

Usporedivost metoda za određivanje kortizola u uzorku 24h mokraće

Baras, Magdalena

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:176:366695>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**

Repository / Repozitorij:



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

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



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Magdalena Baras

**USPOREDIVOST METODA ZA ODREĐIVANJE
KORTIZOLA U UZORKU 24H MOKRAĆE**

Završni rad

Split, 2024.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
Podružnica
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Magdalena Baras

**USPOREDIVOST METODA ZA ODREĐIVANJE
KORTIZOLA U UZORKU 24H MOKRAĆE
COMPARABILITY OF METHODS FOR THE
DETERMINATION OF CORTISOL IN A 24H URINE
SAMPLE**

Završni rad/Bachelor's Thesis

Mentor:

**Izv. prof. dr. sc. Daniela Šupe – Domić, mag. med. biochem.
spec. med. biokemije i lab. medicine**

Split, 2024.

Sveučilište u Splitu
Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
Prijediplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike

Znanstveno područje: Biomedicina i zdravstvo
Znanstveno polje: Kliničke medicinske znanosti

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Daniela Šupe-Domić, mag. med. biochem. spec. med. biokemije i lab. medicine

USPOREDIVOST METODA ZA ODREĐIVANJE KORTIZOLA U UZORKU 24H MOKRAĆE
Magdalena Baras

Sažetak:

Nadbubrežna žlijezda sastoji se od srži koja sintetizira kateholamine i kore koja sintetizira steroidne hormone, pri čemu obje komponente imaju specifične funkcije i regulacije unutar endokrinog sustava. Hiperfunkcija nadbubrežne žlijezde uzrokovana je prekomjernim lučenjem određenog hormona, što može dovesti do stanja kao što su hiperaldosteronizam, koji uzrokuje hipertenziju i hipokalijemiju zbog viška aldosterona ili Cushingov sindrom koji je posljedica dugotrajno povišene razine kortizola, a očituje se simptomima poput debljanja, slabosti mišića i visokog krvnog tlaka. Hipofunkcija nadbubrežne žlijezde može biti uzrokovana primarnom, sekundarnom ili tercijarnom insuficijencijom, s mogućim ozbiljnim komplikacijama poput adrenalne krize, dok hipoaldosteronizam uzrokuje nedostatak aldosterona, a Addisonovu bolest, često autoimunu, karakterizira postupni početak. Kortizol, hormon stresa koji se sintetizira iz kolesterola u nadbubrežnim žlijezdama, izlučuje se cirkadijalnim ritmom, regulira se kroz negativnu povratnu spregu, ključan je za energetski metabolizam, ravnotežu elektrolita te utječe na imunološki sustav, a njegov metabolizam odvija se kroz pretvaranje u kortizon i daljnji metabolizam. Analizirano je 40 uzoraka 24h mokraće pacijenata u dobi 25 - 83 godine (30 žena, 10 muškaraca) uz pomoć dvije metode mjerenja koncentracije kortizola elektrokemiluminiscentnim imunitestom (ECLIA) na Cobas uređajima proizvođača Roche Diagnostics, uz statističku obradu podataka pomoću "MedCalc" softvera. Istraživanje je analiziralo distribuciju podataka i usporedilo dvije metode korištenjem Kolmogorov-Smirnov testa i Passing-Bablokove regresije. Prva metoda, koja uključuje ekstrakciju uzorka, nema značajno odstupanje od normalne distribucije, dok je druga metoda, bez ekstrakcije, pokazala značajno odstupanje od normalne distribucije. Rezultati regresije pokazuju značajnu proporcionalnu razliku između metoda, pri čemu metoda koja uključuje ekstrakciju uzorka daje dosljedno više vrijednosti. Međutim, sustavna razlika između metoda nije značajna, a visoka korelacija sugerira dosljednost metoda unatoč proporcionalnim razlikama. Zaključak istraživanja ističe značajne razlike između dviju metoda za mjerenje kortizola u mokraći. Unatoč proporcionalnim razlikama, visoka korelacija između metoda ukazuje na konzistentnost mjerenja. Ovi nalazi naglašavaju potrebu za pažljivim razumijevanjem specifičnosti i kalibracija metoda pri interpretaciji rezultata.

Ključne riječi: kortizol; 24h mokraća; ECLIA

Rad sadrži: 38 stranica, 11 slika, 6 tablica, 17 priloga, 19 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
University Department for Health Studies
Bachelor Study of Medical laboratory diagnostics

Scientific area: Biomedicine and health
Scientific field: Clinical medical sciences

Supervisor: Assoc. prof. Daniela Šupe - Domić, PhD, EuSpLM

**COMPARABILITY OF METHODS FOR THE DETERMINATION OF CORTISOL IN A 24H
URINE SAMPLE**
Magdalena Baras

Summary:

The adrenal gland consists of a medulla that produces catecholamines and a cortex that produces steroid hormones, both components having specific functions and regulations within the endocrine system. Hyperfunction of the adrenal gland is caused by the excessive secretion of a certain hormone, which can lead to conditions such as hyperaldosteronism, which causes hypertension and hypokalemia due to excess aldosterone, or Cushing's syndrome, which is the result of long-term elevated cortisol levels, and is manifested by symptoms such as weight gain, muscle weakness and high blood pressure. Adrenal hypofunction can be caused by primary, secondary or tertiary insufficiency, with possible serious complications such as adrenal crisis, while hypoaldosteronism causes a lack of aldosterone, and Addison's disease, often autoimmune, is characterized by a gradual onset. Cortisol, a stress hormone that is synthesized from cholesterol in the adrenal glands, secreted in a circadian rhythm, regulated through a negative feedback loop is crucial for energy metabolism, electrolyte balance and affects the immune system, and its metabolism takes place through conversion into cortisone and further metabolism. 40 samples of 24h urine from patients aged 25 - 83 (30 women, 10 men) were analyzed with two methods of measuring cortisol concentration by electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) on Cobas devices manufactured by Roche Diagnostics, with statistical data processing using "MedCalc" software. The research analyzed the data distribution and compared the two methods using the Kolmogorov-Smirnov test and the Passing-Bablok regression. The first method, which includes sample extraction, has no significant deviation from the normal distribution, while the second method, without extraction, showed a significant deviation from the normal distribution. The regression results show a significant proportional difference between the methods, with the method involving sample extraction giving consistently higher values. However, the systematic difference between the methods is not significant and the high correlation suggests the consistency of the methods despite the proportional differences. The conclusion of the research highlights significant differences between the two methods for measuring cortisol in urine. Despite the proportional differences, the high correlation between the methods indicates the consistency of the measurements. These findings emphasize the need for careful understanding of method specificity and calibration when interpreting results.

Keywords: cortisol; 24h urine; ECLIA

Thesis contains: 38 pages, 11 figures, 6 tables, 17 supplements, 19 references

Original in: Croatian

SADRŽAJ

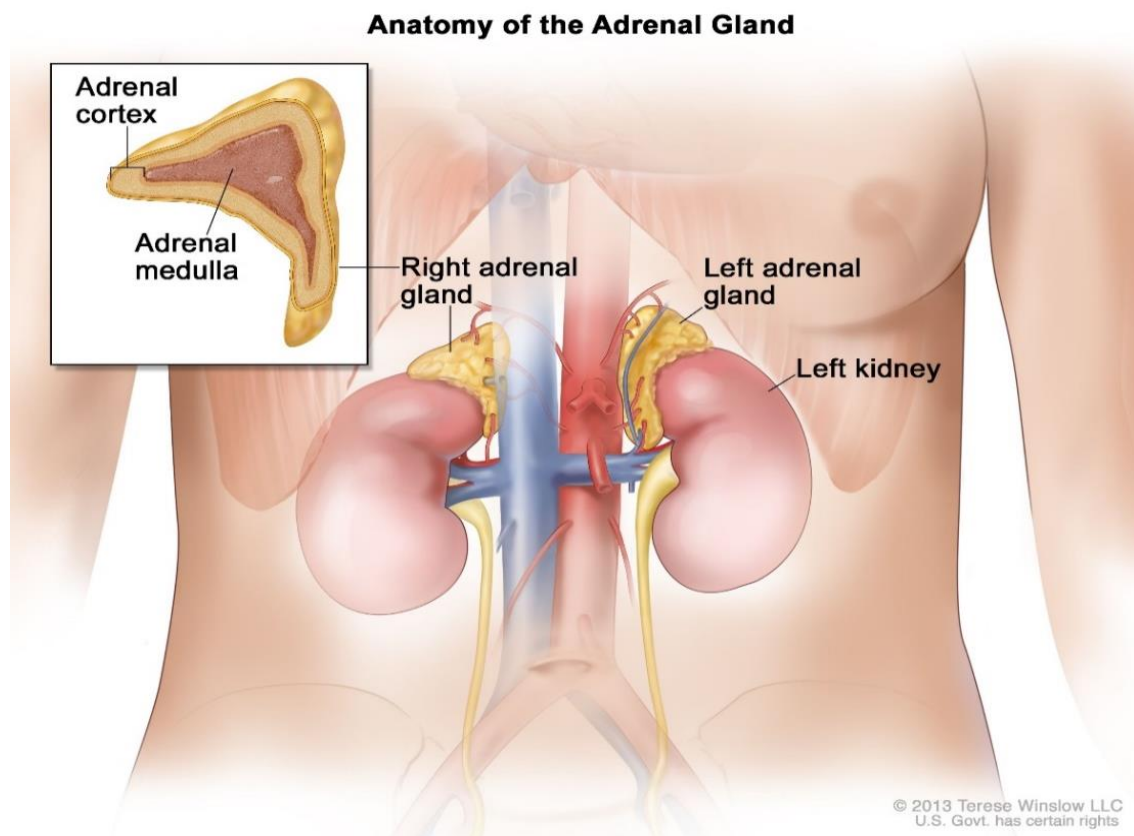
| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1 NADBUBREŽNA ŽLIJEZDA | 1 |
| 1.1.1 Srž nadbubrežne žlijezde | 2 |
| 1.1.2 Kora nadbubrežne žlijezde | 2 |
| 1.2 HIPERFUNKCIJA NADBUBREŽNE ŽLIJEZDE | 3 |
| 1.2.1 Hiperaldosteronizam | 3 |
| 1.2.2 Cushingov sindrom..... | 4 |
| 1.3 HIPOFUNKCIJA NADBUBREŽNE ŽLIJEZDE | 7 |
| 1.3.1 Hipoaldosteronizam..... | 7 |
| 1.3.2 Addisonova bolest | 8 |
| 1.4 KORTIZOL | 10 |
| 1.4.1 Sinteza i transport..... | 10 |
| 1.4.2 Negativna povratna sprega | 11 |
| 1.4.3 Uloga | 12 |
| 1.4.4 Cirkadijalni ritam..... | 12 |
| 1.4.5 Metabolizam kortizola..... | 13 |
| 1.5 MOKRAĆA | 14 |
| 1.5.1 Kortizol u mokraći..... | 14 |
| 2. CILJ RADA | 15 |

| | |
|---|----|
| 3. MATERIJALI I METODE | 16 |
| 3.1 ISPITANICI | 16 |
| 3.2 METODE | 16 |
| 3.2.1 Sakupljanje 24h mokraće..... | 16 |
| 3.2.2 Određivanje koncentracije kortizola u uzorku 24h mokraće..... | 17 |
| 3.2.3 Statistička obrada | 19 |
| 4. REZULTATI | 20 |
| 4.1 ELEKTROKEMILUMINISCENTNI IMUNOTEST (ECLIA)..... | 20 |
| 4.2 KOLMOGOROV-SMIRNOV TEST..... | 21 |
| 4.3 PASSING-BABLOK REGRESIJA | 24 |
| 5. RASPRAVA | 27 |
| 6. ZAKLJUČAK | 29 |
| 7. LITERATURA | 30 |
| 8. ŽIVOTOPIS | 32 |

