



Aktualne poglądy na diagnostykę zespołu Cushinga

Monika Karczewska-Kupczewska, Janusz Myśliwiec, Maria Górka

Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Wewnętrznych, Akademia Medyczna, Białystok

Patogeneza zespołu Cushinga

Utrzymujący się nadmiar glikokortykosteroidów (GKS, *glucocorticosteroids*), niezależnie od przyczyny, prowadzi do ujawnienia objawów określanych jako zespół Cushinga (ZC). Najczęściej zespół ten ma podłoże jatrogenne i wynika z długotrwałej terapii GKS. Endogenny (niejatrogeny) ZC jest skutkiem zwiększonego wytwarzania kortyzolu przez nadnercza (tab. I). Endogenny ZC najczęściej zależy od kortykotropiny (ACTH, *adrenocorticotrophic hormone*). Rozwija się on zazwyczaj w wyniku nadmiernej produkcji ACTH przez gruczolaki przysadki (choroba Cushinga [CC]). Aktualnie przeważa opinia, że gruczolaki przysadki powstają *de novo*. Jednak należy wziąć pod uwagę także możliwy wpływ podwzgórze i wyższych ośrodków nerwowych na nadmierną stymulację komórek kortykotropowych, za pośrednictwem kortykoliberyny (CRH, *corticotropin releasing hormone*). Ocenia się, że CC stanowi około 70% endogennego ZC [1]. Pozaprzysadkowe guzy, na przykład drobnokomórkowy rak płuca, mogą także wydzie-

lać ACTH (ZC związany z ektopowym wydzielaniem ACTH [EZC-ACTH]). Rzadko ACTH-zależny ZC jest wywołany przez guzy wydzielające CRH (EZC-CRH). Przewlekła nadmierna sekrecja ACTH w tych przypadkach prowadzi do prostego lub guzkowego przerostu warstwy pasmowej kory nadnerczy i, co za tym idzie, do zwiększonego wydzielania kortyzolu przez korę nadnerczy [1–4]. Z mniejszą częstością występuje ACTH-niezależny ZC. Najczęściej jest on wynikiem nadmiernej produkcji kortyzolu przez guzy kory nadnerczy: gruczolaki (10–15% endogennego ZC) i raki (< 5%) [1]. Mnogie gruczolaki kory nadnerczy są znacznie rzadsze niż pojedyncze i zazwyczaj występują obustronnie. Bardzo rzadką przyczyną pierwotnego ZC jest pierwotny pigmentowany drobnoguzkowy przerost kory nadnerczy (PPNAD, *primary pigmented nodular adrenocortical disease*), inaczej „mikroguzkowa dysplazja nadnerczy”. Jest to choroba występująca sporadycznie lub rodzinnie. Postać rodzinna jest skojarzona z innymi rzadko spotykanymi zaburzeniami, takimi jak: śluzaki (serca, skóry, sutka), nerwiaki, punktowa pigmentacja skóry i guzy gruczolów wydzielania wewnętrznego (zespół Carneya). Choroba ta wiąże się z nieznanym genem na chromosomie 2 lub z mutacją genu kodującego podjednostkę regulacyjną typu 1 α kinazy białkowej A zlokalizowanego na chromosomie 17. U pacjentów z tym zaburzeniem nadnercza nie są powiększone, a bywają zmniejszone i charakteryzują się obecnością licznych czarnych lub brązowych guzków o średnicy 2–4 mm, otoczonych atroficzną korą [2, 4, 5–8]. Niezależne od ACTH wydzielanie kortyzolu występuje także w niezwykle rzadko spotykanym zespole McCune’a i Albrighta. W przypadku tego zespołu w trakcie wczesnej embriogenezy dochodzi do powstania aktywnej mutacji genu kodującego podjednostkę α białka G. Prowadzi to do uformowania guzków, w których następuje aktywacja cykazy adenylowej i uruchomienie kaskady steroidogenezy z następczą supresją ACTH [9, 10]. Rzadką przyczyną ACTH-niezależnego ZC jest obustronny wielkoguzkowy (makroguzkowy) przerost nadnerczy (AIMAH, *ACTH independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia*). W przypadku tego schorzenia nadnercza czasami są powiększone, nawet znacznie,

Tabela I

Przyczyny endogennego zespołu Cushinga (na podstawie [1])

