojih receptora. Vežanje liganda, odnosno hormona, za receptor uzrokuje njegovu konformacijsku promjenu i disocijaciju proteina toplinskog stresa 90 (eng. *heat shock protein 90*, hsp90) koji je do tog momenta vezan na receptor. Aktivirani receptor ulazi u jezgru stanice te se visokim afinitetom veže za specifičan slijed DNA koji se zove element odgovora na glukokortikoide (eng. *glucocorticoid response element*, GRE). Ovakav događaj uzrokuje udruživanje nekoliko koregulatora transkripcije što rezultira povećanjem transkripcije, a na tome se temelji kompletno glukokortikoidno djelovanje. Široka distribucija GR i MR po tijelu omogućuje raznovrsnost djelovanja te uvjetuje intenzitet djelovanja kortizola. (5, 6)

Kortizol ima dnevni cirkulacijski ritam. Taj ritam se odvija u sklopu sveukupnog cirkadijalnog ritma organizma, odnosno periodičkog obrasca koji se ponavlja unutar 24 sata. Cirkadijalni ritam prati cikluse dan-noć te služi za prilagođavanje tijela uvjetima okoliša i prema tome regulira biološke funkcije. Jedan od najvažnijih cikličkih procesa u tijelu usko povezanih s cirkadijalnim ritmom je spavanje pa su mnogi biokemijski i metabolički putevi regulirani putem ciklusa spavanja. Kortizol između ostalog djeluje kao „inhibitor“ spavanja jer promiče REM fazu (eng. „*rapid eye movement*“) u kojoj najčešće dolazi do buđenja, odnosno inhibira non-REM fazu spavanja. Fiziološki normalan cirkadijalni ritam kortizola je vrlo specifičan i usko povezan s ciklusima spavanja. Ako praćenje započnemo od početka spavanja, kortizol prije i tijekom samog usnivanja cirkulira u znatno niskim koncentracijama. Pri samom kraju spavanja počinje rasti, a svoj vrhunac doživljava neposredno nakon buđenja. Pretpostavlja se da kortizol u principu i sudjeluje u samom procesu buđenja. To se može primijetiti i preko učinaka kortizola na krvni tlak i brzinu otkucaja srca koji počnu rasti nedugo nakon buđenja kao što je prikazano na grafu na slici 5. Nakon buđenja koncentracija kortizola počne padati i ovisi o vanjskim stimulacijama u vidu stresa, događaja i sl. što je povezano s lučenjem CRH i ACTH. Naglo počne padati predvečer i svoj plato doživljava pred spavanje pa prelazi u novi ciklus. (13, 14)



Slika 5. Dnevne varijacije koncentracija kortizola, otkucaja srca i krvnog tlaka (13)

Biološki ritmovi CRH i ACTH paralelno prate ritam kortizola pa je njihova koncentracija najviša ujutro i postepeno se smanjuje tijekom dana, osim kada reagiraju na vanjske stimulacije. To se postiže bržim lučenjem ACTH, odnosno CRH ujutro, a sporijim navečer. Kortizol se luči 5 do 10 minuta nakon ACTH. (4, 13, 14)

### 1.5. Poremećaji funkcije kore nadbubrežne žlijezde

Poremećaji hormona nadbubrežne žlijezde zapaženi su već u 19. st. Funkcija kore nadbubrežne žlijezde može biti promijenjena u vidu hipokortizma ili hiperkortizma. Etiološki, poremećaji mogu biti primarni, kao rezultat bolesti same žlijezde, ili sekundarni, kao posljedica bolesti drugih organa, konkretno hipofize, u nekim slučajevima hipotalamusa što se opisuje kao tercijarni poremećaj. Najznačajniji klinički pokazatelj poremećaja kore nadbubrežne žlijezde je odstupanje kortizola od fizioloških granica. Promjene serumskih ili plazmatskih koncentracija kortizola i ACTH u različitim tipovima poremećaja prikazani su u tablici 1. (6)

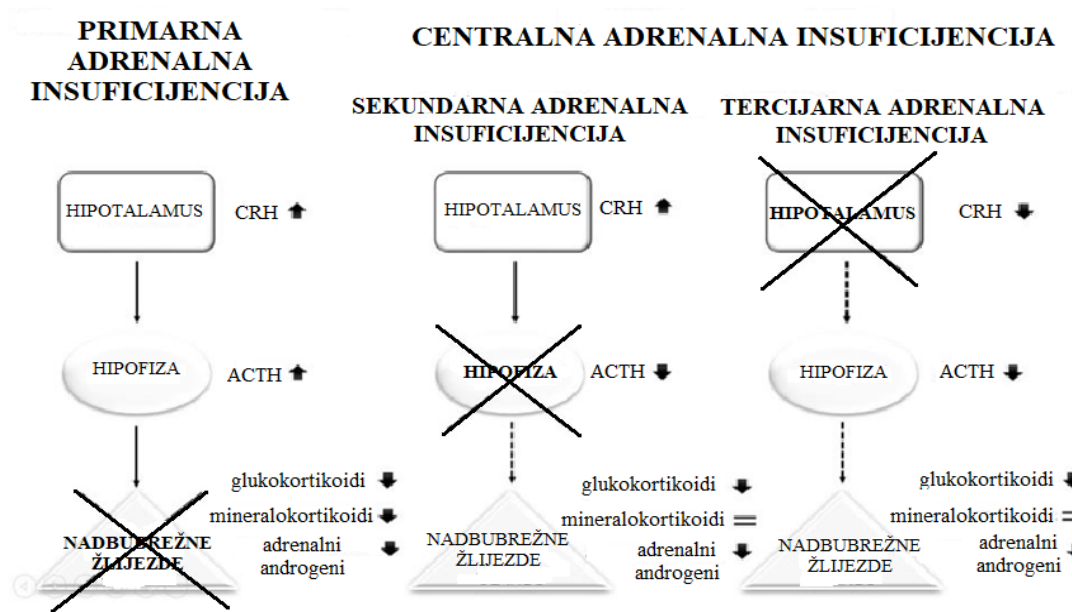
Tablica 1. Promjena koncentracija kortizola i ACTH u različitim poremećajima

Poremećaj	KORTIZOL	ACTH
primarni hipokortizam	↓	↑
sekundarni hipokortizam	↓	↓
primarni hiperkortizam	↑	↓
sekundarni hiperkortizam	↑	↑

Glavni kriterij razlikovanja primarnih od sekundarnih poremećaja je očuvanje negativne povratne sprege, odnosno koncentracija ACTH. Kod primarnih poremećaja s problemom u samoj žlijezdi, odnosno kori nadbubrežne žlijezde, negativna povratna sprega je očuvana pa tako povišena koncentracija kortizola u krvi dovodi do smanjene koncentracije ACTH u krvi, a snižena koncentracija kortizola u krvi do povećane koncentracije ACTH u krvi. Sekundarni poremećaji nemaju očuvanu povratnu spregu jer problem i jest poremećeno lučenje ACTH. Pojačano lučenje ACTH dovodi do pojačanog lučenja kortizola, a nedostatak ACTH uzrokuje nedostatak kortizola. Međutim, lučenje ACTH je u ovom slučaju neovisno o koncentraciji kortizola u krvi. (6, 15)

### 1.5.1. Adrenalna insuficijencija

Adrenalna insuficijencija podrazumijeva po život opasno stanje u kojem dolazi do smanjenih koncentracija hormona kore nadbubrežne žlijezde, u prvom redu kortizola. Također se manifestira kao primarna, sekundarna, a moguće i tercijarna. Mehanizmi u pozadini različitih tipova adrenalne insuficijencije s pridruženim posljedicama lučenja hormona prikazani su na slici 6. (4, 6, 15)



Slika 6. Mehanizmi adrenalne insuficijencije (15)

Primarna adrenalna insuficijencija, znana i kao Addisonova bolest, rezultat je oštećenja ili poremećaja funkcije kore nadbubrežne žlijezde. Bolest je najčešće nasljedna, kroničnog tipa s patofiziologijom u kojoj leži razvojni poremećaj nadbubrežne žlijezde, poremećaj steroidogeneze, rezistencija na ACTH ili progresivno oštećenje žlijezde. Može se pojaviti samostalno ili u sklopu poliendokrinopatije. (6, 15)

Sekundarna adrenalna insuficijencija nastaje lančano preko HPA osovine jer je primarni problem u hipofizi pa u krvotoku nalazimo smanjene koncentracije ACTH koje dovode do smanjenih koncentracija kortizola. Kroz literaturu se spominje i tercijarna adrenalna insuficijencija u kojoj je manjak kortizola uzrokovan manjkom CRH. Ova dva tipa insuficijencije skupno se nazivaju centralna adrenalna insuficijencija. U oba slučaja poremećena je sinteza i sekrecija tih hormona. Genetski uzroci su rijetki, češće su



poremećaji posljedica tumora, ozljeda ili infekcija hipotalamusno-hipofizne regije ili dugoročne terapijske primjene glukokortikoida. Ovi poremećaji rijetko za manifestaciju imaju samo adrenalnu insuficijenciju. (6, 15)

Simptome adrenalne insuficijencije prvi je opisao Thomas Addison 1865. Opisuje opću malaksalost, slabost srčane funkcije, razdražljivost želuca i osebujnu promjenu pigmentacije kože danas znanu kao hiperpigmentacija. Danas su nadodani još neki simptomi kao: umor, mučnina, gubitak apetita i tjelesne težine, povraćanje, abdominalna bol, bol u mišićima i zglobovima, žudnja za soli te posturalna hipotenzija. Dolazi i do poremećaja elektrolita, u prvom redu hiponatrijemije i hiperkalijemije, a moguća je i metabolička acidoza. Svi navedeni simptomi posljedica su manjka kortizola, odnosno hipoglikemije i izostanaka ostalih učinaka ovog hormona, ali i aldosterona. U bolesnika sa sekundarnom insuficijencijom izostaje hiperpigmentacija i manjak aldosterona pa ne dolazi do značajne promjene elektrolita. (6, 15)

Bolest se odražava na psihičkoj i kognitivnoj razini također zbog utjecaja kortizola na procese spavanja i pamćenja. Zbog deprivacije spavanja i općenito niskih koncentracija kortizola bolesnici su iritabilni i teže podnose stres, pa tako i emocionalni. Ljutnja, anksioznost i depresija pojavljuju se kod značajnog broja oboljelih od ove bolesti. Zbog smanjenih kognitivnih sposobnosti nastupa frustracija. (14)