1. UVOD

1.1 NADBUBREŽNA ŽLIJEZDA

Parni organ u sklopu endokrinog sustava, piramidnog oblika, smješten uz gornji pol svakog bubrega od kojeg je odvojen slojem masnog tkiva. Spada u skupinu žlijezda s unutaršnjim izlučivanjem, što znači da svoje hormone oslobađa u krvotok i tako djeluje na udaljena ciljna tkiva u organizmu. Svaka nadbubrežna žlijezda sastoji se od dva dijela (slika 1.): unutarnje srži, koja sintetizira noradrenalin i adrenalin te vanjske kore, koja sintetizira steroidne hormone uključujući mineralokortikoide, glukokortikoide i spolne hormone. Struktura i funkcija ova dva dijela nadbubrežne žlijezde znatno se razlikuju (1).



Slika 1. Anatomija nadbubrežne žlijezde

(Izvor: <https://nci-media.cancer.gov/pdq/media/images/739009.jpg>)

1.1.1 Srž nadbubrežne žlijezde

Čini oko 10 % ukupne težine nadbubrežne žlijezde te je sastavni dio simpatičkog živčanog sustava. Kromafine stanice, koje pohranjuju hormone u sekretorne vezikule poznate i kao kromafine granule, sadrže dopamin, adrenalin i noradrenalin. Ovi hormoni su fiziološki aktivne molekule poznate kao kateholamini. Kateholamini djeluju i kao neurotransmiteri i kao hormoni zaduženi za održavanje homeostaze kroz autonomni živčani sustav. Kada su stimulirane simpatičkim živčanim impulsima, kromafine granule se oslobađaju iz stanica i hormoni ulaze u cirkulaciju, što je proces poznat kao egzocitoza (2).

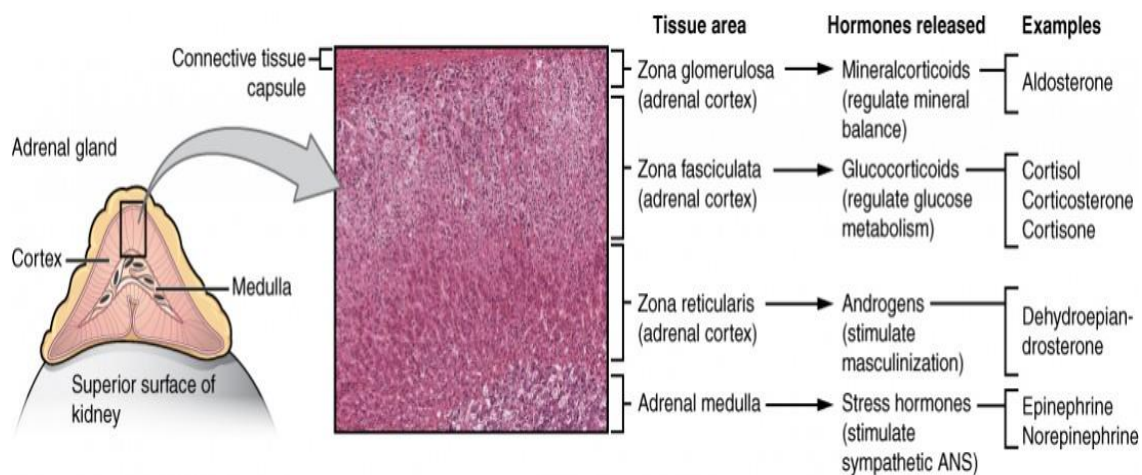
1.1.2 Kora nadbubrežne žlijezde

Čini oko 90 % ukupne težine nadbubrežne žlijezde kod odraslih ljudi. Izvana prema unutra sadržava tri koncentrične zone (slika 2.): zona glomerulosa, zona fasciculata i zona reticularis. Pod kontrolom kortikotropin oslobađajućeg hormona (engl. *corticotropin-releasing hormone*, CRH) iz hipotalamusa, adenohipofiza luči adrenokortikotropni hormon (engl. *adrenocorticotropic hormone*, ACTH) koji potiče koru nadbubrežne žlijezde na stvaranje kortikosteroidnih hormona te u manjoj mjeri spolnih hormona.

Kortikosteroidi su derivati kolesterola slične strukture, ali različitog fiziološkog djelovanja pa se prema tome dijele na glukokortikoide i mineralokortikoide.

Mineralokortikoidi se sintetiziraju u zoni glomerulosi kore nadbubrežne žlijezde, a predstavnik je hormon aldosteron, hormon kojem je uloga održavanje ravnoteže vode i elektrolita u krvi tako što u bubrezima potiče tubularnu reapsorpciju natrija te izlučivanje kalija i vodikovih iona. Osim ACTH, sintezu aldosterona kontrolira i renin-angiotenzin sustav.

Glukokortikoidi se sintetiziraju u zoni fasciculati kore nadbubrežne žlijezde, a predstavnik je hormon kortizol. Uloga ove skupine hormona uključuje stimulaciju glukoneogeneze, po kojoj je skupina i dobila ime, što posljedično dovodi do porasta koncentracije glukoze u krvi (3).



Slika 2. Histologija nadbubrežne žlijezde

(Izvor: https://s3-us-west-2.amazonaws.com/courses-images-archive-read-only/wp-content/uploads/sites/403/2015/04/21031214/1818_The_Adrenal_Glands.jpg)

1.2 HIPERFUNKCIJA NADBUBREŽNE ŽLIJEZDE

Kada se izlučuje prekomjerna količina hormona nadbubrežne žlijezde, vrsta poremećaja će ovisiti o tome o kojem je hormonu riječ.

1.2.1 Hiperaldosteronizam

Stanje praćeno prekomjernom sintezom aldosterona, mineralokortikoidnoga hormona najpovršnijeg sloja kore nadbubrežne žlijezde, zone glomerulose. Aldosteron potiče zadržavanje natrija i vode u organizmu te izlučivanje kalija mokraćom što dovodi do povećanja krvnog tlaka i hipokalijemije. Porijeklom ovo stanje može biti primarno i sekundarno, a oba se prezentiraju na sličan način. Niska koncentracija i aktivnost renina u plazmi identificiraju primarni hiperaldosteronizam zbog neodgovarajuće autonomne hipersekrecije aldosterona iz disfunkcionalne zone glomerulose u nadbubrežnoj žlijezdi (4).

Primarni hiperaldosteronizam karakterizira niska koncentracija kalija u serumu i hipertenzija, što može uzrokovati slabost mišića, umor, bolove ili grčeve te pojačanu žeđ i mokrenje. Osim toga, pacijenti mogu imati glavobolje, trnce u rukama i nogama te poremećaje srčanog ritma, uključujući tahikardiju (5).

Sekundarni hiperaldosteronizam nastaje kao posljedica prekomjerne sinteze i aktivnosti renina zbog raznih bolesti. U tim situacijama uspješno liječenje primarne bolesti dovodi do obnove normalne sinteze renina, angiotenzina i aldosterona, no ako liječenje nije uspjelo, tada se mogu dati lijekovi koji blokiraju djelovanje aldosterona na bubrege. Većina bolesnika sa sekundarnim hiperaldosteronizmom nema hipertenziju niti niske koncentracije kalija u serumu. Kada se gubi sol i voda kao posljedica pretjeranog znojenja, proljeva ili dugotrajnog povraćanja, povećava se sinteza renina, a time i aldosterona. Povišena razina aldosterona stimulira bubrege na ponovno apsorpiranje soli i vode iz mokraće kako bi ispravili deficite koncentracije elektrolita u serumu i volumena krvi (4).

1.2.2 Cushingov sindrom

Poremećaj koji se javlja kada se u organizmu stvara višak kortizola, hormona kore nadbubrežne žlijezde, tijekom dugog vremenskog perioda. Kortizol se također naziva i "hormonom stresa" jer pomaže pri odgovoru tijela na stres. Ovaj hormon sudjeluje u regulaciji koncentracije glukoze u krvi, održavanju krvnog tlaka, smanjenju upale u organizmu i pretvaranju hrane u energiju.

Cushingov sindrom obično pogađa osobe u dobnom rasponu od 30 do 50 godina, ali može se pojaviti i kod djece, također trostruko više pogađa žene. Postoje dvije glavne etiologije Cushingovog sindroma, a to su endogeni hiperkortizolizam i egzogeni hiperkortizolizam.

Egzogeni hiperkortizolizam, najčešći uzrok Cushingovog sindroma, podrazumijeva da je poremećaj induciran dugotrajnom uporabom lijekova, najčešće glukokortikoida. Ovi lijekovi koriste se za liječenje medicinskih stanja kao što su reumatoidni artritis, astma i lupus. Upotreba glukokortikoida također potiskuje imunološki sustav nakon transplantacije organa kako bi tijelo spriječilo odbacivanje novog organa.

Endogeni hiperkortizolizam, koji je znatno rjeđi, nastaje zbog prekomjerne sinteze kortizola u nadbubrežnim žlijezdama i može biti ovisan o adrenokortikotropnom hormonu ili neovisan.