Table I

Etiology of endogenous Cushing's syndrome (based on [1])

ACTH-zależny (80–85%):

- zespół Cushinga zależny od przysadki (choroba Cushinga)
- zespół ektopowego wydzielania ACTH
- zespół ektopowego wydzielania CRH
- obustronny wielkoguzkowy przerost kory nadnerczy (związany z długotrwałą stymulacją ACTH)

ACTH-niezależny (15–20%):

- gruczolak(i) nadnercza(y)
- rak nadnercza
- obustronny wielkoguzkowy przerost kory nadnerczy (związany z ektopią receptorów)
- pierwotny pigmentowany drobnoguzkowy przerost kory nadnerczy (rodzinny — zespół Carneya i sporadyczny)
- zespół McCune’a i Albrighta

ACTH (*adrenocorticotrophic hormone*) — kortykotropina; CRH (*corticotropin releasing hormone*) — kortykoliberyna

i obecne są guzki o średnicy większej niż 5 mm. W przeglądzie Liebermana z 1994 roku zidentyfikowano tylko 24 przypadki tego zespołu, jednak od tamtego czasu zarejestrowano jeszcze inne [11–15]. Większość przypadków wielkoguzkowego przerostu nadnerczy występowała spontanicznie, ale wykazano również kilka przypadków postaci rodzinnych [16–19]. Klinicznie zespół ten ujawnia się w 5. lub 6. dekadzie życia. W tkankach pacjenta z wielkoguzkowym przerostem nadnerczy wykryto aktywną mutację R201S genu dla podjednostki α białka G bez innych cech zespołu McCune'a i Albrighta [20].

W ostatnich latach wykazano, że guzy nadnerczy oraz wielkoguzkowy obustronny przerost nadnerczy, będące przyczyną hiperkortyzolemii, mogą być uwarunkowane obecnością ektopowych receptorów błonowych. To „autonomiczne zachowanie” guzów i przerośniętych nadnerczy może być uwarunkowane ich stymulacją przez inne niż ACTH, niespecyficzne dla tego gruczolu, hormony (np. lutropinę [LH, *luteotrophic hormone*], folitropinę [FSH, *follicle-stimulating hormone*], tyreotropinę (TSH, *thyroid stimulating hormone*) [TRH], katecholaminy, żołądkowy peptyd hamujący [GIP, *gastric inhibitory peptide*]), neuropeptydy czy cytokiny [21]. Hammet i wsp. [22] jako pierwszy zidentyfikował ZC zależny od GIP u 41-letniego mężczyzny z jednostronnym gruczolakiem nadnercza dzięki spostrzeżeniu zależności między posiłkami a zwiększonym stężeniem kortyzolu w surowicy. Ten znaczny poposiłkowy wzrost kortyzolemii nie był hamowany przez deksametazon (DXM, *dexametazon*). Wykazano również zależną od posiłku produkcję kortyzolu u pacjentów z obustronnym wielkoguzkowym przerostem nadnerczy [23, 24]. Zaobserwowano, że somatostatyna hamuje wzrost stężenia kortyzolu, indukowany doustnym podaniem glukozy [24]. Odkryto także receptory dla GIP w tkance przerośniętych nadnerczy poprzez zastosowanie GIP znakowanego ¹²⁵I [23]. Innym czynnikiem stymulującym wydzielanie kortyzolu jest wazopresyna (AVP, *arginine vasopresin*). Od dawna wiadomo, że pobudza ona produkcję ACTH poprzez receptor V3 (V1b) występujący w komórkach kortykotropowych przysadki. W ostatnich latach odkryto, że AVP także bezpośrednio stymuluje steroidogenezę poprzez receptor V1 obecny w korze nadnerczy. Zaobserwowano także, że u ludzi z ACTH-niezależnym ZC w przebiegu gruczolaka, raka nadnerczy oraz obustronnego wielkoguzowego przerostu nadnerczy występuje nieprawidłowa, nadmierna stymulacja sekrecji kortyzolu po podaniu egzogennej AVP. Nie potwierdzono, czy zjawisko to wiąże się z nieprawidłową funkcją występujących w korze nadnerczy receptorów V1, V2 czy też z występowaniem innych receptorów dla AVP, na przykład V3, których obecności nie stwierdzono w prawidłowej korze

nadnerczy [21]. Rzadką przyczyną ACTH-niezależnego ZC mogą być guzy jajnika ektopowo wydzielające kortyzol [25]. Natomiast kliniczne cechy ZC u pacjentów z niskim stężeniem kortyzolu i ACTH nieprzyjmujących egzogennych GKS próbowano tłumaczyć teorią nadwrażliwości na kortyzol, spowodowanej zwiększeniem liczby receptorów dla GKS [26].