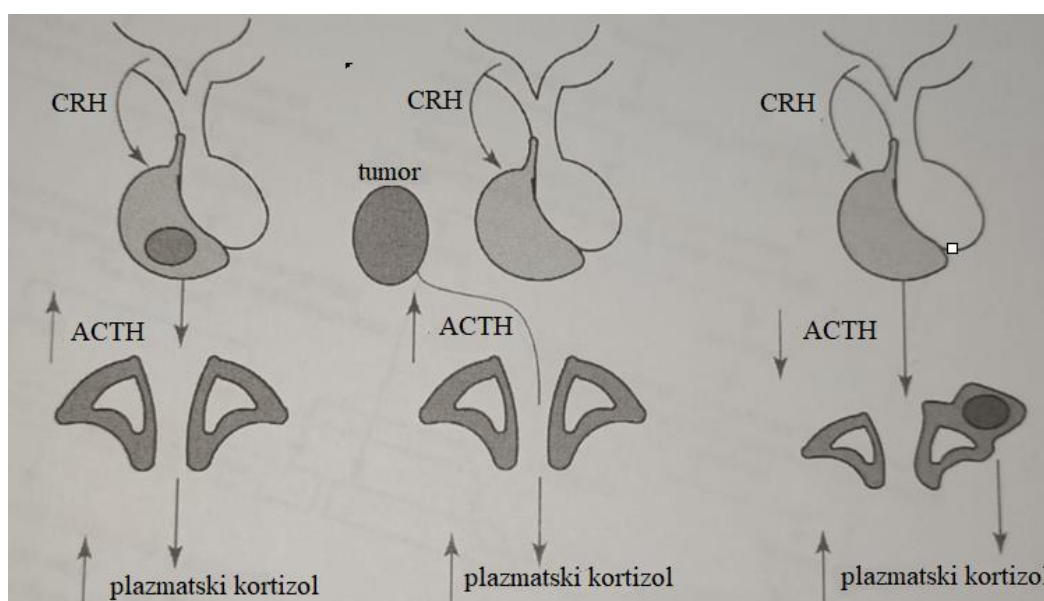
Obzirom da se radi o letalnoj bolesti kroničnog tijeka neophodna je doživotna nadomjesna terapija glukokortikoida, uz mineralokortikoide kod primarne insuficijencije. Kao glukokortikoidna nadoknada najčešće se koristi oralni hidrokortizon, prednizon ili kortizon acetat. Za nadoknadu mineralokortikoida koristi se fludrokortizon koji regulira promet natrija i kalija. Vrlo je bitno doziranje i vrijeme uzimanja lijekova da bi se postigla dostatna imitacija dnevnog ritma lučenja hormona. (14, 15)

### **1.5.2. Cushingov sindrom**

Prema definiciji, Cushingov sindrom predstavlja hiperkortizolizam bilo koje etiologije. Povezan je s brojnim komorbiditetima: hipertenzijom, koagulopatijama, kardiovaskularnim bolestima, šećernom bolešću, frakturama, infekcijama itd. Posljedice su direktna slika fiziološki prevelike koncentracije kortizola koja rezultira hiperglikemijom, povećanim katabolizmom proteina i poremećenim metabolizmom

masti. Obzirom na ozbiljne posljedice, jasno je da je iznimno važno bolest otkriti u ranijim stadijima. Glavni simptomi bolesti su: gojaznost centralnog tipa, ljubičaste strije, miopatija, hipertenzija, hirzurtizam, psihički poremećaji itd. Često je prisutna i hipokalemična alkalozna. (6, 15, 16)

Primarni poremećaj, ACTH neovisan, rjeđi je od sekundarnog. ACTH ovisan poremećaj naziva se Cushingova bolest. Uzrok prekomjernog ACTH može biti pituitaran ili ektopičan, ali u svakom slučaju dovodi do hiperplazije kore nadbubrežne žlijezde. Iznimno rijetko do bolesti dovodi višak CRH kao tercijarni poremećaj. Na slici 7 prikazani su mehanizmi nastanka endogenog sindroma gdje lijevi prikaz predstavlja Cushingovu bolest, srednji ektopični ACTH sindrom, a desni adrenalni sindrom. (6, 15)



Slika 7. Mehanizmi nastanka endogenog Cushingovog sindroma (6)

Bolest se može liječiti na više načina, ovisno o uzroku. Ukoliko se radi o tumorskoj izraslini, hipofize, ektopičnom tumora koji stvara ACTH ili tumoru adrenalnog podrijetla, rješenje je kirurško otklanjanje. Kod adrenalnih izraslina izbor je jednostrano otklanjanje žlijezde, ali je potrebna doživotna glukokortikoidna supstitucija hormona. Za snižavanje koncentracija kortizola koriste se inhibitori steroidogeneze i antagonisti glukokortikoida, ali je vrlo bitno praćenje koncentracija kortizola i ACTH tijekom terapije. Najnovija istraživanja sugeriraju da bi inhibitori proopiomelanokortin (POMC) transkripcije mogli u budućnosti imati veliku važnost u liječenju Cushingove bolesti jer bi kočili sintezu ACTH i time smanjivali njegovu koncentraciju u cjelokupnoj cirkulaciji. (9, 16)

### **1.5.3. Kongenitalna adrenalna hiperplazija (KAH)**

Poremećena funkcija kore nadbubrežne žlijezde može biti posljedica poremećene sinteze njenih hormona zbog poremećaja enzima koji sudjeluju u sintezi. Najčešći uzrok adrenokortikalne insuficijencije u novorođenčadi je kongenitalna adrenalna hiperplazija (KAH) kod koje dolazi do nedostatka kortizola uz pretjeranu produkciju adrenalnih androgena. Zbog manjka kortizola dolazi do pojačanog stvaranja ACTH koji stimulira koru žlijezde i dovodi do njene hiperplazije *in utero*. (6, 15)

Bolest je genetska, a osnova su mutacije gena adrenokortikalnih enzima koji su odgovorni za sintezu kortizola s posljedičnim gubitkom njihove funkcije. Nasljeđuje se po autosomno recesivnom obrascu. Najčešće su pogođeni 21 $\alpha$ -hidroksilaza i 11 $\beta$ -hidroksilaza, a ostali su iznimno rijetko pogođeni. (6, 15)

Nepravilna biosinteza kortizola dovodi do nakupljanja prekursora kortizola koji su zapravo androgeni pa se stoga radi o nakupljanju androgena. To dovodi do virilizacije ženske djece, dok su muška djeca najčešće nepogođena u vidu spolnog sazrijevanja. Osim toga, prevladavajući simptomi su oni koji opisuju hipokortizolizam. Najčešći terapijski pristup je supstitucija glukokortikoida koji je neizmjerljivo važno pratiti da bi se postigli poželjni terapijski učinci. (6, 15)

### **1.6. Kortizol u laboratorijskoj evaluaciji poremećaja kore nadbubrežne žlijezde**

Laboratorijska evaluacija funkcije kore nadbubrežne žlijezde obuhvaća mjerenje steroidnih hormona koje žlijezda izlučuje i njihovih metabolita u različitim vrstama bioloških uzoraka. Obzirom da poremećen rad žlijezde, u ovom slučaju kore nadbubrežne žlijezde, s posljedičnim odstupanjem koncentracija hormona od fizioloških dovodi do kliničkih sindroma raznovrsnih kliničkih slika, određivanje koncentracija steroidnih hormona je od esencijalne važnosti za dijagnoze širokog spektra endokrinoloških poremećaja u koje spadaju i adrenalna insuficijencija, Cushingov sindrom te KAH. Mjerenje steroidnih hormona, u prvom redu kortizola, pronalazi svoju primjenu u probiru bolesnika, postavljanju dijagnoze, praćenju tijeka bolesti te praćenju odgovora bolesnika na terapiju. (6)

Kortizol daje direktnu procjenu rada nadbubrežne žlijezde. Ukoliko se isključe sekundarni poremećaji, kod primarnih određivanje kortizola predstavlja ključni parametar u postavljanju dijagnoze.

Zbog biokemijskih specifičnosti kortizola mjerenje ovog hormona ima određene prepreke i još uvijek se pokušava definirati optimalna metoda za određivanje koncentracije kortizola. Uzorci koji se najčešće koriste za mjerenje razina kortizola su serum ili plazma, slina i mokraća. Izbor ovisi o kliničkim sumnjama i indikacijama, a najtočnija dijagnostika dobiva se podudarnim rezultatima više vrsta testova. (4, 6, 8)

Mjerenje cirkulacijskih koncentracija kortizola je najdirektnija metoda mjerenja hormonske aktivnosti. Cirkadijalni ritam predstavlja problem kod mjerenja serumskih i plazmatskih koncentracija te je vrlo bitno vrijeme uzorkovanja. Nemoguće je procijeniti iz serumskih koncentracija relativne vrijednosti tijekom određenog perioda. Također, manji dio serumskog kortizola je slobodan i biološki aktivan. Bilo kakva vrsta stresa utječe na rezultate testiranja, a stres za pacijenta je u određenoj mjeri i samo vađenje krvi. Veće kliničko značenje imaju provokativni testovi koji mogu biti supresijski ili stimulacijski jer ispituju predvidljivo izlučivanje hormona, a opažene promjene u izlučivanju hormona upućuju na bolest. (6, 8)

Najčešće su za mjerenje serumskih koncentracija kortizola korištene imunokemijske metode i masena spektrometrija. Međutim, metode su tehnički zahtjevne te uključuju oslobađanje kortizola s CBG-a. Imunokemijsko određivanje koncentracije kortizola podložno je utjecaju interferencija. Najznačajnija interferencija imunokemijskih metoda je križna reaktivnost antitijela korištenih u testovima s drugim steroidima zbog slične kemijske strukture. Postoji mogućnost mjerenja slobodnog plazmatskog kortizola, ali su metode još uvijek nepraktične jer zahtijevaju previše vremena. (6, 8)

Slina je jedna od prihvatljivih vrsta uzoraka za praćenje koncentracije kortizola. U slinu kortizol ulazi difuzijom pa izmjerene koncentracije u slini reflektiraju cirkadijalni ritam, odnosno najveće su koncentracije ujutro, a najmanje navečer. Značajni problem određivanja salivarnih koncentracija kortizola je nedostatak osjetljivih metoda budući da salivarni kortizol predstavlja jednu desetinu serumskog. Kod mjerenja noćnih koncentracija to predstavlja veliki problem jer koncentracije padaju ispod mjerljivih.

Može se mjeriti imunokemijskim i masenospektrometrijskim metodama. Zbog neinvazivnosti može se koristiti kao alternativa serumskom mjerenju kortizola. (6, 8)

Urinarni kortizol predstavlja slobodnu frakciju kortizola koja se filtrira u bubrežima i izlučuje nepromijenjena. Dobro reflektira endogene koncentracije kortizola. Uzorak izbora je 24-satna mokraća koja isključuje utjecaj cirkadijalnog ritma budući da se u takvom uzorku mjeri koncentracija slobodnog kortizola izlučena tijekom čitavog dana. Mjerenje ne ovisi o CBG-u jer se mjeri samo biološki aktivna slobodna frakcija. Međutim, sakupljanje 24-satne mokraće ovisi direktno o pacijentu, stoga je uvijek delikatan uzorak za interpretaciju nalaza budući da je podložan predanalitičkim greškama koje se većinom odnose na sam postupak sakupljanja. Danas je najčešće primjenjivana tehnika za mjerenje urinarnog kortizola kromatografija. Metoda eliminira križnu reaktivnost antitijela s drugim analitima koja predstavlja problem imunokemijskog određivanja tako da je visoko specifična za kortizol. S druge strane, osjetljivost mjerenja predstavlja određenu prepreku budući da se rezultati mjerenja osoba s blažim oblicima Cushingova sindroma kreću oko graničnih vrijednosti. Kortizol u 24-satnoj mokraći smatra se superiornijim testom u odnosu na mjerenja kortizola u drugim vrstama uzoraka jer je interpretacija rezultata pojednostavljena obzirom da nema utjecaja cirkadijalnog ritma, a neke analitičke interferencije su eliminirane zbog samih metoda koje se primjenjuju za mjerenje. Konstantnim napretkom metoda dostupni testovi pružaju sve veću specifičnost, a vrijeme izvođenja testa se značajno smanjuje. No, još uvijek postoje nedoumice oko vjerodostojnosti rezultata. (6, 8, 17)

## **2. CILJ RADA**

Cilj rada je odrediti kortizol u 24-satnoj mokraći pacijenata s uputnom dijagnozom poremećaja nadbubrežne žlijezde te interpretirati dobivene rezultate shodno patofiziološkim obilježjima pojedinih poremećaja kore nadbubrežne žlijezde.