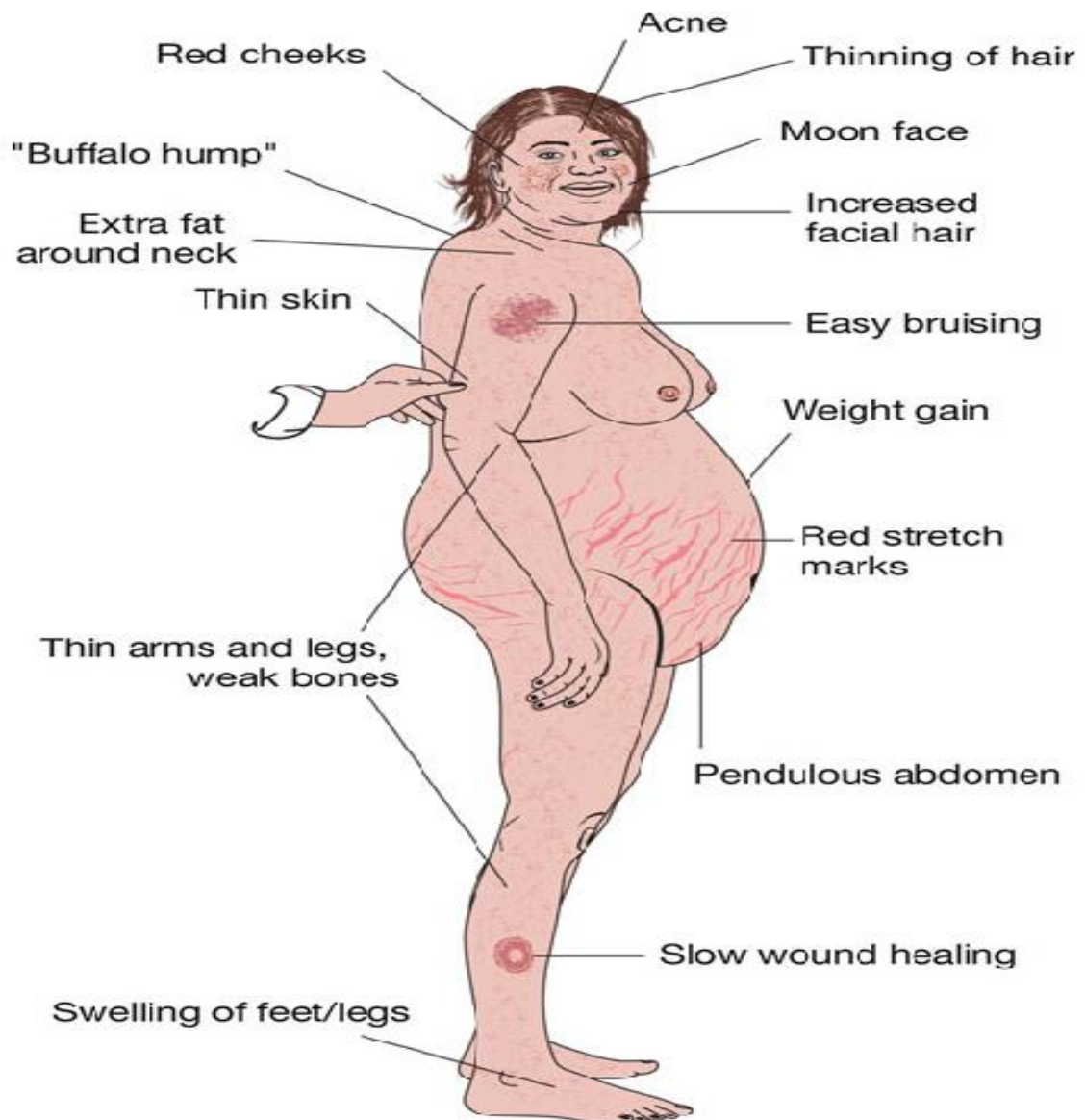
Adenomi hipofize koji luče adrenokortikotropni hormon kod Cushingove bolesti i ektopična sekrecija iz novotvorina odgovorni su za adrenokortikotropni hormon ovisni Cushingov sindrom. Hiperplazija nadbubrežne žlijezde, adenom i karcinom glavni su uzroci Cushingovog sindroma neovisnog o adrenokortikotropnom hormonu (6).

Cushingov sindrom može biti teško dijagnosticirati, jer simptomi kao što su debljanje i umor mogu imati mnogo različitih uzroka, također se može zamijeniti s drugim stanjima kao što su metabolički sindrom ili sindroma policističnih jajnika.

Pretrage mokraće, sline ili krvi mogu se koristiti za dijagnosticiranje Cushingovog sindroma. Cushingov sindrom može uzrokovati zdravstvene probleme kao što su infekcije, visoki krvni tlak, inzulinska rezistencija, srčani i moždani udar, dijabetes tipa 2, gubitak koštane mase, depresija, gubitak pamćenja ili poteškoće s koncentracijom. Iako je Cushingov sindrom izlječiv, ako se ne liječi može biti fatalan.

Simptomi Cushingovog sindroma kod ljudi koji imaju vrlo visoke razine kortizola dulje vrijeme biti će jasno uočljivi, a uključuju (slika 3.): debljanje, okruglo lice, akne, crvene obraze, masnu grbu između ramena, tanke ruke i noge, lako stvaranje modrica, tanku kožu, široke crvene strije, uglavnom na trbuhu, grudima, bokovima i ispod pazuha, slabi mišići, sporo cijeljenje rana, natečene gležnjeve.

Žene mogu imati višak dlaka na licu, vratu, prsima, trbuhu i bedrima, a menstruacije mogu postati neredovite ili prestati. Muškarci mogu imati smanjenu plodnost, dok djeca s Cushingovim sindromom imaju tendenciju pretilosti i rastu sporije od druge djece (7).



Slika 3. Simptomi Cushingovog sindroma

(Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Signs-and-symptoms-of-Cushings-disease_fig1_259700558)

1.3 HIPOFUNKCIJA NADBUBREŽNE ŽLIJEZDE

Kada se izlučuje nedostatna količina hormona nadbubrežne žlijezde razlog može biti primarna adrenalna insuficijencija koja nastaje kada postoji patologija koja utječe na samu nadbubrežnu žlijezdu. Sekundarna insuficijencija nadbubrežne žlijezde posljedica je smanjene razine hormona adrenokortikotropina (ACTH) koji se oslobađa iz hipofize, a tercijarna insuficijencija nadbubrežne žlijezde rezultat je smanjene razine hormona koji oslobađa kortikotropin (CRH) koji se oslobađa iz hipotalamusa (8).

Najozbiljnija komplikacija insuficijencije nadbubrežne žlijezde naziva se adrenalna kriza. Ako se odmah ne liječi, adrenalna kriza može uzrokovati smrt. Tijekom fizičkog stresa kao što su bolest, ozbiljne ozljede ili operacije organizam treba mnogo više kortizola nego inače. Ozbiljan nedostatak kortizola u tim trenucima može uzrokovati po život opasan nizak krvni tlak, nisku razinu glukoze u krvi, nisku razinu natrija u krvi i visoku razinu kalija u krvi (9).

1.3.1 Hipoaldosteronizam

Kliničko je stanje karakterizirano nedostatkom aldosterona, hormona zone glomerulose, najudaljenijeg sloja kore nadbubrežnih žlijezda ili njegovim poremećenim djelovanjem na razini tkiva. Zona glomerulosa jedinstvena je po tome što posjeduje gen CYP11B2 i enzim aldosteron sintazu koji igraju ključnu ulogu u sintezi aldosterona (10).

Hipoaldosteronizam je povezan ili s nedovoljnom sintezom aldosterona ili s rezistencijom na aldosteron, što se naziva pseudohipoaldosteronizam. Bolesnici s nedostatkom aldosterona obično imaju slične simptome i nalaze koji uključuju: zastoje u razvoju, povraćanje, hiponatrijemiju, hiperkalemiju i metaboličku acidozu. Točna dijagnoza ovih kliničkih stanja stoga može biti izazovna (11).

1.3.2 Addisonova bolest

Stečena primarna insuficijencija nadbubrežne žlijezde, rijedak, ali potencijalno po život opasan endokrini poremećaj koji je posljedica razaranja kore nadbubrežne žlijezde što dovodi do smanjene sinteze adrenalnih hormona, uključujući kortizol, aldosteron i androgene.

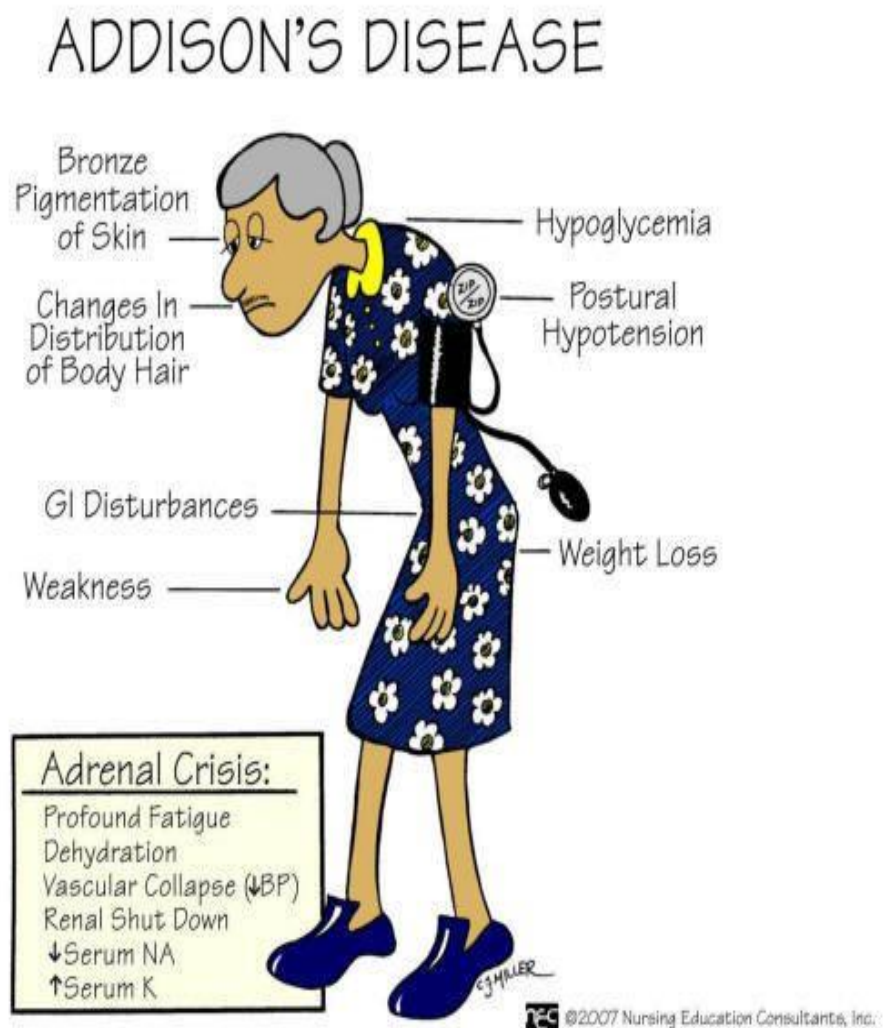
Najčešći uzrok primarne insuficijencije nadbubrežne žlijezde je autoimuni adrenalitis, povezan s povišenim razinama antitijela na enzim 21-hidroksilazu. Nedostatak ovog enzima uzrokuje hiperplaziju nadbubrežne žlijezde. Bilo koji proces koji uzrokuje izravnu ozljedu kore nadbubrežne žlijezde može rezultirati primarnom insuficijencijom nadbubrežne žlijezde, odnosno nastankom Addisonove bolesti.