Należy także pamiętać o stanach czynnościowej hiperkortyzolemii z towarzyszącymi czasami cechami klinicznymi ZC określanymi mianem „pseudozespołu Cushinga” (rzekomego ZC). Należą do nich: otyłość, depresja, zaburzenia lękowe, alkoholizm, jądłowstręt psychiczny, bulimia, źle wyrównana metabolicznie cukrzyca, każda ostro przebiegająca choroba, a także choroby przewlekłe. Hiperkortyzolemię w rzekomym ZC tłumaczy się nadmiernym pobudzeniem komórek podwzgórza wydzielających CRH [27].

Obraz kliniczny zespołu Cushinga

Zazwyczaj pełnoobjawowy ZC nie stwarza trudności diagnostycznych (tab. II). Występuje on jednak w przypadku długotrwałego wpływu GKS na organizm.

Tabela II

Kliniczne objawy zespołu Cushinga (na podstawie [1, 2])

Table II

Clinical symptoms of Cushing's syndrome (based on [1, 2])

1. Zwiększenie masy ciała z charakterystycznym centralnym rozkładem tkanki tłuszczowej: na twarzy („księżyc w pełni”), tułowi — w szczególności w okolicy karku („kark bawoli”) i brzucha
2. Zaniki mięśni proksymalnych kończyn dolnych i obręczy barkowej (szczupłość kończyn)
3. Zmiany skórne: scieńczenie skóry, rumień twarzy (*plethora*), żywoczerwone rozstępy, nadmierna pigmentacja, trądzik, hirsutyzm, wybroczyny, wylewy podskórne, obrzęki
4. Łatwe męczenie się
5. Podwyższone ciśnienie tętnicze, ból głowy
6. Zaburzenia psychiczne: depresja lub psychozy, senność, chwiejność emocjonalna
7. Bóle kostne, patologiczne złamania
8. Wielomocz, nadmierne pragnienie
9. Nawracające infekcje
10. Zaburzenia miesiączkowania, osłabienie lub zanik popędu płciowego, impotencja
11. Zaburzenia widzenia
12. Zgaga, ból brzucha
13. U dzieci: opóźnienie lub zahamowanie wzrostu, wczesne pojawienie się owłosienia płciowego, androgenizacja w formie przerostu lechtaczki, makrogenitosomii bez powiększenia objętości jąder, opóźnienie rozwoju gruczolów piersiowych, opóźnianie *menarche*

Znacznie trudniej rozpoznać jest subkliniczny ZC. Utrzymująca się hiperkortyzolemia bezpośrednio lub pośrednio sprzyja rozwojowi zaburzeń typowych dla zespołu metabolicznego, co zwiększa ryzyko chorób układu sercowo-naczyniowego [28]. Wykrycie łagodnej hiperkortyzolemii w okresie poprzedzającym pełnoobjawowy ZC może więc zapobiec rozwojowi niebezpiecznych powikłań. Dlatego też ZC należy podejrzewać, gdy występują tylko niektóre, nawet nieswoiste objawy kliniczne, takie jak: nadciśnienie tętnicze, upośledzona tolerancja glukozy, zwiększenie masy trzewnej tkanki tłuszczowej, szczególnie u osób młodych, opornych na stosowane leczenie [29–31]. Silniej na ZC wskazują następujące objawy: żywoczerwone rozstępy, zaniki mięśniowe, łatwe siniaczenie, zaczerwienienie skóry twarzy (*plethora*) oraz hirsutyzm. Ross [32] wykazał, że są to objawy bardzo pomocne w różnicowaniu nadczynności kory nadnerczy z otyłością prostą, cechujące się wysokim „wskaźnikiem różnicowania” (tab. III). Do najbardziej charakterystycznych objawów klinicznych ZC według Rossa należą zaniki mięśni proksymalnych kończyn dolnych i obręczy barkowej oraz nadmierna skłonność do siniaczenia i wylewów podskórnych w wyniku niewielkiego urazu lub nawet samoistnie. Typowe, patognomiczne rozstępy skórne są czerwone lub nawet purpurowe, zagłębione poniżej powierzchni skóry w następstwie zaniku leżącej pod nimi tkanki łącznej, o szerokości większej niż 1 cm. Najczęściej występują na powłokach brzusznych, ale mogą również być zlokalizowane na piersiach, biodrach, pośladkach, udach i w okolicy pachowej [2, 33]. Rozstępy mogą nie występować u osób po 40. roku

życia [2]. Natomiast *plethora* występująca w ZC jest wynikiem sścieńczenia skóry, a nie policytemii [34].