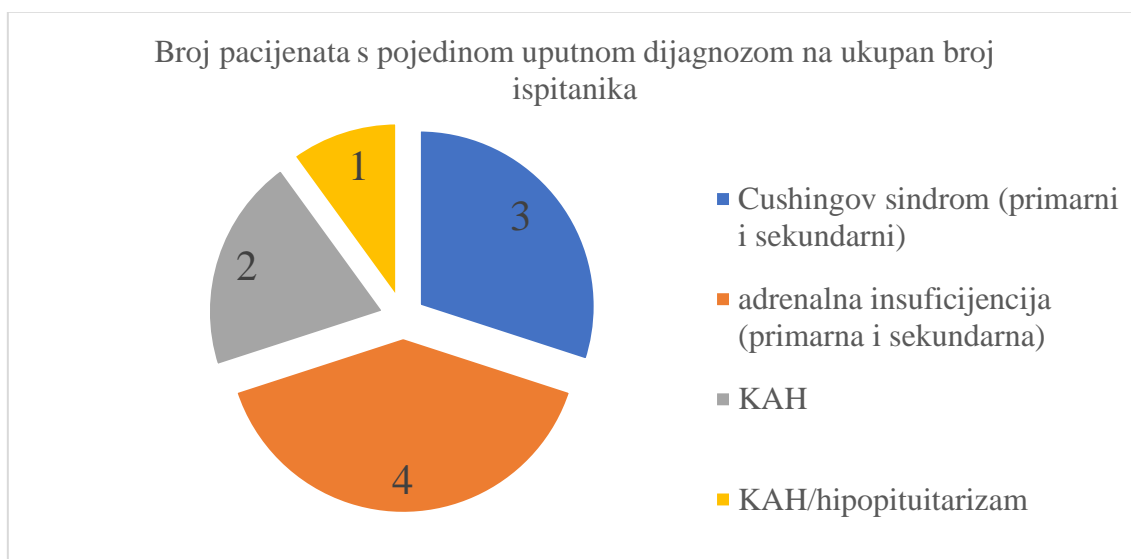
Između ostalog svrha rada je opisati važnost određivanja kortizola u uzorku 24-satne mokraće kao jednog od dijagnostičkih parametara za postavljanje dijagnoze i praćenje tijeka bolesti kod bolesnika s poremećajem kore nadbubrežne žlijezde.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Ispitanici

Iz populacije pacijenata Kliničkog bolničkog centra (KBC) Split odabrano je 10 pacijenata s uputnom dijagnozom koja je uključivala neki od poremećaja kore nadbubrežne žlijezde kao i zahtjev za određivanje koncentracije kortizola u 24-satnoj mokraći.

Od 10 odabranih pacijenata dva pacijenta upućena su na određivanje kortizola u 24-satnoj mokraći s uputnom dijagnozom Cushingova sindroma, tri pacijenta s uputnom dijagnozom hipopituitarizma, odnosno hipofunkcije hipofize, jedan pacijent s uputnom dijagnozom dobroćudne novotvorine nadbubrežne žlijezde, jedan pacijent s uputnom dijagnozom prirođenog adrenogenitalnog poremećaja (KAH) s kompletnim deficitom 21 $\alpha$ -hidroksilaze, jedan pacijent s uputnom dijagnozom adrenogenitalnog poremećaja nedefinirane etiologije, jedan pacijent s uputnom dijagnozom primarne adrenokortikalne insuficijencije (*morbus Addison*) i jedan pacijent s uputnom dijagnozom kombinacije adrenogenitalnog poremećaja i hipopituitarizma. Broj pacijenata s pojedinom uputnom dijagnozom u ukupnom broju pacijenata prikazan je na slici 8. Dobiveni rezultati interpretirat će se u odnosu na uputne dijagnoze pacijenata.



Slika 8. Raspodjela ispitanika prema uputnim dijagnozama

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Protokol za prikupljanje 24-satne mokraće

Uzorak izbora za određivanje urinskog slobodnog kortizola (eng. „*urinary free cortisol*“, UFC) koji se bubrezima izlučuje nepromijenjen je 24-satna mokraća, odnosno mokraća sakupljena tijekom vremenskog intervala od 24 sata u prikladan spremnik. Uzorak se sakuplja u bolnici za bolničke pacijente, a za sve ostale pacijente izvan bolnice, tj. bez kontrole medicinskog osoblja. Na ispravnost uzorka utječe informiranost pacijenta o samom postupku kao i razumijevanje uputa dobivenih od strane liječnika ili laboratorijskog osoblja. Rezultati direktno ovise o načinu i točnosti prikupljanja mokraće, stoga je uvijek upitna vjerodostojnost podataka dobivenih analizom 24-satne mokraće obzirom da su pacijenti rijetko svjesni važnosti utjecaja predanalitičkih čimbenika na rezultate pretraga. (18, 19)

Svaki laboratorij mora imati jasne upute za prikupljanje 24-satne mokraće. KBC Split ima objavljene svoje upute na internetskoj stranici KBC-a ([www.kbsplit.hr](http://www.kbsplit.hr)). Prema uputama, prije samog početka sakupljanja mokraće, u laboratoriju treba uzeti predviđenu posudu za sakupljanje. Primjeri spremnika za prikupljanje 24-satne mokraće prikazani su na slici 9. Ukoliko je pacijent spriječen uzeti spremnik za sakupljanje 24-satne mokraće u laboratoriju KBC-a Split prihvaća se uzorak koji je donesen u čistoj posudi.



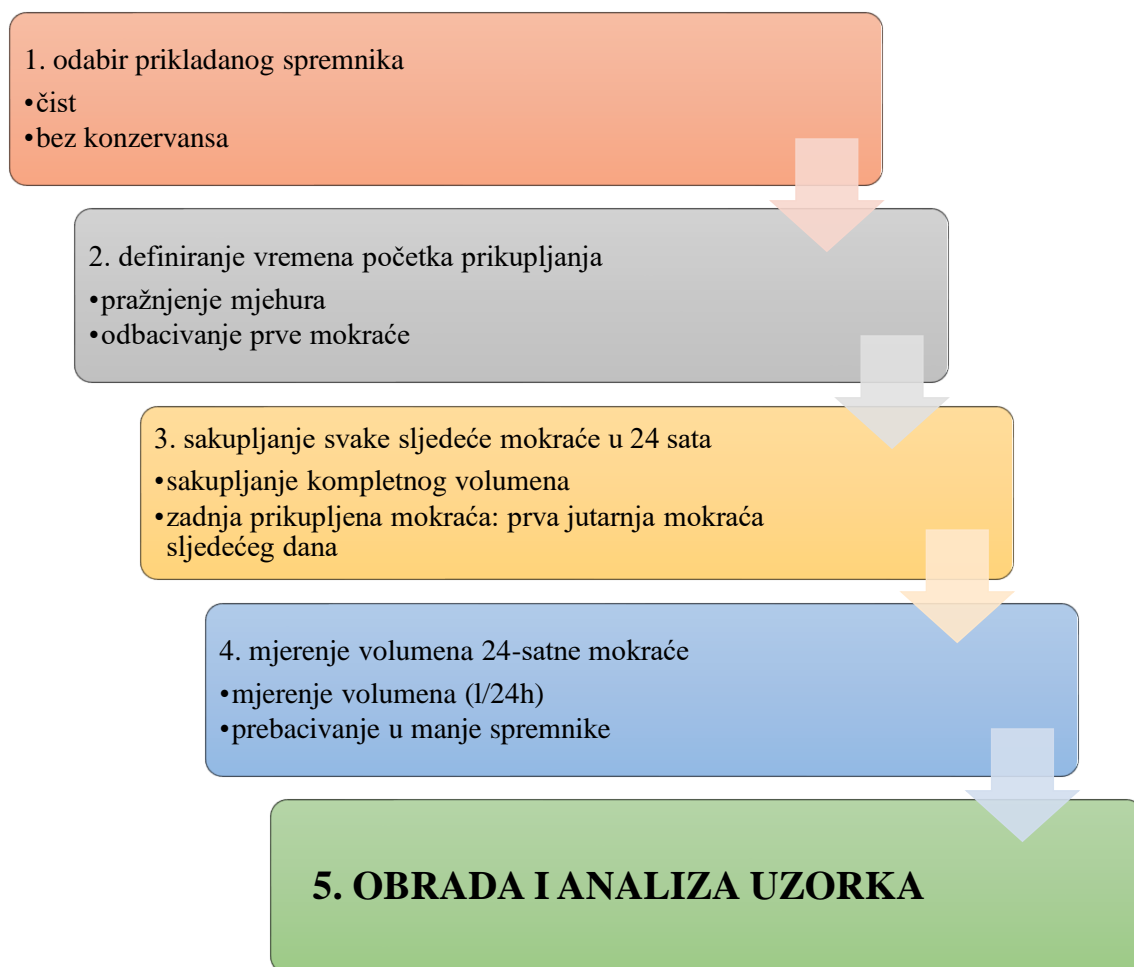
Slika 9. Spremnici za sakupljanje 24-satne mokraće (20)

Pacijent mora definirati vrijeme početka prikupljanja mokraće, npr. 7:00 sati. U definirano vrijeme mjehur se treba isprazniti, a ta porcija mokraće odbaciti. Svaka



sljedeća izmokrena porcija, u periodu od 24 sata, treba se prikupiti. Zadnja prikupljena porcija mokraće je prva jutarnja mokraća sljedećeg dana, odnosno izmokrena mokraća u definiranom vremenu početka prikupljanja sutradan. Iznimno je važno prikupiti i donijeti svu količinu mokraće izmokrenu tijekom 24-sata. Ukoliko cijeli volumen mokraće nije prikupljen i donesen na mjerenje, rezultati analiza u takvom uzorku bit će netočni. Također je važno naglasiti da se mokraća ne može sakupljati tijekom menstruacije.

Za određivanje kortizola u uzorku 24-satne mokraće potrebno je mokraću sakupljati u čistu posudu bez konzervansa. Treba se izmjeriti ukupni volumen mokraće izmokren u 24 sata (1/24h), odnosno diureza, a potom mali dio mokraće pretočiti u manji spremnik za analizu. Tako prikupljena mokraća stabilna je sedam dana čuvana na 2 – 8°C, a i do četiri mjeseca na -20°C. Shematski prikaz protokola za prikupljanje 24-satne mokraće za određivanje kortizola prikazan je na slici 10.