U većini razvijenih zemalja najčešći uzrok Addisonove bolesti je autoimuna destrukcija nadbubrežnih žlijezda koja može biti izolirani nalaz ili dio autoimunih poliglandularnih endokrinopatija (12). Bolesnici s autoimunom bolešću nadbubrežne žlijezde imaju veću vjerojatnost da će imati poliglandularni autoimuni sindrom. Ovaj sindrom je karakteriziran zatajenjem nekoliko endokrinih žlijezda kao i neendokrinih organa, uzrokovanim imunološki posredovanom destrukcijom endokrinih tkiva (13).

Ostali uzroci Addisonove bolesti uključuju infekcije poput sepse i tuberkuloze. Rjeđi uzroci uključuju sarkoidozu, bolest nepoznate etiologije karakteriziranu nakupljanjem upalnih stanica u granulome, zatim amiloidozu, bolest koja nastaje nakupljanjem i stvaranjem naslaga abnormalnih proteina koji se nazivaju amiloidi, potom gljivične infekcije te genetske poremećaje kao što je autosomno recesivna Wolmanova bolest, karakterizirana nedostatkom lizosomske kisele lipaze, enzima koji sudjeluje u razgradnji triglicerida.

Addisonova bolest obično ima postupni početak praćen nespecifičnim simptomima, što često dovodi do odgođene dijagnoze. Najčešće se javlja tijekom drugog do trećeg desetljeća života.

Simptomi uključuju (slika 4.): umor, bol u trbuhu, gubitak težine, mučninu, povraćanje, vrtoglavicu, bol u zglobovima i mišićima te hiperpigmentaciju kože i sluznica koja je najizraženija na područjima izloženim suncu, a često se vidi kasnije u tijeku bolesti. Ova hiperpigmentacija je posljedica povišenih razina ACTH jer hormon koji stimulira melanocite potječe od istog prekursora. U mnogim slučajevima dijagnoza se postavlja tek nakon pojave akutne adrenalne krize koja uključuje posturalnu hipotenziju, hiponatrijemiju, hiperkalijemiju, hipoglikemiju, tešku dehidraciju i šok (12).



Slika 4. Simptomi Addisonove bolesti i adrenalne krize

(Izvor: <https://cdnrmi-19948.kxcdn.com/sites/default/files/Disease-2021-02/Addisons%20disease.jpg>)

1.4 KORTIZOL

1.4.1 Sinteza i transport

Kortizol je glukokortikoidni hormon koji se sintetizira u mitohondrijima zone fasciculate kore nadbubrežne žlijezde iz kolesterola uz pomoć hidroksteroid dehidrogenaza i članova superobitelji citokroma P450. Superobitelj proteina nazvanih enzimi citokrom P450 (CYP) uključeni su u sintezu i metabolizam niza staničnih komponenti. Naziv "enzimi citokrom P450" izveden je zbog njihovih nekoliko karakteristika. Vezani su za membranu stanica (cito) i sadrže hem pigment (krom i P). Broj 450 izveden je iz spektrofotometrijskog vrha na valnoj duljini apsorpcijskog maksimuma enzima (450 nm) kada je u reduciranom stanju i u kompleksu s ugljikovim monoksidom.

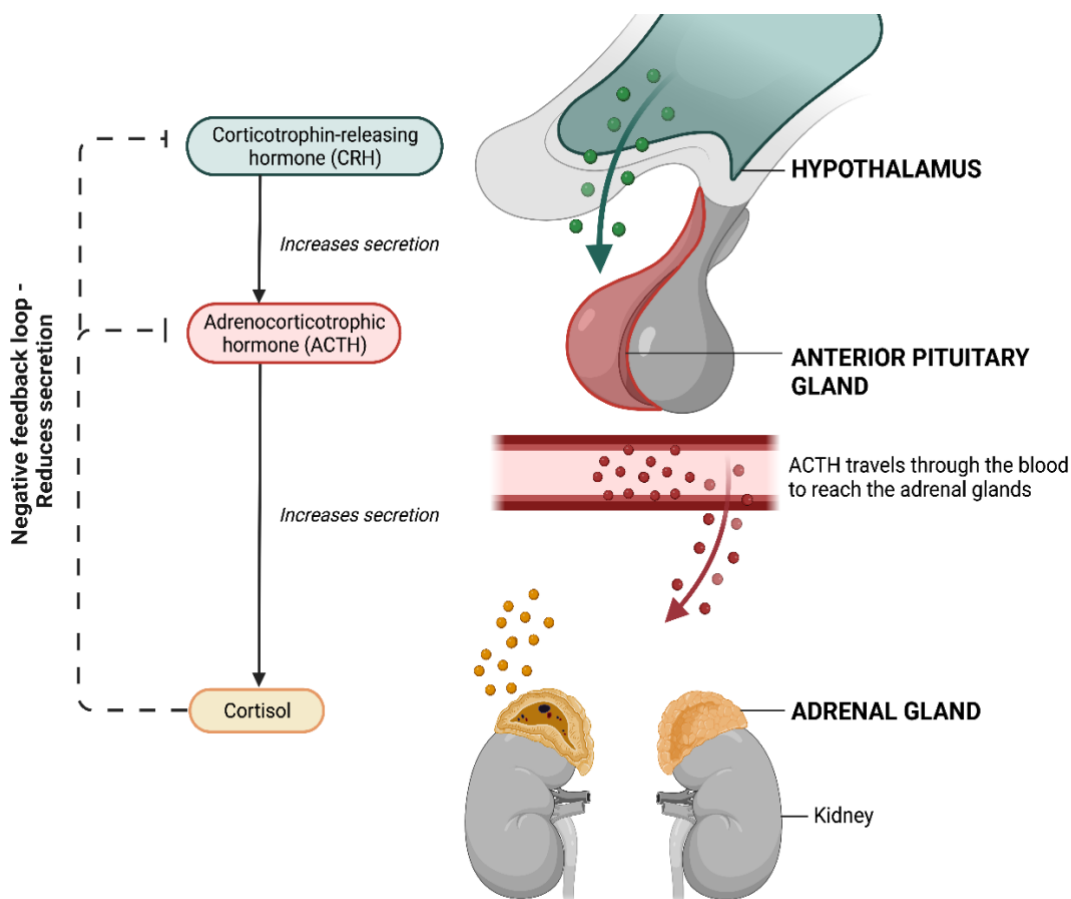
Esterificirani kolesterol u nadbubrežnoj žlijezdi uskladišten je u obliku citoplazmatskih lipidnih kapljica. Nakon što hipofizni hormon ACTH stimulira nadbubrežnu žlijezdu, aktivira se enzim esteraza te slobodni kolesterol odlazi u mitohondrij gdje se počinje odvijati sinteza kortizola.

Metabolički, kolesterol se uklanjanjem bočnog lanca na C20 uz pomoć enzima dezmolaze pretvara u pregnenolon koji se zatim pretvara u progesteron uz pomoć 3 β -hidroksteroid dehidrogenaze. Enzim 17-hidroksilaza (CYP17) katalizira pretvorbu progesterona u 17-hidroksiprogesteron, koji se zatim pretvara u 11-deoksikortizol djelovanjem 21 α -hidroksilaze (CYP21). Posljednji korak uključuje 11 β -hidroksilaciju 11-deoksikortizola do krajnjeg proizvoda, kortizola uz pomoć 11-hidroksilaze.

Glavna frakcija kortizola cirkulira vezana za proteine plazme, oko 80 % je vezano za kortikosteroid vezni globulin (engl. *corticosteroid binding globulin*, CBG), a oko 10 % za serumski albumin. CBG se sintetizira uz pomoć estrogena, skupine steroidnih hormona, u jetri. Jakost veze između glukokortikoida i proteinskog nosača definira biološki poluživot hormona pa tako kortizol, koji se čvrsto veže za CBG ima poluvrijeme života od oko 2 sata. Samo je slobodna frakcija kortizola biološki aktivna, a čini samo 5 - 10 % ukupne koncentracije ovog hormona (14,15).

1.4.2 Negativna povratna sprega

Izlučivanje kortizola uglavnom kontrolira osovina hipotalamus-adenohipofiza-kora nadbubrežne žlijezde. Kada su razine kortizola u krvi niske, hipotalamus oslobađa kortikotropin oslobađajući hormon (CRH) koji stimulira adenohipofizu na lučenje adrenokortikotropnog hormona (ACTH) u krvotok. Visoke razine ACTH stimuliraju lučenje kortizola te uzrokuju porast razine kortizola u krvi. Kako razina kortizola u krvi raste, povratno blokira oslobađanje CRH iz hipotalamusa i ACTH iz hipofize (slika 5.). Ovaj proces naziva se regulacija negativnom povratnom spregom (16).



Slika 5. Negativna povratna sprega

(Izvor: <https://www.yourhormones.info/media/gxdfq10k/230413-figure-1.png>)

1.4.3 Uloga

Kortizol, također poznat kao hormon stresa, ima važnu ulogu u regulaciji mnogih fizioloških procesa, uključujući energetske metabolizam, održavanje ravnoteže elektrolita, održavanje krvnog tlaka, proliferaciju stanica kao i kognitivne funkcije. Povećava brzinu glomerularne filtracije u bubrezima i djeluje na distalni tubul gdje potiče zadržavanje natrija i izlučivanje kalija. Kortizol je izravno uključen u energetske metabolizam kroz učinke na sintezu i razgradnju proteina, ugljikohidrata i lipida.