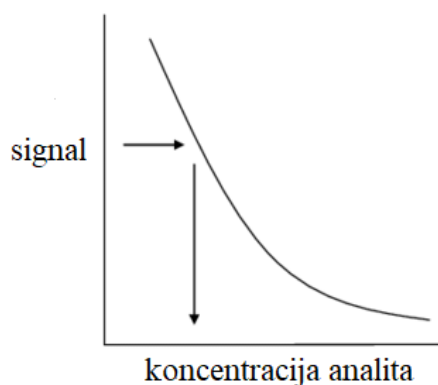


Slika 10. Prikupljanje 24-satne mokraće

### 3.2.2. Imunokemijsko određivanje kortizola u mokraći automatiziranom metodom ECLIA

Prikupljeni uzorci 24-satne mokraće obrađeni su i analizirani u Zavodu za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split prema protokolu proizvođača testa Roche „*Elecsys Cortisol*“. Protokol se odnosi na automatiziranu kvantitativnu kompetitivnu imunokemijsku metodu određivanja ukupnog urinarnog kortizola na automatskom analizatoru Cobas 6000.

Kompetitivne imunokemijske metode baziraju se na reakciji analita i antitijela pri čemu nastaje kompleks analit-antitijelo koji se mjeri indirektno preko obilježivača. Temelje se na specifičnosti vezanja pojedinog antitijela s točno specifičnim analitima. Kompeticija označava natjecanje između mjenenog analita iz uzorka koji je neobilježen s obilježenim analitom iz reagensa za vezna mjesta antitijela koja su ograničenog broja. Što je količina mjenenog analita iz uzorka veća to će se manji broj obilježenog analita iz reagensa vezati i dati signal što znači da je signal mjerenja obrnuto proporcionalan koncentraciji mjenenog analita. Odnos signala i koncentracije mjenenog analita prikazan je na slici 11. Koristi se reagens ograničene i definirane koncentracije obilježenog analita kako bi se kvantitativno mogla odrediti koncentracija mjenenog analita. (21)



Slika 11. Odnos signala kompetitivne imunokemijske metode i koncentracije analita (22)

Imunokemijske metode podložne su interferencijama od kojih je učestalija križna reaktivnost antitijela s drugim analitima. Obzirom da kortizol spada u skupinu steroida

koji imaju vrlo slične kemijske strukture antitijela namijenjena njegovom mjerenju podložna su križnim reakcijama s drugim steroidima. U svrhu eliminacije križnih reakcija i drugih nečistoća koje interferiraju s mjerenjima radni protokol podijeljen je u dva dijela. Prvi dio protokola čini manualna ekstrakcija i otapanje kortizola, a drugi dio protokola čini automatizirana elektrokemiluminiscentna metoda mjerenja (eng. „*electrochemiluminescence immunoassay*“, ECLIA).

#### 3.2.2.1. Ekstrakcija i otapanje kortizola

Budući da su imunokemijske reakcije podložne križnim reakcijama, a mokraćom se izlučuju razgradni metaboliti steroida koji bi interferirali upravo križnim reakcijama potrebno je ekstrahirati kortizol iz uzorka 24-satne mokraće pomoću diklormetana. Ovim postupkom se dobiva pročišćeni uzorak kojim se smanjuju interferirajuće reakcije koje daju netočne rezultate pri mjerenju.

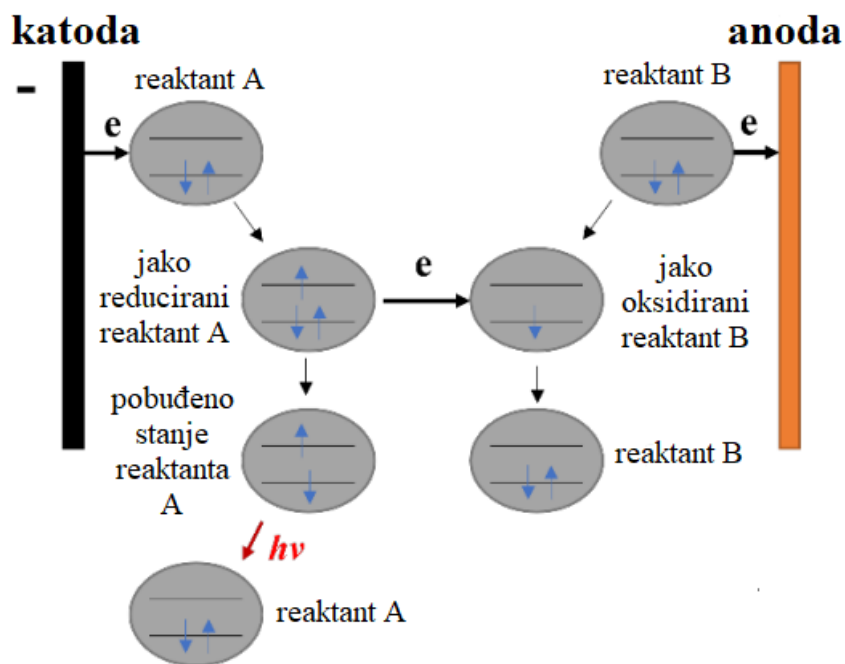
Diklormetan je organsko otapalo koje uzorak odvaja u dva tekuća sloja. Kortizol je topiv u diklormetanu, dok njegovi metaboliti zaostaju u vodenom sloju koji se odvaja kao nadsloj i tako se može eliminirati. Prema tome, u ostatku ostaje kortizol otopljen u diklormetanu. (8)

Mokraću je prije samog radnog procesa potrebno kratko centrifugirati da bi se homogenizirao sadržaj koji se u njoj nalazi. U staklenu epruvetu otpipetira se 600  $\mu\text{L}$  iscentrifugirane mokraće i 3 mL diklormetana te dobro promiješa. Smjesa se inkubira 7 minuta na sobnoj temperaturi te se tijekom tog perioda sadržaj povremeno promiješa. Nakon inkubacije smjesa se centrifugira 5 minuta na 1400g da se odvoje slojevi. Vodeni sloj i međusloj (ako ga ima) se otklone i bace, a 1.5 mL sloja s diklormetanom otpipetira se u čistu staklenu epruvetu. Sadržaj nove epruvete se postepeno posuši u vodenoj kupelji tako da tekućina ispari. U ovom trenutku kortizol je zalijepljen na stijenkama epruveta. Suhi ostatak u kojem se nalazi kortizol otopi se s 300  $\mu\text{L}$  *Elecsys Diluent Universal* reagensa tako da se pomoću njega sakuplja sav kortizol sa stijenki miješanjem. Epruvetu je nakon dodavanja reagensa potrebno začepiti gumenim čepom. Otapanje kortizola je gotovo kada tekućina može slobodno kliziti po stijenkama bez zaostajanja i praznih prostora po kojima tekućina ne može proći. Tako pripremljeni sadržaj inkubira se 30 minuta na sobnoj temperaturi. Ovaj uzorak služi za imunokemijsko određivanje koncentracije kortizola.

Ovako pripremljen uzorak stabilan je kao i prvobitni uzorak: sedam dana na 2 – 8°C ili četiri mjeseca na -20°C. Prosječni prinos ekstrakcije određen je 94%.

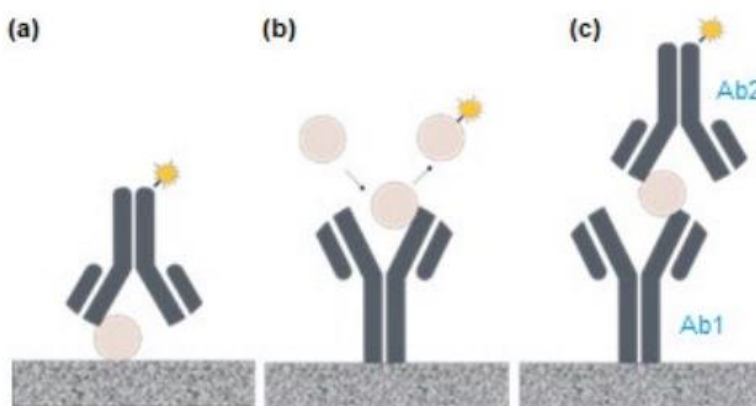
### 3.2.2.2. Automatizirana ECLIA

Elektrokemiluminiscentna imunokemijska metoda (ECLIA) jedna je od imunokemijskih tehnika određivanja analita čiji se signal imunoreakcije bazira na elektrogeneriranoj kemiluminiscenciji, odnosno elektrokemiluminiscenciji (ECL). Pojam elektrokemiluminiscencije označava svojstvo luminiscencije određenih tvari izazvano električnom strujom, tj. prijenosom visoko-energijskih elektrona na površinu elektroda. Princip elektrokemiluminiscentne emisije svjetla prikazan je na slici 12. U prvom koraku prijenosom elektrona na elektrodama formiraju se elektrogenerirani ioni; jako reducirani i jako oksidirani reaktanti. Dalje se događa prijenos elektrona između elektrogeneriranih iona čime se oksidirani reaktant vraća u prvobitno stanje, a reducirani prelazi u pobuđeno. ECL signal se detektira kada se reaktant vraća iz pobuđenog u osnovno stanje pri čemu emitira foton određene valne duljine čija je energija ( $h\nu$ ) jednaka razlici energija ta dva energetska stanja. (23)



Slika 12. Princip ECL emisije svjetla (23)

ECLIA testovi mogu biti primijenjeni u različitim oblicima koji su shematski prikazani na slici 13 gdje shema a) predstavlja direktnu ECLIA reakciju, shema b) kompetitivnu ECLIA reakciju, a shema c) „sendvič“ ECLIA reakciju. Kod direktne reakcije obilježeno antitijelo daje proporcionalni signal koncentraciji analita jer se pri vezanju s analitom emitira signal. Kompetitivna ECLIA daje obrnuto proporcionalni signal jer se signal emitira samo pri vezanju egzogenog analita koji se natječe s mjerenim analitom za vezno mjesto antitijela. Sendvič ECLIA koristi dva antitijela od kojih primarno „hvata“ analit, a sekundarno s obilježivačem se veže na analit uslijed čega se emitira signal s obilježivača.



Slika 13. Oblici ECLIA reakcija (23)

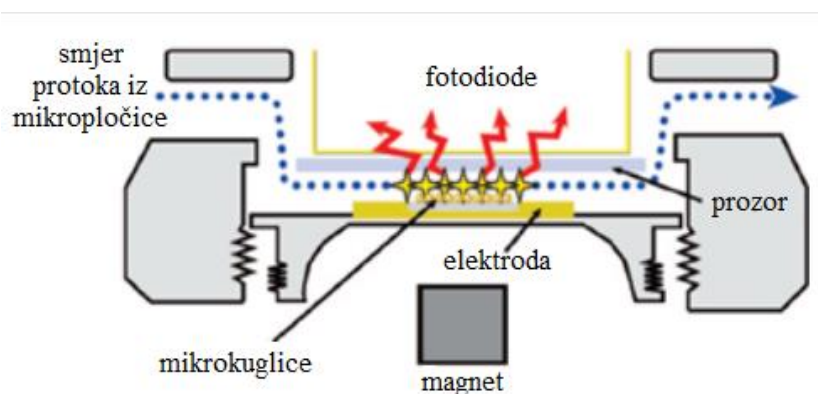
Kompetitivni ECLIA princip detekcije primijenjen je na određivanje kortizola u biološkim uzorcima i to komercijalnim kompletom reagensa „*Elecsys Cortisol*“ koji je namijenjen za rad na uređajima Cobas. U testu se koristi poliklonsko antitijelo obilježeno biotinom specifično usmjereno na kortizol. Poliklonska antitijela su heterogena skupina antitijela koja se mogu vezati za različite epitope analita. Koriste se mikrokuglice obložene streptavidinom koji se veže za biotin i njihova interakcija veže kompleks analit-antitijelo za čvrstu fazu. Kao obilježivač u testu, koristi se kompleks rutenija kojim je obilježen egzogeni kortizolski derivat koji se natječe za vezno mjesto antitijela s endogenim kortizolom uzorka. Kompleks rutenija osigurava visoku osjetljivost testa jer se može regenerirati na površinama elektroda, stoga je moguća detekcija kortizola pri vrlo niskim koncentracijama. U tablici 2 prikazani su reagensi koji se dobivaju u kompletu s pridruženim volumenima. Svi reagensi su spremni za upotrebu, odnosno ne zahtijevaju

pripremu. Komplet reagensa ne uključuje kalibratore, kontrole, pufere za održavanje sustava ni diluente koji se nabavljaju zasebno. (21, 23)

Tablica 2. Reagensi *Elecsys Cortisol*

oznaka	reagens	volumen (mL)
M	mikrokuglice obložene streptavidinom	6.5
R1	biotinizirana anti-kortizolska antitijela	9
R2	kortizol-peptid-rutenijski kompleks	9

Test ukupno traje 18 minuta i uključuje dvije inkubacije. Tijekom prve inkubacije 20  $\mu$ L uzorka inkubira se s reagensima R1 i R2 te dolazi do imunoreakcije endogenih i egzogenih analita s antitijelima. U drugoj inkubaciji dodaju se streptavidinske mikrokuglice kojima se imunokompleksi vežu pomoću biotina za čvrstu fazu. Reakcijska smjesa se aspirira u mikropločice gdje se mikrokuglice magnetski vežu za površinu elektroda. Nevezane tvari ispiru se pomoću „ProCell“ pufera za ispiranje. Primjenom napona na elektrode inducira se kemiluminiscentna emisija koja predstavlja signal za mjerenje te se taj signal detektira pomoću fotomultiplikatora. Shematski prikaz sustava za mjerenje elektrokemiluminiscentnog signala prikazan je na slici 14. Izmjereni signali se pretvaraju u rezultat koncentracije kortizola prema kalibracijskoj krivulji dobivenoj mjerenjem signala komercijalnih kalibratora „Cortisol Cal Set“.



Slika 14. Shematski prikaz sustava za mjerenje ECL (23)

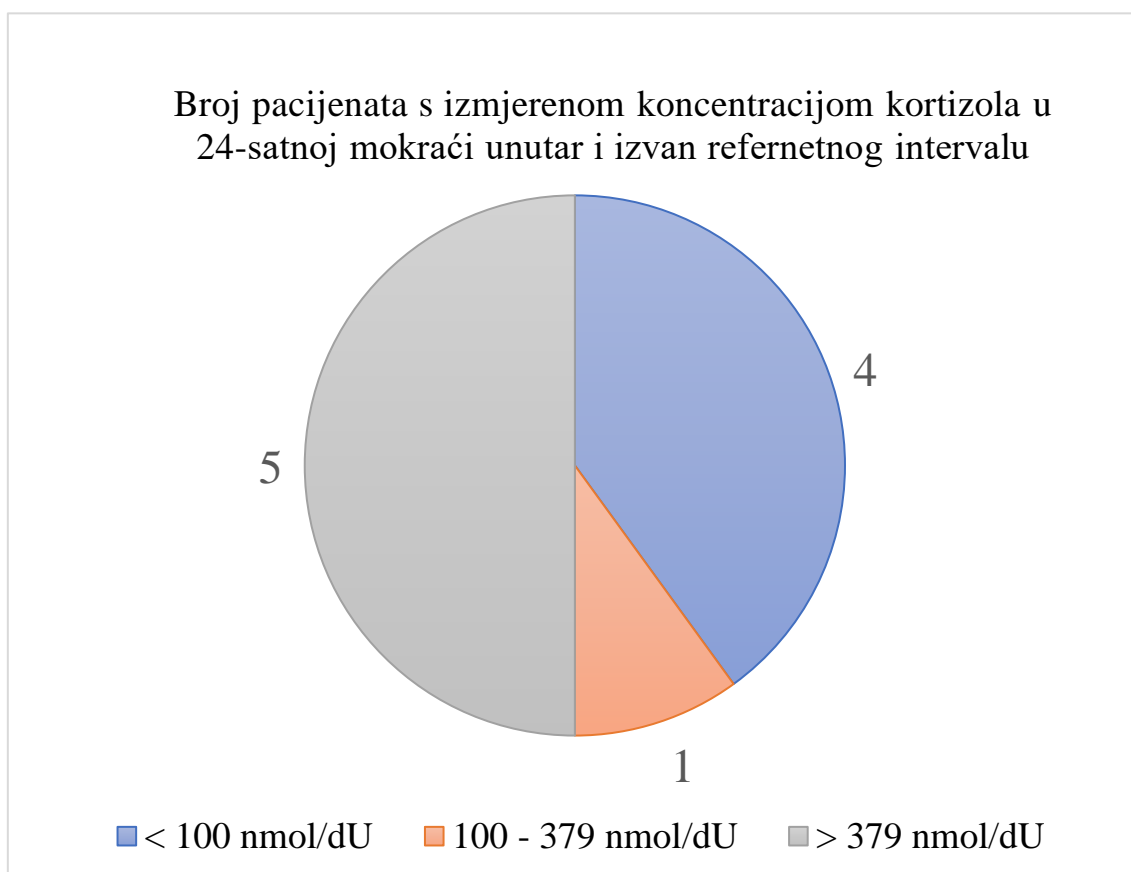
Uzorci su analizirani na integriranom sustavu Cobas 6000 s imunokemijskom jedinicom Cobas e601. Uređaj koncentraciju kortizola mjeri opisanom ECLIA metodom u nmol/L, a dobiveni rezultati se pomoću izmjerene diureze preračunavaju u nmol/dU. Proizvođač komercijalnog kita, dodatnih reagenasa i uređaja je Roche. Sustav Cobas 6000 prikazan je na slici 15.



Slika 15. Integrirani sustav Cobas 6000 (24)

## 4. REZULTATI

Ispitivanjem 24-satne mokraće zdravih ispitanika ECLIA metodom na uređaju Cobas 6000 određen je od strane proizvođača Roche referentni interval 100 – 379 nmol/dU (dU je volumen 24-satne mokraće u litrama). Od 10 ispitanih pacijenata četiri pacijenta imala su koncentraciju kortizola ispod 100 nmol/dU, pet pacijenata preko 379 nmol/dU, a jedan pacijent imao je koncentraciju kortizola u rasponu 100 – 379 nmol/dU. Broj pacijenata u svakoj od tih skupina pacijenata u cjelokupnom broju ispitanika prikazan je na sici 16.



Slika 16. Raspodjela pacijenata s izmjerenom koncentracijom kortizola u 24-satnoj mokraći prema referentnom intervalu

U tablici 3 prikazani su rezultati odabranih ispitanika određeni ECLIA metodom na uređaju Cobas 6000 iz uzorka 24-satne mokraće. Rezultati u nmol/L su rezultati dobiveni mjerenjem, a rezultati u nmol/dU su rezultati pomnoženi s diurezom u litrama. Svi



izmjereni rezultati su unutar detekcijskog raspona uređaja te su određeni pomoću kalibracijske krivulje koja je provjerena kontrolnim uzorcima „*Preci Control Universal*“.

Tablica 3. Rezultati određivanja kortizola u 24-satnoj mokraći ECLIA metodom

<b>PACIJENT</b>	<b>UPUTNA DIJAGNOZA</b>	<b>KORTIZOL (nmol/L)</b>	<b>DIUREZA (l)</b>	<b>KORTIZOL (nmol/dU)</b>
<b>1</b>	Cushingov sindrom	364	2,8	1019
<b>2</b>	hipopituitarizam	25	1,6	40
<b>3</b>	dobročudna novotvorina nadbubrežne žlijezde	168	2,7	454
<b>4</b>	hipopituitarizam	77	1	77
<b>5</b>	Cushingov sindrom	936	2,15	2012
<b>6</b>	adrenogenitalni poremećaj	190	2,2	418
<b>7</b>	prirođeni adrenogenitalni poremećaj (KAH) s kompletnim deficitom enzima 21 $\alpha$ -hidroksilaze	247	2,5	618
<b>8</b>	hipopituitarizam	7	2,14	15
<b>9</b>	adrenogenitalni poremećaj; hipopituitarizam	22	0,77	17
<b>10</b>	primarna adrenokortikalna insuficijencija ( <i>morbus Addison</i> )	338	1,1	372

## 5. RASPRAVA

U sklopu postavljanja dijagnoze i odlučivanja o daljnjim terapijama određuje se količina kortizola koja je bubrezima izlučena tijekom vremenskog razdoblja od 24 sata, odnosno koncentracija izražena u nmol/dU. Iz tablice 3 koja prikazuje rezultate određivanja kortizola u 24-satnoj mokraći odabranih ispitanika vidljivo je da pacijenti sa sličnom koncentracijom kortizola u 24-satnoj mokraći izraženoj u nmol/L imaju potpuno različite vrijednost izražene u nmol/dU s obzirom da imaju značajno različitu diurezu odnosno volumen mokraće izmokren unutar 24 sata kao npr. pacijent 1 i pacijent 10. Pacijent 4 koji je izmokrio točno 1 litru mokraće unutar 24 sata ima identičnu koncentraciju kortizola izraženu u nmol/dU, a pacijent 9 koji je izmokrio manje od litre mokraće unutar 24 sata dakle ima koncentraciju izraženu u nmol/dU manju od koncentracije izražene u nmol/L. Prema tome, podatak o količini dnevno izlučenog kortizola bubrezima pokazuje koncentracija kortizola u nmol/dU te su stoga ispravno prikupljena 24-satna mokraća i točno izmjeren volumen prikupljene mokraće unutar 24 sata uvjet točnosti nalaza.

Međutim, uz potpuno ispravno rukovanje i obradu uzorka od strane laboratorijskog osoblja te potpuno ispravnu laboratorijsku opremu i uređaje koji su ispravno kalibrirani i kontrolirani pacijent može dobiti netočne rezultate pretrage zbog neispravnog prikupljanja mokraće. Ukoliko je pacijent preskočio sakupljanje samo nakon jednog mokrenja izmjerena diureza bit će netočna, a time i rezultat kortizola u mokraći te potencijalno i liječnička odluka. Nadalje, iznimno je bitna čistoća spremnika u koji se mokraća sakuplja. U uputstvima proizvođača testa navodi se da npr. vrijednost preko 2 mmol/L glukoze može interferirati s testom. Iz tog razloga urin sakupljen u boce od npr. gaziranih pića ili sokova nikako ne može biti prihvaćen kao ispravan uzorak.