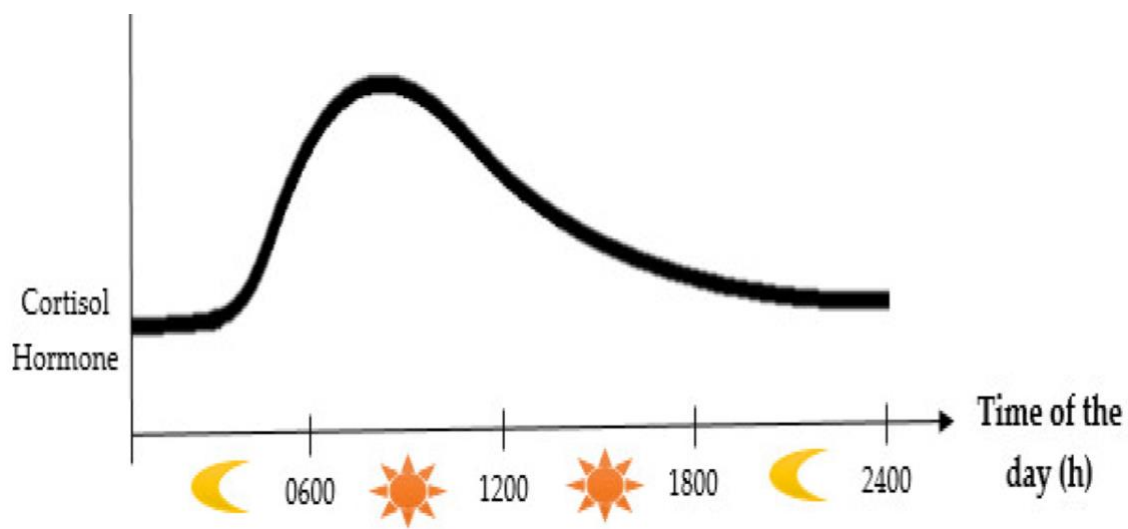
Kortizol i njegovi sintetski derivati, kao što su deksametazon i prednizon su poznati kao glukokortikoidi zbog svoje sposobnosti stimulacije glukoneogeneze. Glukoneogenezom kortizol stimulira razgradnju masti i proteina te njihovu pretvorbu u glukozu u jetri tako što aktivira ključne enzime kao što su glukozna-6-fosfataza i fosfoenolpiruvat te inhibira sintezu proteina kako bi osigurao dovoljno supstrata. Konačni rezultat ovog procesa je povećanje koncentracije glukoze u krvi.

U pacijenata sa teškim stresom, kortizol osim što olakšava sintezu glukoze, također smanjuje upalu i podiže krvni tlak. Kortizol djeluje imunosupresivno i protuupalno tako što potiče preraspodjelu cirkulirajućih limfocita u koštano srž, slezenu i limfne čvorove, inhibira sintezu imunoglobulina i diferencijaciju monocita u makrofage, sprječava sintezu upalnih citokina te smanjuje sintezu histamina (16,17).

1.4.4 Cirkadijalni ritam

U normalnim uvjetima, bez prisutnih ikakvih stresora, kortizol u krvotok luče nadbubrežne žlijezde u cirkadijalnom ritmu. Kod ljudi, najveća razina sekrecije kortizola javlja se ujutro, što se smatra aktivnom fazom, dok je najniža sekrecija noću (slika 6.). Na temelju normalne fiziologije, razine kortizola niže su u početnom dijelu sna, do porasta dolazi kako se san bliži kraju, dok najviše razine doseže nekoliko minuta prije buđenja.

Kortizol je ključni igrač u cirkadijalnom sustavu koji utječe na gotovo svako tkivo u organizmu, kontrolirajući određene biološke cikličke funkcije. Jasne varijacije u razinama kortizola mogu pomoći u objašnjenju funkcije kortizola u zdravlju i bolesti. Na cirkadijalni ritam kortizola dodatno utječe više faktora, uključujući: nedostatak sna, dob, spol, etničku pripadnost i fazu menstrualnog ciklusa (14,17).



Slika 6. Cirkadijalni ritam hormona kortizola

(Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7830980/bin/ijerph-18-00676-g002.jpg>)

1.4.5 Metabolizam kortizola

Kortizol se konjugira s glukuronskom kiselinom u jetri te dalje metabolizira u bubrezima. Kortizol se također metabolizira u neaktivni kortizon pomoću 11-hidroksisteroid dehidrogenaze tipa 2 (11β -HSD2) koja se nalazi u žlijezdama slinovnicama, bubrezima i kosi. Gliciretinska kiselina inhibira ovaj enzim, što rezultira smanjenom deaktivacijom kortizola u inaktivni kortizon. Neki od ostalih inhibitora 11β -HSD2 uključuju sok od grejpa, kao i gosipol iz biljke pamuka i ftalate (18).

1.5 MOKRAĆA

Mokraća je vodena otopina organizmu nepotrebnih tvari i otpadnih metabolita. Nastaje u bubrezima, glomerularnom filtracijom krvi, sakuplja se u mokraćnom mjehuru te se izlučuje voljnim činom koji se naziva mikcija (19).

1.5.1 Kortizol u mokraći

U fiziološkim uvjetima, bubrezi filtriraju i djelomično reapsorbiraju slobodni kortizol, dok se samo mali dio, približno 2 %, izlučuje nepromijenjeno putem mokraće. Kortizol u mokraći odražava koncentraciju endogenog kortizola bolje nego njegovi metaboliti.

Bolesnici s hiperkortizolemijom imaju značajno viši bubrežni klirens kortizola od bolesnika s normalnim kortizolom u serumu zbog brzog porasta slobodnog serumskog kortizola nakon što se prekorači kapacitet vezanja kortikosteroid veznog proteina, koji iznosi oko 500 nmol/L te zbog kontinuiranog izlučivanja kortizola tijekom noći. Stoga, koncentracija slobodnog kortizola u 24h uzorku mokraće dobro korelira sa koncentracijom slobodnog kortizola u serumu kod bolesnika s hiperkortizolemijom, osim onih s teškim oštećenjem bubrega te se koristi kao test probira.

Kortizol u mokraći prvo je mjeren fluorimetrijski, a zatim su razvijeni radioimunotest (RIA), enzimski imunotest (EIA) i kemiluminiscentni test (CLIA). Međutim, prisutnost konjugiranih metabolita kortizola u mokraći koji mogu križno reagirati s antitijelima imunološkog testa zahtijevala je ekstrakciju slobodnog kortizola prije analize. Miješanjem mokraće s organskim otapalom i uklanjanjem vodenog sloja, kortizol, koji je manje topiv u vodi od većine njegovih metabolita, može se odvojiti prije analize. Kako bi se dodatno poboljšala specifičnost testova kortizola u mokraći, uvedena je kromatografija koja je u početku služila kao korak pročišćavanja prije imunološkog testa, a sada je postala metoda izbora (17).

2. CILJ RADA

Ciljevi rada su:

1. Opisati nadbubrežnu žlijezdu i poremećaje koji nastaju kod prekomjernog i nedovoljnog lučenja kortizola te objasniti sintezu, metabolizam i uloge kortizola
2. Provesti analize za određivanje koncentracije kortizola u uzorcima 24h mokraće s dvije ECLIA metode na dva automatizirana imunoanalizatora proizvođača Roche
3. Statističkom obradom podataka usporediti metode

3. MATERIJALI I METODE

3.1 ISPITANICI

Analiza je provedena na uzorcima 24h mokraće pacijenata upućenih od strane liječnika obiteljske medicine na pretragu mjerenja koncentracije kortizola u okviru rutinskih dijagnostičkih postupaka. Upute za uzorkovanje pacijenti su dobili od strane svoga liječnika, a spremnike za uzorkovanje su preuzeli u Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split.

Ukupno je analizirano 40 uzoraka pacijenata u dobi od 25 do 83 godina uključujući 30 žena i 10 muškaraca. Analiza se provela s dvije imunološke elektrokemiluminiscenctne metode: Elecsys Cortisol i Elecsys Cortisol III proizvođača Roche. Podaci su statistički obrađeni uz pomoć softverskog paketa „MedCalc“.

3.2 METODE

3.2.1 Sakupljanje 24h mokraće

Prema uputama s web stranice KBC-a Split (www.kbsplit.hr) za sakupljanje 24h mokraće za određivanje steroida potrebno je preuzeti posudu za sakupljanje mokraće u laboratoriju. Pacijent je dužan odbaciti prvu jutarnju porciju mokraće te definirati vrijeme početka sakupljanja, na primjer 8:00h. Nakon toga svaku sljedeću porciju mokraće potrebno je sakupiti u čistu posudu. Sljedećeg jutra potrebno je isprazniti mjehur u isto vrijeme koje je definirano te tu porciju dodati u posudu sa sakupljenom mokraćom od prethodnog dana. Vrlo je bitno sakupiti sav volumen mokraće izmokrene tijekom 24 sata jer u protivnom prijeti opasnost od dobivanja pogrešnog rezultata analize.

3.2.2 Određivanje koncentracije kortizola u uzorku 24h mokraće

Uzorci 24h mokraće analizirani su elektrokemiluminiscentnim imunotestom "ECLIA" za kvantitativno određivanje kortizola u mokraći. Korištene metode su „Elecsys Cortisol“ na automatskom analizatoru Cobas 6000 integriranim s modulom za imunoanalize Cobas e601(Roche Diagnostics) i „Elecsys Cortisol III“ na automatskom analizatoru Cobas 8000 integriranim s modulom za imunoanalize Cobas e801 (Roche Diagnostics) (slika 7.).