U KBC-u Sestre milosrdnice provedeno je istraživanje o informiranosti pacijenata o postupku sakupljanja 24-satne mokraće pomoću upitnika 2012. godine. Istraživanje je pokazalo da većina pacijenata nije dobila potpune ni relevantne informacije o postupku sakupljanja mokraće ni značaju točnosti sakupljanja, a posljedica može biti netočan laboratorijski nalaz uslijed neispravno prikupljene mokraće s direktnim utjecajem na rezultate testova rađenih u takvom uzorku. Vrlo mali broj pacijenata bio je informiran o

spremnici za prikupljanje i važnosti njihove čistoće. Ti podatci upućuju na vrlo lošu informiranost opće populacije i pacijenata o postupku prikupljanja i dovode u pitanje integritet samih pretraga obavljenih iz uzorka 24-satne mokraće. Neophodno je i zapravo obavezno točno informirati svakog pacijenta upućenog na pretragu koja uključuje sakupljanje 24-satne mokraće te se uvjeriti da pacijent razumije upute, ali i važnost ispravno prikupljenog uzorka. (19)

Kod odabranih pacijenata očekuju se određene vrijednosti koncentracija kortizola u skladu s njihovim uputnim dijagnozama. Očekivane vrijednosti ovise o poremećaju koji je dijagnosticiran ili za koji je postavljena sumnja pa tako kod hipokortizma očekujemo snižene vrijednosti, odnosno niže od donje referentne granice koja iznosi 100 nmol/dU, a kod hiperkortizma vrijednosti više od gornje referentne granice koja iznosi 379 nmol/dU. Važno je naglasiti da interpretacija ne mora nužno pratiti navedeni obrazac promjena koncentracija kortizola u mokraći. U obzir se mora uzeti cjelokupna slika pacijenta koja može uključivati i znakove prisutnosti drugih bolesti te moguće analitičke interferencije koje bi ometale izvođenje testa i ispravne rezultate.

Cushingov sindrom sam po sebi predstavlja hiperkortizolizam pa kod pacijenata sa sumnjom na Cushingov sindrom, bilo primarni ili sekundarni, očekujemo koncentracije kortizola veće od gornje referentne granice. Pacijentima 1 i 5 tražena je pretraga kortizola u 24-satnom urinu s uputnom dijagnozom Cushingova sindroma nedefinirane etiologije, dok je pacijentu 3 prethodno pronađena dobroćudna novotvorina nadbubrežne žlijezde što bi upućivalo na tumorsku masu koja potencijalno luči višak kortizola. Koncentracije kortizola u mokraći kod sva tri pacijenta su povišene, ali pacijent 1 ima skoro trostruko veću koncentraciju od gornje referentne granice, a pacijent 5 i peterostruko veću koncentraciju, dok pacijent 3 ima tek blago povišenu koncentraciju kortizola. Obzirom na visoku koncentraciju kortizola u mokraći, pacijentima 1 i 5 nalaz je u skladu s Cushingovim sindromom, ali ne otkriva prirodu bolesti. Iz ove pretrage jasno je da se radi o hiperkortizolizmu, ali nije jasno je li osnovni problem u nadbubrežnoj žlijezdi, hipofizi ili ektopičnom tumoru koji luči kortizol. Za određivanje točne etiologije bolesti minimalno je potrebno odrediti još koncentraciju ACTH u krvi da se razluči je li poremećaj primaran ili sekundaran o čemu ovisi i sama terapija. U ova dva slučaja kortizol u mokraći nije dovoljan pokazatelj u ispitivanju bolesti. S druge strane, pacijent

3 ima tek blago povišenu koncentraciju kortizola u mokraći. U ovom slučaju potvrda hiperkortizolizma nije toliko sigurna kao u prva dva slučaja. Dobročudna novotvorina koja je pronađena na nadbubrežnoj žlijezdi potencijalno može lučiti višak kortizola, ali sama blago povišena koncentracija kortizola u mokraći nije potvrda. Međutim, ukoliko se radi o novonastaloj manjoj tumorskoj masi rezultat bi mogao značiti sami početak Cushingova sindroma. Također je moguće da se radi o blažoj verziji bolesti. Isto tako nije definitivno da je izraslina uzrok povećanoj koncentraciji kortizola u uzorku. Moguće objašnjenje rezultata koje ne potkrepljuje dijagnozu moglo bi biti da je uzorak kontaminiran u spremniku s tvarima koje interferiraju s ECLIA metodom na principu križne reaktivnosti, npr. tvari koje su po kemijskoj strukturi steroidi pa su rezultati zapravo lažno povišeni. Između ostalog je moguće da ekstrakcija nije dobro provedena budući da se urinom izlučuju i steroidni metaboliti koji mogu interferirati s antitijelima korištenima u testu. Ukoliko se vodeni sloj nije u potpunosti uklonio iz uzorka prilikom obrade, zaostali metaboliti u tom uzorku mogu dovesti do lažnog povećanja koncentracije kortizola. U svrhu razlučivanja dileme moguće je odrediti koncentraciju ACTH u krvi. Ukoliko se stvarno radi o hiperkortizolizmu uzrokovanom novotvorinom nadbubrežne žlijezde koja luči kortizol koncentracije ACTH u krvi trebale bi prema zakonitostima HPA osovine biti snižene. (6, 9, 15, 16)

Pacijenti s uputnom dijagnozom hipopituitarizma, odnosno hipofunkcije hipofize, predstavljaju skupinu pacijenata kod koje očekujemo sekundarnu adrenalnu insuficijenciju. Očekivane vrijednosti kod ove skupine pacijenata trebale bi biti snižene odnosno ispod 100 nmol/dU. U ovu kategoriju pacijenata spadaju pacijenti 2, 4 i 8. Sva tri pacijenta imaju koncentraciju kortizola u mokraći ispod donje referentne granice. Pacijent 4 ima blago sniženu koncentraciju, pacijent 2 nešto više u odnosu na pacijenta 4, dok pacijent 8 ima značajno snižen kortizol u mokraći. Kod pacijenta 4 vrijednost kortizola u mokraći nije toliko izraženo snižena pa se može posumnjati i da se možda radi o nepravilnom uzorkovanju, odnosno da pacijent nije prikupio sav izmokreni volumen urina. Međutim, na temelju koncentracija kortizola u mokraći može se zaključivati isključivo da je kod pacijenata prisutna snižena koncentracija. Da bi se utvrdilo radi li se o sekundarnoj adrenalnoj insuficijenciji, odnosno da je posrijedi stvarno hipopituitarizam koji je doveo do hipokortizolizma potrebno je izmjeriti koncentraciju ACTH u krvi koja bi u prilog dijagnozi trebala biti snižena. (15)

S druge strane, pacijent 10 upućen je na pretragu s uputnom dijagnozom primarne adrenokortikalne insuficijencije, odnosno Addisonove bolesti čije obilježje je manjak kortizola. Očekivana vrijednost kod ovog pacijenta bi također trebala biti snižena, odnosno manja od 100 nmol/dU. Međutim, pacijent je dobio rezultat unutar referentnog intervala vrlo blizu gornjoj granici. Ukoliko je prethodno ustanovljeno da se uistinu radi o Addisonovoj bolesti postoji mogućnost da je pacijent već pod glukokortikoidnom terapijom te je poslan na kontrolu terapije, a rezultati ove pretrage u tom slučaju liječniku pružaju informaciju o pacijentovom odgovoru na terapiju, odnosno pacijentu se individualno pristupa s ciljem prilagođavanja doze njegovim potrebama. Drugo potencijalno objašnjenje ovakvog rezultata je kontaminacija uzorka ili neispravna ekstrakcija pa su antitijela iz testa reagirala sa zaostalim steroidnim metabolitima iz uzorka. Također je moguće da pacijentov problem nije manjak kortizola te da ova vrijednost može ići u prilog isključenja dijagnoze. U svakom slučaju, rezultat nije pokazatelj uputne dijagnoze, a interpretacija tog rezultata ovisi o anamnezi.

Uputna dijagnoza adrenogenitalnog poremećaja, odnosno KAH-a, podrazumijeva sniženu koncentraciju kortizola u mokraći. Za samu dijagnozu KAH-a nije dovoljan samo podatak snižene koncentracije kortizola, ali snižena koncentracija između ostalog upućuje i u tom smjeru. Osim hipokortizolizma, dolazi do nakupljanja androgena te njihov višak u kombinaciji s hipokortizolizmom pruža vrlo dobru osnovu za dijagnozu KAH-a. Pacijentima bi također bilo potrebno odrediti koncentraciju ACTH u krvi koja u tom slučaju mora biti povišena jer zapravo povišena koncentracija ACTH dovodi do hiperplazije kore. Koncentracija kortizola u mokraći nadopunjena koncentracijom ACTH u krvi može otkriti prisustvo bolesti i pobuditi sumnju na KAH. Budući da se radi o genetskoj bolesti s deficitom enzima, dijagnozu nije moguće postaviti samo na temelju navedenih pretraga. Da bi se točno odredila etiologija bolesti potrebno je odrediti koji je enzim u sintezi kortizola deficitaran. Pacijenti 6 i 7 poslani su na pretragu s uputnom dijagnozom adrenogenitalnog poremećaja, s tim da je u uputnoj dijagnozi pacijenta 7 naveden kompletni deficit enzima 21 $\alpha$ -hidroksilaze. Kod oba pacijenta očekujemo rezultate ispod 100 nmol/dU, ali kod oba pacijenta pronađeni su rezultati iznad gornje referentne granice. Pacijent 6 ima tek nešto višu koncentraciju od referentnog intervala pa postoji mogućnost da je došlo do kontaminacije uzorka ili nepravilne ekstrakcije kortizola prilikom pripreme za ECLIA metodu. Problem s ekstrakcijom je moguć kod oba

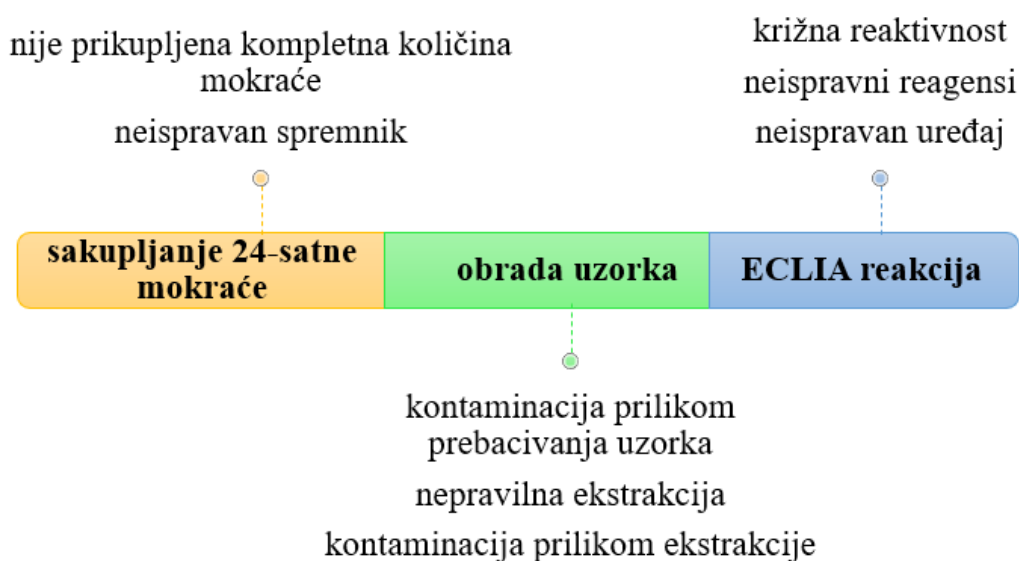
pacijenta jer KAH sam po sebi podrazumijeva nakupljanje prekursora kortizola koji su androgeni, ali isto tako po kemijskoj strukturi steroidi koji teoretski, ako se nađu u urinu, mogu interferirati križnom reaktivnošću s antitijelima. Pacijent 7 u svojoj uputnoj dijagnozi ima i etiološku pozadinu kompletnog deficita enzima 21 $\alpha$ -hidroksilaze pa je vrlo vjerojatno pacijent već započeo nadomjesnu terapiju glukokortikoidima. Obzirom da taj pacijent ima značajniji višak kortizola veća je vjerojatnost da je u pitanju nadomjesna terapija. U oba slučaja rezultat kortizola u mokraći nije dovoljan za isključenje dijagnoze. Potrebno je uključiti i ostale dijagnostičke parametre te ustanoviti radi li se zapravo o hiperplaziji kore nadbubrežne žlijezde. (4, 6, 15)

Pacijent 9 upućen je na određivanje kortizola u mokraći s uputnim dijagnozama adrenogenitalnog poremećaja i hipopituitarizma. Obje dijagnoze podrazumijevaju sniženu koncentraciju kortizola, ali bi se trebale razlikovati po koncentraciji ACTH. Kod adrenogenitalnog poremećaja koncentracija ACTH u krvi trebala bi biti povišena zbog manjka kortizola, odnosno očuvane negativne povratne sprege. S druge strane, hipopituitarizam označava da se problem nalazi u hipofizi, te da problem može biti manjak ACTH uslijed bolesti hipofize i da negativna povratna sprega moguće nije očuvana pa posljedično dolazi do hipokortizolizma. Koncentracija kortizola u mokraći u ovom slučaju potencijalno može odgovoriti na pitanje postoji li problem, ali ne i koji je problem. Pacijentov rezultat u skladu je s očekivanim rezultatom, dakle koncentracija kortizola izrazito je niska. Toliko niska koncentracija može biti posljedica neispravnog sakupljanja mokraće, a pacijent je u laboratorij donio samo 0,77 L urina što predstavlja nisku diurezu (normalna diureza 0,8 – 2 l/24h) i pobuđuje sumnju u ispravnost prikupljanja mokraće. Za utvrđivanje etiologije bolesti, koncentracija kortizola u mokraći svakako nije dovoljna. Potrebno je prije svega odrediti koncentraciju ACTH u krvi. Ukoliko je koncentracija ACTH snižena, hipopituitarizam nije isključen a snižena koncentracija ACTH u krvi može biti uzrok sniženoj koncentraciji kortizola u mokraći. Međutim, da bi se utvrdilo radi li se o KAH-u ili ne, potrebno je osim koncentracije ACTH u krvi koja bi u ovom slučaju trebala biti povišena odrediti koncentraciju adrenalnih androgena te ispitati postoji li hiperplazija kore nadbubrežne žlijezde.

Koncentracija kortizola u mokraći sama za sebe nije dovoljan parametar za postavljanje dijagnoze. Ni jednom pacijentu ne možemo sa sigurnošću odrediti etiologiju bolesti, ali ni isključiti postojanje bolesti iz dobivenih rezultata. Međutim, iako nije

samostalan parametar, koncentracija kortizola u mokraći usmjerava daljnje pretrage i ukoliko je rezultat ispravan dovodi liječnika bliže odgovoru. Nakon postavljanja dijagnoze odličan je alat za individualan pristup pacijentu i prilagođavanje terapije svakom pacijentu zasebno. Da bi se postigli mjerodavni rezultati bitna je točnost i preciznost korištenih metoda, pravilna obrada i rukovanje s uzorkom, ali i prikladan uzorak.

ECLIA metoda ima zadovoljavajuću osjetljivost budući da mjeri vrlo niske koncentracije kortizola. Specifičnost metode ima mjesta za popravak. Steroidi su problematična skupina kemijskih spojeva za imunokemijske metode zbog vrlo slične kemijske strukture. Poliklonska antitijela su heterogena skupina antitijela koja se ne vežu striktno za isti epitop. Izraženost križne reaktivnosti mogla bi se smanjiti primjenom monoklonskih antitijela budući da se sva vežu za isti epitop pa bi se primjenom monoklonskih antitijela koja bi se vezala za epitop koji je specifičan za kortizol teoretski utjecaj križne reaktivnosti mogao smanjiti. Isto tako *Elecsys cortisol* protokol podrazumijeva ručnu ekstrakciju kortizola koja je podložna ljudskim greškama. Dovoljno specifična monoklonska antitijela mogla bi u potpunosti eliminirati postupak ekstrakcije iz protokola. Slika 17 predstavlja točke protokola koje su najčešći izvori netočnosti rezultata određivanja kortizola u mokraći. (25)



Slika 17. Izvori netočnosti rezultata određivanja kortizola u mokraći

Izrazito visoke ili niske koncentracije kortizola poklapaju se s uputnim dijagnozama što znači da njihova vjerodostojnost uglavnom ne bi trebala biti upitna. Problem je interpretacija graničnih rezultata. Granični rezultati, osim pogreške u određenom dijelu procesa rada, mogu značiti početak bolesti ili njen blaži oblik. Interpretacija takvih rezultata bila bi znatno olakšana kada bi se povećala vjerodostojnost 24-satne mokraće kao uzorka te smanjio utjecaj interferencija kojima su imunokemijski testovi podložni.

*Elecsys cortisol* test primijenjen na 24-satnu mokraću koristan je u određivanju koncentracije kortizola kao prekretnica u daljnjim postupcima. Rezultati dobiveni pretragom relevantni su u kontekstu ostalih parametara i anamneze. Vrijednosti same za sebe moraju se promatrati s oprezom i svim čimbenicima koji mogu utjecati na test.



## 6. ZAKLJUČAK

Vjerodostojnost određivanja kortizola u mokraći podrazumijeva dovoljno specifične i osjetljive metode koje su sposobne dati što točnije rezultate. Rezultati dobiveni iz uzorka 24-satne mokraće uvijek se smatraju kontroverznim i nepovjerljivim zbog nesigurnosti u ispravnost uzorka. Vjerodostojnost 24-satne mokraće mogla bi se povećati educiranjem pacijenata i podizanjem svijesti o utjecaju kvalitete uzorka na rezultate pretraga.

Imunokemijsko određivanje koncentracije kortizola u urinu ECLIA metodom uz korištenje poliklonskih antitijela koristan je način određivanja koncentracije kortizola. Jasne vrijednosti, one koje višestruko odstupaju od referentnih granica ili se nalaze oko sredine referentnog intervala, ukazuju da bolest postoji ili ne postoji te u kojem se smjeru ona kreće ili nam govore o učinkovitosti terapije i pružaju mogućnost individualnog terapijskog pristupa. Granične vrijednosti predstavljaju problem i nesigurnu interpretaciju. Smanjenjem utjecaja interferencija i eliminiranjem manualnog rada smanjuje se mogućnost pogreške i povećava ukupna točnost testa.

Kortizol sam po sebi ne predstavlja samostalan dijagnostički parametar za dijagnosticiranje ni jedne bolesti te se uvijek promatra u kontekstu drugih parametara, najčešće koncentracije ACTH. Međutim, određivanje kortizola u sklopu postavljanja dijagnoze kliničara može uputiti u određenom smjeru i usmjeriti daljnje pretrage među kojima bi prva bila određivanje koncentracije ACTH. Dakle, u laboratorijskoj evaluaciji poremećaja kore nadbubrežne žlijezde kortizol ima velik dijagnostički značaj, a ispitivanje etologije poremećaja nadopunjuje se dodatnim testovima. Određivanje koncentracije kortizola u 24-satnoj mokraći ima značaj u otkrivanju poremećaja kore nadbubrežne žlijezde, terapijskom pristupu pacijentu i praćenju pacijentovog stanja.

## 7. LITERATURA

1. Bajek S., Bobinac D., Jerković R., Malnar D., Marić I. Sustavna anatomija čovjeka. Rijeka: *Medicinski fakultet u Rijeci* 2007., Zadnji pristup 25.2.2023.
2. Saraga-Babić M., Puljak L. i sur. Embriologija i histologija čovjeka, Split; *Sveučilište u Splitu*, 2014. Zadnji pristup: 25.2.2023.
3. Utiger R. D. "adrenal gland". *Encyclopedia Britannica*, 2022. Zadnji pristup 25.2.2023. Dostupno na: <https://www.britannica.com/science/adrenal-gland>
4. Čvorišćec D, Čepelak I. Ur. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb: *Medicinska naklada*, 2009. Zadnji pristup: 12.3.2023.
5. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA: Harperova ilustrirana biokemija, 28. izdanje, *Lange Medical Books / McGraw-Hill*, 2009. (hrvatski prijevod, 2011.). Zadnji pristup: 25.2.2023.
6. Burtis, C. A., & Bruns, D. E. *Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics*. Elsevier Health Sciences, 2014. Zadnji pristup 14.3.2023.
7. Kuo, Taiyi et al. "Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids." *Advances in experimental medicine and biology* vol. 872 (2015). Zadnji pristup: 25.2.2023. Dostupno na: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2895-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2895-8_5)
8. El-Farhan, N., Rees, D. A., & Evans, C. Measuring cortisol in serum, urine and saliva - are our assays good enough?. *Annals of clinical biochemistry*, 2017. Zadnji pristup 14.3.2023. Dostupno na: <https://doi.org/10.1177/0004563216687335>
9. Raff, H., & Carroll, T. Cushing's syndrome: from physiological principles to diagnosis and clinical care. *The Journal of physiology*, 2015. Zadnji pristup 14.3.2023. Dostupno na: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.282871>
10. Choi Ho M. Clinical and Technical Aspects in Free Cortisol Measurement. *Endocrinology and Metabolism*, 2022. Zadnji pristup 5.3.2023. Dostupno na: <https://doi.org/10.3803/EnM.2022.1549>
11. Sapolsky R.M., Krey L.C., McEwen B.S. The Neuroendocrinology of Stress and Aging: The Glucocorticoid Cascade Hypothesis. *Science of Aging Knowledge*

- Environment*, 2002. Zadnji pristup 5.3.2023. Dostupno na: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/sageke.2002.38.cp21>
12. Coutinho A. E., Chapman K. E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2011. Zadnji pristup 5.3.2023. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.04.005>
  13. Mohd Azmi, Nor Amira Syahira et al. "Cortisol on Circadian Rhythm and Its Effect on Cardiovascular System." *International journal of environmental research and public health*, 2021. Zadnji pristup 6.3.2023. Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/ijerph18020676>
  14. Henry Michelle et al. "Sleep, Cognition and Cortisol in Addison's Disease: A Mechanistic Relationship." *Frontiers in endocrinology*, 27 Aug. 2021. Zadnji pristup 6.3.2023. Dostupno na: <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.694046>
  15. Santulli G. Adrenal Glands: From Pathophysiology to Clinical Evidence. *Nova Biomedical, New York*, 2015., Zadnji pristup 10.3.2023.
  16. Nieman L. K. Recent Updates on the Diagnosis and Management of Cushing's Syndrome. *Endocrinology and metabolism*, 2018. Zadnji pristup 14.3.2023. Dostupno na: <https://doi.org/10.3803/EnM.2018.33.2.139>
  17. Odeniyi, I. A., & Fasanmade, O. A. Urinary free cortisol in the diagnosis of Cushing's syndrome: how useful?. *Nigerian journal of clinical practice*, 2013. Zadnji pristup 14.3.2023. Dostupno na: <https://doi.org/10.4103/1119-3077.113445>
  18. Corder C.J., Rathi B.M., Sharif S., Leslie S.W. 24-Hour Urine Collection. *StatPearls Publishing*, 2023. Zadnji pristup 10.5.2023. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482482/>
  19. Miler, M., & Simundić, A. M. Low level of adherence to instructions for 24-hour urine collection among hospital outpatients. *Biochemia medica*, 2013. Zadnji pristup: 10.5.2023. Dostupno na: <https://doi.org/10.11613/bm.2013.038>
  20. Pole Ideal Pars Co. katalog. Zadnji pristup 10.5.2023. Dostupno na: <https://en.medpip.com>
  21. Andreis I., Čulo F., Marušić M., Taradi M. Imunologija. Zagreb; *Medicinska naklada*, 1998. Zadnji pristup 12.5.2023.