Slika 7. Cobas 8000 u centralnom laboratoriju KBC-a Split na lokalitetu Firule

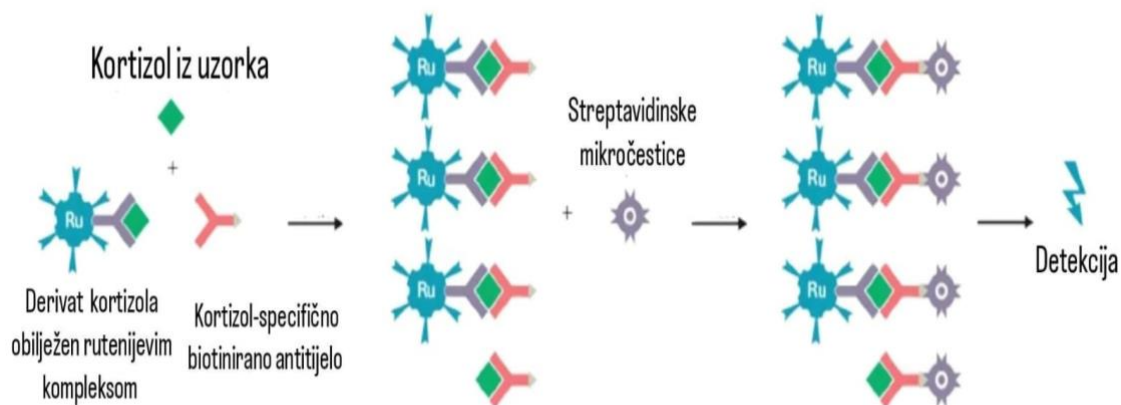
(Izvor: osobna galerija)

Najveća razlika između ovih metoda je u samoj pripremi uzorka za analizu. Dok je metodi treće generacije dovoljno samo izmjeriti volumen i alikvotirati uzorak 24h mokraće, kod metode prve generacije priprema je složenija jer zahtjeva ekstrakciju uzorka. Potrebno je 7 minuta inkubirati 600 μ L uzorka s 3 mL diklormetana, centrifugirati 5 minuta na 2500g, odbaciti vodenu fazu, prenijeti 1.5 mL u čistu staklenu epruvetu, sušiti i na posljetku razrijediti s 300 μ L diluenta te inkubirati 30 minuta na 25 °C uz povremeno miješanje u Vortexu.

Obje metode koriste princip kompetitivnog testa korištenjem antitijela koje je specifično usmjereno protiv kortizola, razlika je u tome što se u metodi prve generacije koristi poliklonsko antitijelo te je potrebno 20 μL uzorka, a u metodi treće generacije koristi se monoklonsko antitijelo i potrebno je 6 μL uzorka.

Endogeni kortizol u uzorku oslobađa se od veznog proteina danazolom te se natječe s egzogenim derivatom kortizola koji je obilježen rutenijevim kompleksom za vezna mjesta na kortizol-specifičnom biotiniranom antitijelu.

Uzorak se inkubira s kortizol-specifičnim biotiniranim antitijelom i derivatom kortizola označenim rutenijevim kompleksom. Ovisno o koncentraciji analita u uzorku i formiranju odgovarajućeg imunokompleksa, označeno vezno mjesto antitijela dijelom je zauzeto uzorkom analita, a dijelom s ruteniliranim haptenom. Nakon dodavanja mikročestica obloženih streptavidinom, kompleks se čvrsto veže interakcijom biotina i streptavidina (slika 8.).



Slika 8. Shematski prikaz mjernog principa ECLIA

(Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-ECLIA-measuring-principle-Pre-treated-samples-are_fig1_260949250 - prevedeno)

Reakcijska smjesa se usisava u mjernu ćeliju gdje se mikročestice magnetski hvataju na površinu elektroda. Nevezane tvari se zatim uklanjaju s ProCell M reagensom. Primjena napona na elektrodu zatim inducira kemiluminiscentnu emisiju koja se mjeri fotomultiplikatorom. Rezultati se određuju putem kalibracijske krivulje koja je posebno generirana kalibracijom u 2 točke i priloženom glavnom krivuljom. Analizator automatski izračunava koncentraciju analita za svaki uzorak u nmol/L.

Ručni izračun slobodnog kortizola u mokraći daje podatak o izlučivanju kortizola tijekom 24 sata. Potrebno je pomnožiti rezultate analizatora s volumenom 24h mokreće. Vrijednosti utvrđene studijama s Elecsys Cortisol analizom koja obuhvaća uzorke mokraće 88 zdravih osoba, odnosno referentne vrijednosti iznose 100-379 nmol/24 h (16).

3.2.3 Statistička obrada

Rezultati istraživanja analizirani su u statističkom softveru MedCalc koristeći Kolmogorov–Smirnov test (K–S test) koji se koristi za provjeru slijede li dva različita uzorka istu raspodjelu odnosno služi za testiranje normalnosti podataka, te Passing-Bablok regresiju koja se odnosi na postupak usporedbe dviju varijabli, kada nije poznato koja je varijabla nezavisna. Kao rezultat izračunava se jednadžba pravca.

4. REZULTATI

4.1 ELEKTROKEMILUMINISCENTNI IMUNOTEST (ECLIA)

Tablica 1. Rezultati analiza koncentracije kortizola u uzorcima 24h mokraće

| UZORAK | DOB | SPOL | METODA 1 (nmol/L) | METODA 2 (nmol/L) |
|--------|-----|------|-------------------|-------------------|
| 1 | 60 | Ž | 72 | 35 |
| 2 | 74 | Ž | 157 | 86 |
| 3 | 54 | Ž | 54 | 37 |
| 4 | 56 | Ž | 118 | 71 |
| 5 | 41 | Ž | 79 | 32 |
| 6 | 72 | Ž | 49 | 29 |
| 7 | 59 | Ž | 156 | 59 |
| 8 | 71 | Ž | 159 | 94 |
| 9 | 70 | Ž | 164 | 83 |
| 10 | 40 | Ž | 155 | 63 |
| 11 | 36 | Ž | 137 | 99 |
| 12 | 69 | Ž | 88 | 51 |
| 13 | 77 | Ž | 235 | 71 |
| 14 | 76 | Ž | 453 | 240 |
| 15 | 79 | Ž | 252 | 145 |
| 16 | 66 | Ž | 68 | 29 |
| 17 | 27 | M | 213 | 75 |
| 18 | 77 | M | 134 | 52 |
| 19 | 49 | M | 127 | 56 |
| 20 | 66 | M | 300 | 246 |
| 21 | 61 | Ž | 60 | 24 |
| 22 | 83 | Ž | 52 | 15 |
| 23 | 36 | Ž | 105 | 50 |
| 24 | 75 | Ž | 32 | 19 |
| 25 | 42 | Ž | 56 | 30 |
| 26 | 25 | M | 235 | 171 |
| 27 | 32 | M | 33 | 22 |
| 28 | 32 | Ž | 99 | 45 |
| 29 | 64 | Ž | 73 | 26 |
| 30 | 62 | Ž | 95 | 51 |
| 31 | 26 | M | 89 | 36 |
| 32 | 48 | Ž | 34 | 12 |
| 33 | 36 | M | 176 | 65 |
| 34 | 41 | M | 210 | 113 |
| 35 | 66 | Ž | 61 | 26 |
| 36 | 78 | Ž | 108 | 43 |
| 37 | 36 | Ž | 93 | 34 |
| 38 | 68 | Ž | 46 | 17.5 |
| 39 | 29 | M | 141.4 | 25 |
| 40 | 71 | Ž | 50 | 25 |

4.2 KOLMOGOROV-SMIRNOV TEST

Tablica 2. Opisna statistika dobivenih koncentracija kortizola metodom 1

| | |
|--|--|
| Veličina uzorka | 40 |
| Najniža vrijednost | <u>32.0000</u> |
| Najviša vrijednost | <u>453.0000</u> |
| Aritmetička sredina | 125.4500 |
| 95% CI za aritmetičku sredinu | 98.0858 - 152.8142 |
| Medijan | 102.0000 |
| 95% CI za medijan | 75.0333 - 139.6445 |
| Varijacija | 7320.9205 |
| Standardna devijacija | 85.5624 |
| Relativna standardna devijacija | 0.6820 (68.20%) |
| Standardna pogreška srednje vrijednosti | 13.5286 |
| Koeficijent asimetrije | 1.7465 (P=0.0001) |
| Koeficijent zaobljenosti | 4.3349 (P=0.0021) |
| Kolmogorov-Smirnov test ^a za normalnu distribuciju | D=0.1374 prihvatiti normalnost (P=0.0553) |

^a Lillieforsova značajna korekcija

(Izvor: MedCalc® Statistical Software version 22.023 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2024))

Tablica 3. Percentili za rezultate metode 1

| Percentili | | 95% interval pouzdanosti |
|------------|----------|--------------------------|
| 2.5 | 32.5000 | |
| 5 | 33.5000 | |
| 10 | 47.5000 | 32.2524 - 55.0700 |
| 25 | 60.5000 | 49.4209 - 88.0625 |
| 75 | 158.0000 | 133.5624 - 225.7394 |
| 90 | 235.0000 | 169.5801 - 414.3763 |
| 95 | 276.0000 | |
| 97.5 | 376.5000 | |

(Izvor: MedCalc® Statistical Software version 22.023 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2024))

Tablica 4. Opisna statistika dobivenih koncentracija kortizola metodom 2

| | |
|--|--|
| Veličina uzorka | 40 |
| Najniža vrijednost | <u>12.0000</u> |
| Najviša vrijednost | <u>246.0000</u> |
| Aritmetička sredina | 63.5500 |
| 95% CI za aritmetičku sredinu | 46.2464 - 80.8536 |
| Medijan | 50.5000 |
| 95% CI za medijan | 34.3389 - 63.6611 |
| Varijacija | 2927.3308 |
| Standardna devijacija | 54.1048 |
| Relativna standardna devijacija | 0.8514 (85.14%) |
| Standardna pogreška srednje vrijednosti | 8.5547 |
| Koeficijent asimetrije | 2.1417 (P<0.0001) |
| Koeficijent zaobljenosti | 4.7963 (P=0.0013) |
| Kolmogorov-Smirnov test ^a za normalnu distribuciju | D=0.1952 odbiti normalnost (P=0.0005) |

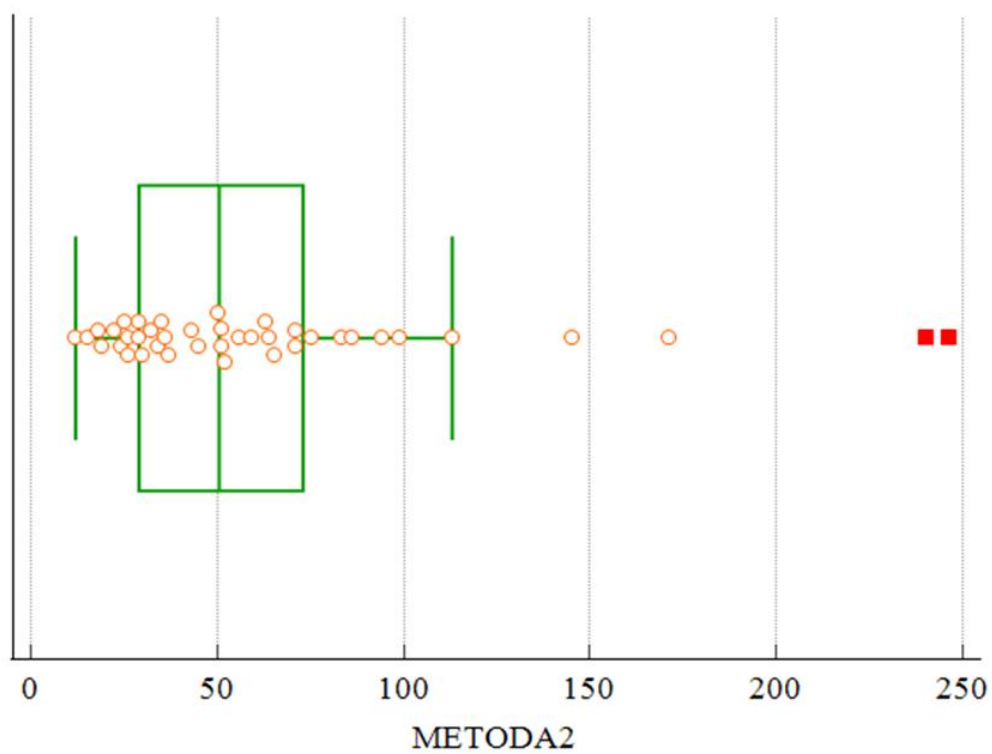
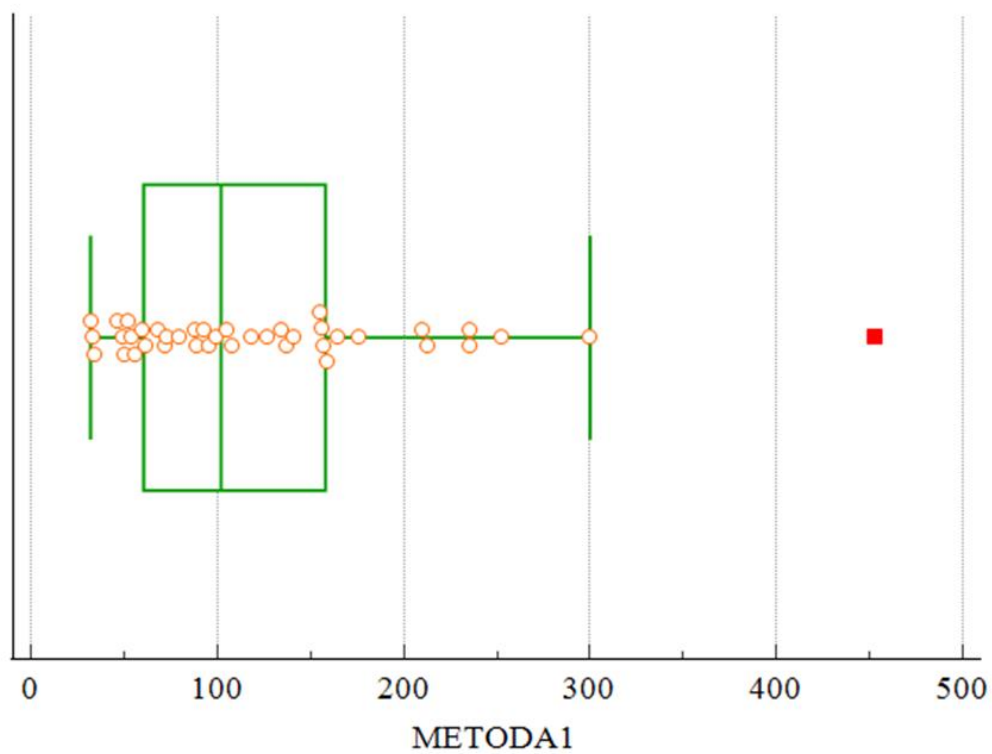
^a Lillieforsova značajna korekcija

(Izvor: MedCalc® Statistical Software version 22.023 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2024))

Tablica 5. Percentili za rezultate metode 2

| Percentili | | 95% interval pouzdanosti |
|------------|----------|--------------------------|
| 2.5 | 13.5000 | |
| 5 | 16.5000 | |
| 10 | 20.5000 | 12.7573 - 26.0000 |
| 25 | 29.0000 | 22.8419 - 36.0625 |
| 75 | 73.0000 | 58.8125 - 107.1069 |
| 90 | 129.0000 | 84.3950 - 244.4853 |
| 95 | 205.5000 | |
| 97.5 | 243.0000 | |

(Izvor: MedCalc® Statistical Software version 22.023 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2024))



Slika 9. Box-and-Whisker graf za rezultate obe metode

(Izvor: MedCalc® Statistical Software version 22.023 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2024))

4.3 PASSING-BABLOK REGRESIJA

Tablica 6. Izračun za Passing-Bablokovu regresijsku analizu

| | |
|-------------|----------|
| Varijabla X | METODA 2 |
| Varijabla Y | METODA 1 |

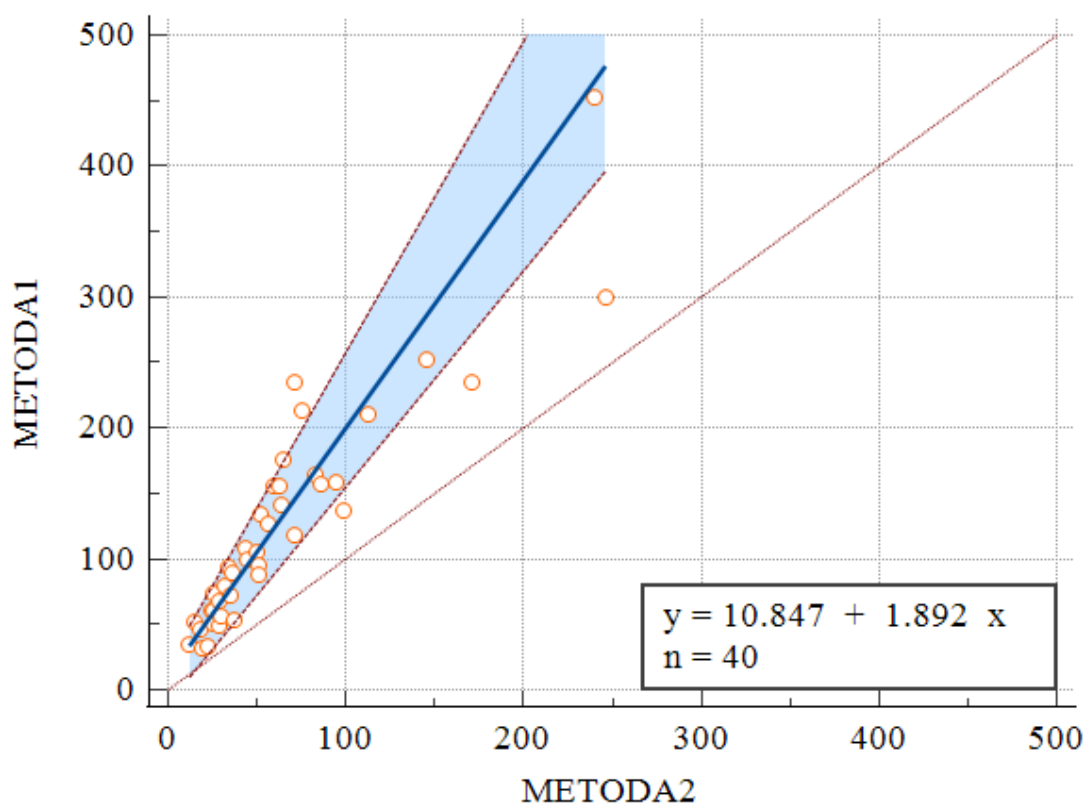
| | |
|-----------------|----|
| Veličina uzorka | 40 |
|-----------------|----|

| | Varijabla X | Varijabla Y |
|-----------------------------|-------------|-------------|
| Najniža vrijednost | 12.0000 | 32.0000 |
| Najviša vrijednost | 246.0000 | 453.0000 |
| Aritmetička sredina | 63.5500 | 125.4500 |
| Medijan | 50.5000 | 102.0000 |
| Standardna devijacija | 54.1048 | 85.5624 |
| Srednja standardna pogreška | 8.5547 | 13.5286 |

| | |
|--|---|
| $y = 10.846555 + 1.892047 x$ | |
| Sustavne razlike | |
| Odsječak A | 10.8466 |
| 95% CI | -10.1875 - 20.2442 |
| Proporcionalne razlike | |
| Nagib B | 1.8920 |
| 95% CI | 1.6512 - 2.3750 |
| Nasumične razlike | |
| Rezidualna standardna devijacija (RSD) | 19.6979 |
| ± 1.96 RSD Interval | -38.6080 to 38.6080 |
| Valjanost linearnog modela | |
| Cusumov test za linearnost | Nema značajnog odstupanja od linearnosti (P=0.30) |

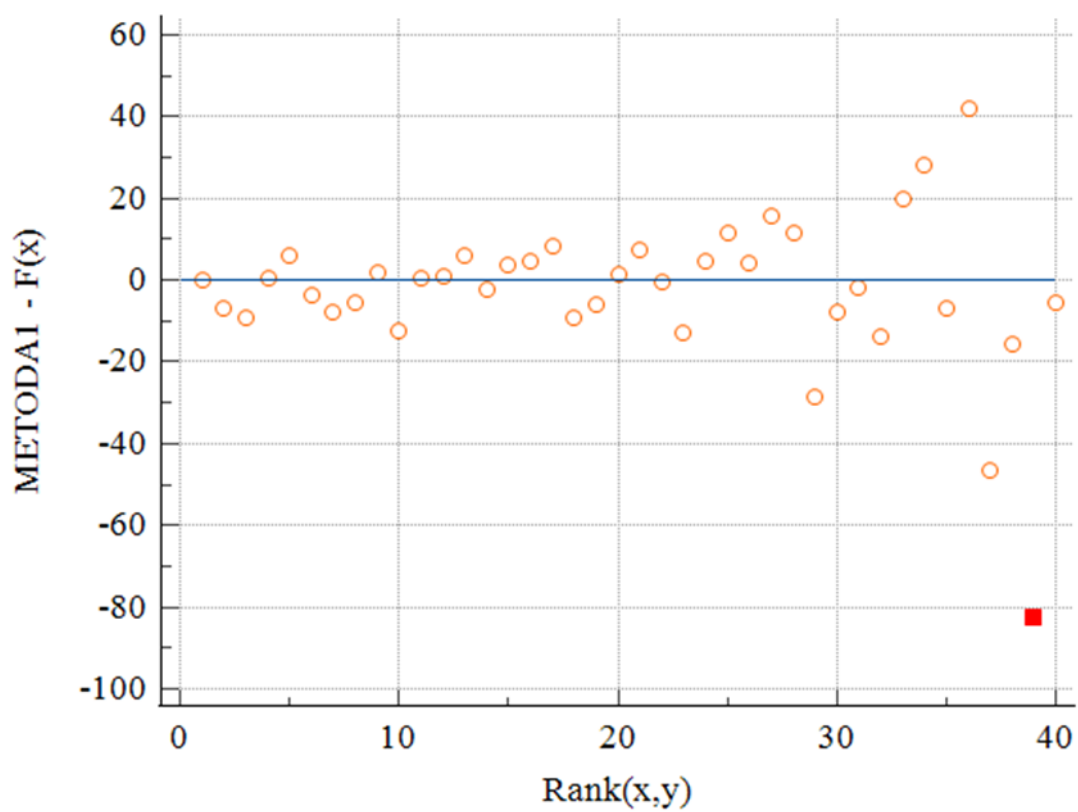
| | |
|--|----------------|
| Spearmanov korelacijski koeficijent | |
| Koeficijent korelacije | 0.947 |
| Razina signifikantnosti | P<0.0001 |
| 95% CI | 0.901 to 0.972 |