22. Forkman J. Optimal calibration in immunoassay and inference on the coefficient of variation. *Research Gate*, 2023. Zadnji pristup 12.5.2023. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/30073127\\_Optimal\\_calibration\\_in\\_immunoassay\\_and\\_inference\\_on\\_the\\_coefficient\\_of\\_variation](https://www.researchgate.net/publication/30073127_Optimal_calibration_in_immunoassay_and_inference_on_the_coefficient_of_variation)
23. Rahmawati, Isnaini. Electrogenerated Chemiluminescence for Immunoassay Applications. *Indonesian Journal of Chemistry*, 2021., Zadnji pristup 16.5.2023. Dostupno na: <https://journal.ugm.ac.id/ijc/article/view/64596/31757>
24. Cobas 6000 series brochure. Zadnji pristup 23.5.2023. Dostupno na: <https://diagnostics.roche.com>
25. McNerney, K. P., Arbeláez, A. M. Rates of adrenal insufficiency using a monoclonal vs. polyclonal cortisol assay. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism*, 2021. Zadnji pristup 20.6.2023. Dostupno na: <https://doi.org/10.1515/jpem-2021-0519>

## 8. PRILOZI

Slika 1. Histološki i anatomski prikaz nadbubrežnih žlijezda (3) .....	1
Slika 2. Biokemijska djelovanja kortizola (7) .....	2
Slika 3. Mehanizam HPA osovine (6) .....	4
Slika 4. Kortizolske frakcije u plazmi (10).....	6
Slika 5. Dnevne varijacije koncentracija kortizola, otkucaja srca i krvnog tlaka (13) .....	8
Slika 6. Mehanizmi adrenalne insuficijencije (15).....	10
Slika 7. Mehanizmi nastanka endogenog Cushingovog sindroma (6) .....	12
Slika 8. Raspodjela ispitanika prema uputnim dijagnozama .....	17
Slika 9. Spremnici za sakupljanje 24-satne mokraće (20).....	18
Slika 10. Prikupljanje 24-satne mokraće .....	19
Slika 11. Odnos signala kompetitivne imunokemijske metode i koncentracije .....	20
Slika 12. Princip ECL emisije svjetla (23) .....	22
Slika 13. Oblici ECLIA reakcija (23).....	23
Slika 14. Shematski prikaz sustava za mjerenje ECL (23).....	24
Slika 15. Integrirani sustav Cobas 6000 (24) .....	25
Slika 16. Raspodjela pacijenata s izmjerenom koncentracijom kortizola u 24-satnoj mokraći prema referentnom intervalu .....	26
Slika 17. Izvori netočnosti rezultata određivanja kortizola u mokraći .....	33
Tablica 1. Promjena koncentracija kortizola i ACTH u različitim poremećajima .....	9
Tablica 2. Reagensi Elecsys Cortisol .....	24
Tablica 3. Rezultati određivanja kortizola u 24-satnoj mokraći ECLIA metodom.....	27

## 9. SAŽETAK

**UVOD:** Kora nadbubrežne žlijezde najviše doprinosi biokemijskom metabolizmu makromolekula preko najpotentnijeg glukokortikoida – kortizola. Najvažnije funkcije su mu podizanje razine glukoze u krvi i protuupalno djelovanje. Njegov rad reguliran je osovinom hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda negativnom povratnom spregom preko CRH i ACTH koji se luče cirkadijalno na podražaj stresa. Kortizol se u krvotoku nalazi vezan za protein CBG, a uklanja se jetrom te manjim udjelom bubrezima. Poremećaji funkcije kore nadbubrežne žlijezde kao što su adrenalna insuficijencija, Cushingov sindrom i KAH odražavaju se na koncentraciji kortizola pa se mjerenje iste koristi u procjeni funkcije kore žlijezde. Mjerenja se provode iz uzoraka krvi, urina i sline.

**CILJ RADA:** Cilj rada je odrediti koncentraciju kortizola u 24-satnoj mokraći pacijenata s uputnom dijagnozom poremećaja nadbubrežne žlijezde, interpretirati dobivene rezultate shodno patofiziološkim obilježjima pojedinih poremećaja kore nadbubrežne žlijezde te opisati važnost određivanja kortizola u uzorku 24-satne mokraće kao jednog od dijagnostičkih parametara za postavljanje dijagnoze i praćenje tijeka bolesti kod bolesnika s poremećajem kore nadbubrežne žlijezde.

**MATERIJALI I METODE:** Odabrano je 10 pacijenata KBC-a Split s uputnom dijagnozom koja je uključivala neki od poremećaja kore nadbubrežne žlijezde i zahtjev za određivanje koncentracije kortizola u 24-satnoj mokraći. Uzorak pacijenata obrađen je i analiziran u Zavodu za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku prema protokolu proizvođača testa Roche „*Elecsys Cortisol*“ koji se odnosi na automatiziranu ECLIA metodu određivanja ukupnog urinarnog kortizola na analizatoru Cobas 6000.

**REZULTATI:** Referentni interval za ovu metodu je 100 – 379 nmol/dU. Četiri pacijenta imala su koncentraciju kortizola ispod 100 nmol/dU, pet pacijenata preko 379 nmol/dU, a jedan pacijent u rasponu 100 – 379 nmol/dU.

**RASPRAVA:** Rezultati su promatrani u kontekstu uputnih dijagnoza pacijenata te nisu svi u skladu s očekivanim rezultatima. Interpretacija rezultata ovisi o uputnoj dijagnozi i anamnezi. Pri donošenju medicinske odluke moraju se promatrati svi čimbenici koji bi mogli utjecati na rezultat.

**ZAKLJUČAK:** Koncentracija kortizola u mokraći nije dovoljan parametar za postavljanje dijagnoze, ali usmjerava daljnje pretrage i dovodi liječnika bliže odgovoru. Bitna je točnost i preciznost metode, pravilna obrada i rukovanje uzorkom te prikladan uzorak.

## 10. SUMMARY

**INTRODUCTION:** The adrenal cortex contributes the most to the biochemical metabolism of macromolecules through its most potent glucocorticoid – cortisol. Cortisol's most important functions are raising the glucose level in the blood and anti-inflammatory action. Its work is regulated by the hypothalamus-pituitary-adrenal gland axis by negative feedback through CRH and ACTH, which have circadian secretion upon stress stimulus. Cortisol is bound to the CBG in the bloodstream, and is eliminated by the liver and to a lesser extent by the kidneys. Disorders of the adrenal cortex function such as adrenal insufficiency, Cushing's syndrome and CAH are reflected by the cortisol concentration, so its measurement is used in the assessment of the cortex function. Measurements are performed from blood, urine and saliva.

**OBJECTIVE:** The objective is to determine cortisol concentration in the 24-hour urine of patients with a referral diagnosis of adrenal cortex disorders, to interpret the obtained results in accordance with the pathophysiological characteristics of certain disorders and to describe the importance of determining cortisol in a 24-hour urine sample as one of the diagnostic parameters for establishing a diagnosis and monitoring the course of the disease for patients with a disorder.

**MATERIALS AND METHODS:** 10 patients of UHC Split were selected with a referral diagnosis of the adrenal cortex disorder and a request for the cortisol concentration assesment in the 24-hour urine. Patient samples were processed and analyzed at the Department for Medical Laboratory Diagnostic according to the protocol of manufacturer Roche "Elecsys Cortisol" using the automated ECLIA method for determining urinary free cortisol on the Cobas 6000 analyzer.

**RESULTS:** The reference interval for this method is determined to be 100 – 379 nmol/dU. Four patients had a cortisol concentration below 100 nmol/dU, five patients above 379 nmol/dU, and one patient in the range 100 – 379 nmol/dU.

**DISCUSSION:** The results were observed in the context of referral diagnoses of patients, and not all of them were consistent with expected results. The interpretation of results depends on the technical performance of the method, patient and anamnesis. When making a medical decision, all factors that could influence the test result must be observed.

**CONCLUSION:** The cortisol urine concentration is not a sufficient parameter for establishing a diagnosis, but it directs further tests and brings the doctor closer to the answer. The accuracy and precision of the method, correct sample processing and handling as well as e proper sample are essential for correct results.

# 11. ŽIVOTOPIS

## OSOBNI PODATCI

- ▶ ime i prezime: **Lara Melvan**
- ▶ datum i mjesto rođenja: 10. srpnja 2001., Split
- ▶ mobitel: +385955865522
- ▶ e-mail: [laraa.melvann@gmail.com](mailto:laraa.melvann@gmail.com)

## OBRAZOVANJE

- ▶ **Osnovna škola kneza Mislava, Kaštel Sućurac** (2008. – 2016.)
- ▶ **Glazbena škola Josip Hatze, Kaštel Kambelovac** – klavir (2010. – 2016.)
- ▶ **Prva gimnazija Split** – jezični program (2016. – 2020.)
- ▶ **Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, Split** – preddiplomski sveučilišni studij **medicinsko laboratorijske dijagnostike** (2020. – 2023.)

## RADNO ISKUSTVO

- ▶ **Restoran Cicibela, Trogir** (sezona 2018., 2019., 2020.) – ugostiteljski poslovi
- ▶ **Nastavni zavod za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije, Split** (2022.) – pomoćni i administrativni laboratorijski poslovi
- ▶ **Dekra usluge d.o.o., Zagreb**, podružnica Split (2023. – u tijeku) – promotor

## OSOBNNE VJEŠTINE

- ▶ jezici:
  - ⇒ materinski jezik: **hrvatski**
  - ⇒ strani jezici: engleski, španjolski (**DELE B1 certifikat**)
  - ⇒ poznavanje talijanskog i francuskog jezika
- ▶ samostalan rad na računalu, Microsoft Office
- ▶ vozačka dozvola B kategorije

## DODATNE INFORMACIJE

- ▶ sudjelovanje u projektu mjuzikl „Our House“, Hrvatsko narodno kazalište Split
- ▶ volontiranje:
  - ⇒ 72h bez kompromisa 2019. – azil „Animalis“
  - ⇒ 12. Festival mediteranskog filma Split 2019.
  - ⇒ Javno zdravstvena humanitarna akcija Sveučilišnog odjela zdravstvenih studija, Split 2023.