(Izvor: MedCalc® Statistical Software version 22.023 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2024))



Slika 10. Grafički prikaz Passing-Bablokove regresije

(Izvor: MedCalc® Statistical Software version 22.023 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2024))



Slika 11. Prikaz odstupanja izmjerenih rezultata od rezultata izračunatih iz regresijske jednadžbe

(Izvor: MedCalc® Statistical Software version 22.023 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2024))

5. RASPRAVA

U ovom istraživanju ispitana je distribucija dobivenih podataka i uspoređivala su se dvije ECLIA metode za određivanje koncentracije kortizola u uzorcima 24h mokraće. Obje metode su razvijene i proizvedene od strane Roche Diagnostics. Analiza je provedena pomoću Kolmogorov-Smirnov testa kako bi se utvrdilo je li distribucija podataka normalna i Passing-Bablok regresije kako bi se ocijenilo sistemske i proporcionalne razlike između dviju metoda.

Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa za metodu koja zahtjeva ekstrakciju uzorka (metoda 1) ukazuju da uzorak podataka nema značajno odstupanje od normalne distribucije, budući da je P-vrijednost (0.0553) nešto veća od uobičajene granice značajnosti od 0.05. Stoga, na razini značajnosti od 0.05, prihvatljiva je hipoteza da podaci dolaze iz normalne distribucije. Relativna standardna devijacija od 68.20% ukazuje na značajnu disperziju podataka u odnosu na srednju vrijednost. Koeficijent asimetrije od 1.7465 ($P=0.0001$) i koeficijent zaobljenosti od 4.3349 ($P=0.0021$) sugeriraju pozitivnu asimetriju i visoku zaobljenost distribucije, što ukazuje na prisutnost izuzetaka i odstupanje od savršene normalnosti.

Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa za metodu koja ne zahtjeva ekstrakciju uzorka (metoda 2) ukazuju da uzorak podataka značajno odstupa od normalne distribucije, budući da je P-vrijednost (0.0005) manja od uobičajene granice značajnosti od 0.05. Stoga, na razini značajnosti od 0.05, hipoteza da podaci dolaze iz normalne distribucije nije prihvatljiva. Relativna standardna devijacija od 85.14% ukazuje na značajnu disperziju podataka u odnosu na srednju vrijednost. Koeficijent asimetrije od 2.1417 ($P<0.0001$) i koeficijent zaobljenosti od 4.7963 ($P=0.0013$) sugeriraju pozitivnu asimetriju i visoku zaobljenost distribucije, što ukazuje na prisutnost izuzetaka i značajno odstupanje od savršene normalnosti.

Regressijska jednadžba je $y = 10.846555 + 1.892047 \cdot x$. Odsječak (A) iznosi 10.8466, s 95% intervalom povjerenja od -10.1875 do 20.2442. Ovaj interval uključuje nulu, što sugerira da nema značajnog sistemskog odstupanja između metoda pri nižim vrijednostima mjerenja. Nagib (B) iznosi 1.8920, s 95% intervalom povjerenja od 1.6512 do 2.3750. Ovaj interval ne uključuje 1, što ukazuje na značajnu proporcionalnu razliku između metoda. Metoda koja uključuje ekstrakciju uzorka pokazuje dosljedno veće vrijednosti u usporedbi s metodom bez ekstrakcije. Rezidualna standardna devijacija (RSD) iznosi 19.6979, s ± 1.96 RSD intervalom od -38.6080 do 38.6080. Ova mjera pokazuje varijabilnost ostataka i ukazuje na nasumične pogreške prisutne u mjerenjima. Cusum test za linearnost nije pokazao značajno odstupanje od linearnosti ($P=0.30$), što potvrđuje da je linearni model prikladan. Spearmanov korelacijski koeficijent iznosi 0.947, s razinom značajnosti $P<0.0001$ i 95% intervalom povjerenja od 0.901 do 0.972. Ova visoka vrijednost korelacijskog koeficijenta ukazuje na jaku pozitivnu korelaciju između dviju metoda, što znači da promjene u jednoj metodi prate promjene u drugoj metodi.

Analiza Passing-Bablok regresije pokazala je da između dviju ECLIA metoda za mjerenje koncentracije kortizola u uzorcima 24h mokraće postoji značajna proporcionalna razlika, dok sistemska razlika nije značajna. Visoka korelacija između metoda ukazuje na njihovu konzistentnost, unatoč proporcionalnim razlikama.

U drugim istraživanjima koja su koristila Passing-Bablokovu regresiju za usporedbu metoda za određivanje kortizola u uzorku 24h mokraće rezultati pokazuju:

- jaku pozitivnu korelaciju između Elecsys Cortisol testa i komercijalno dostupnog testa za kortizol, s time da Elecsys test daje 1.32 puta više rezultate;

- vrlo jaku pozitivnu korelaciju između Elecsys Cortisol III testa i analitičke tehnike koja kombinira razrjeđivanje izotopa s tekućinskom kromatografijom i masenom spektrometrijom (engl. Isotope Dilution Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, ID-LC/MS), ali Elecsys test daje 1.272 puta više rezultate.

6. ZAKLJUČAK

Metoda koja zahtjeva ekstrakciju mokraće pokazuje značajno veće vrijednosti što ukazuje na potrebu za pažljivim razmatranjem kalibracija i specifičnosti svake metode pri interpretaciji rezultata koncentracija kortizola. Također ova metoda pokazuje distribuciju koja se može smatrati približno normalnom, dok druga metoda pokazuje značajnu pozitivnu asimetriju i odstupanje od normalne distribucije. Unatoč proporcionalnim razlikama, visoka korelacija između metoda (Spearmanov koeficijent 0.947) ukazuje na konzistentnost mjerenja između dvije metode.

Ovi rezultati naglašavaju važnost razumijevanja specifičnosti različitih analitičkih metoda pri interpretaciji kliničkih rezultata. Daljnja istraživanja mogla bi se fokusirati na ispitivanje razloga za proporcionalne razlike i utvrđivanje koji faktori doprinose različitim očitanjima.

7. LITERATURA

1. Bajek S., Bobinac D., Jerković R., Malnar D., Marić I. Sustavna anatomija čovjeka. Rijeka: Medicinski fakultet u Rijeci 2007.
2. Fung MM, Viveros OH, O'Connor DT. Diseases of the adrenal medulla. *Acta Physiol (Oxf)*. veljača 2008.;192(2):325–35.
3. Čvorišćec D, Čepelak I. Ur. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb: Medicinska naklada, 2009.
4. Dominguez A, Muppidi V, Leslie SW, Gupta S. Hyperaldosteronism. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citirano 16. svibanj 2024.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499983/>
5. Cobb A, Aeddula NR. Primary Hyperaldosteronism. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citirano 28. svibanj 2024.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539779/>
6. Chaudhry HS, Singh G. Cushing Syndrome. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citirano 16. svibanj 2024.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470218/>
7. Sharma ST, Nieman LK, Feelders RA. Cushing's syndrome: epidemiology and developments in disease management. *Clin Epidemiol*. 17. travanj 2015.;7:281–93.
8. Huecker MR, Bhutta BS, Dominique E. Adrenal Insufficiency. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citirano 30. svibanj 2024.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441832/>
9. Rathbun KM, Singhal M. Addisonian Crisis. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citirano 30. svibanj 2024.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441933/>
10. Rajkumar V, Waseem M. Hypoaldosteronism. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citirano 22. svibanj 2024.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555992/>

11. Turan I, Kotan LD, Tastan M, Gurbuz F, Topaloglu AK, Yuksel B. Molecular genetic studies in a case series of isolated hypoaldosteronism due to biosynthesis defects or aldosterone resistance. *Clin Endocrinol (Oxf)*. lipanj 2018.;88(6):799–805.
12. Munir S, Quintanilla Rodriguez BS, Waseem M, Haddad LM. Addison Disease (Nursing). U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citirano 22. svibanj 2024.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK568775/>
13. Dittmar M, Kahaly GJ. Polyglandular Autoimmune Syndromes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 01. srpanj 2003.;88(7):2983–92.
14. Mohd Azmi NAS, Juliana N, Azmani S, Mohd Effendy N, Abu IF, Mohd Fahmi Teng NI, i ostali. Cortisol on Circadian Rhythm and Its Effect on Cardiovascular System. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. siječanj 2021.;18(2):676.
15. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA: Harperova ilustrirana biokemija, 28. izdanje, Lange Medical Books / McGrawHill, 2009. (hrvatski prijevod, 2011.).
16. Method Sheet Cobas: Elecsys Cortisol. Roche Diagnostics; 2024.
17. El-Farhan N, Rees DA, Evans C. Measuring cortisol in serum, urine and saliva. *Ann Clin Biochem*. 01. svibanj 2017.;54(3):308–22.
18. Flowers K, Shipman K. Pitfalls in the Diagnosis and Management of Hypercortisolism (Cushing Syndrome) in Humans; A Review of the Laboratory Medicine Perspective. *Diagnostics*. 14. travanj 2023.;13:1415.
19. Išgum-Vorgić L. Medicinska biokemija, treće izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 2006.

8. ŽIVOTOPIS

OSNOVNI PODACI:

Ime i prezime: Magdalena Baras

Datum rođenja: 31.10.2002.

Mjesto rođenja: Split, RH

OBRAZOVANJE:

2009. – 2017.: Osnovna škola Bijaći, Kaštel Novi

2017. – 2021.: Zdravstvena škola Split

2021. – 2024.: Sveučilišni odjel zdravstvenih studija Split, MLD