Niestety, najbardziej typowe objawy są rzadko spotykane w przypadku łagodnej hiperkortyzolemii. Należy także pamiętać, że wystąpienie typowych objawów ZC może nie być obecne mimo znacznej hiperkortyzolemii. Taka sytuacja ma miejsce w przypadku nagłego pojawienia się hiperkortyzolemii, na przykład u pacjentów z rakiem drobnokomórkowym płuc wydzielającym ACTH. Przy takim rozpoznaniu pełnoobjawowy ZC zwykle nie rozwija się ze względu na brak łaknienia oraz inne objawy towarzyszące postępującej chorobie nowotworowej [2].

Już na wstępnym etapie diagnostyki pewne objawy kliniczne mogą sugerować przyczynę hiperkortyzolemii. Gruczolaki nadnerczy powodujące ZC zazwyczaj objawiają się wyłącznie poprzez kliniczne cechy nadmiaru kortyzolu, ze względu na to, że wywodzą się zwykle z komórek warstwy pasmowatej. Natomiast stwierdzenie hirsutyzmu, trądziku oraz braku miesiączki może sugerować rozpoznanie CC, na co wskazuje wzrost wydzielania androgenów nadnerczowych wspólny z nadmiarem ACTH i kortyzolu. Należy jednak pamiętać, że znacznie nasilone i szybko pogłębiające się objawy hiperkortyzolemii oraz wyraźne cechy nadmiaru androgenów, z wirylizacją włącznie, mogą być spowodowane rakiem nadnerczy [1, 2]. Nasilona pigmentacja skóry w ZC świadczy zazwyczaj o obecności makrogruczolaka przysadki lub pozanadnerczowego guza, zlokalizowanego ektopowo, które wydzielają duże ilości ACTH i/lub prekursorów ACTH.

Diagnostyka laboratoryjna zespołu Cushinga

Podstawowe badania biochemiczne

W wykryciu nieprawidłowości związanych z nadmiernym wpływem GKS na organizm bardzo pomocne są podstawowe badania laboratoryjne, w których można stwierdzić:

- podwyższone stężenie hemoglobiny, liczby erytrocytów, płytek krwi, leukocytozę obojętnochłonną z eozynopenią i obniżeniem liczby limfocytów;
- podwyższone stężenia cholesterolu i triglicerydów w surowicy;
- obniżone stężenie fosforanów w surowicy;
- hiperkalcurię (związaną ze wzmożoną resorpcją kostną), której jednak nie towarzyszy zazwyczaj hiperkalcemia;
- hiperglikemię na czczo, upośledzoną tolerancję glukozy w teście z doustnym obciążeniem glukozą lub jawną cukrzycę;
- alkalozę hipokaliemiczną.

Tabela III

Wskaźnik różnicujący obliczony na podstawie porównania częstości objawów zespołu Cushinga z częstością tych objawów w otyłości prostej (na podstawie [32])

Table III

Discriminant index estimated based on the prevalence of symptoms of Cushing syndrome compared with their prevalence in patients with simple obesity (based on [32])

Objawy	Wskaźnik różnicowania
Siniaczenie	10,3
Oslabienie mięśniowe	8,0
Nadciśnienie tętnicze	4,4
Rumień twarzy (<i>plethora</i>)	3,0
Hirsutyzm	2,8
Purpurowe rozstępy	2,5
Otyłość tułowia/uogólniona	1,6/0,8
Zaburzenia miesiączkowania	1,6

Ostatnie z tych zaburzeń występuje w przypadku znacznej hipersekcji kortyzolu. Nadmiar kortyzolu nie ulega przemianie do kortykosteronu pod wpływem 11β -dehydrogenazy hydroksysteroidowej typu 2 w nerkach i ze względu na duże powinowactwo do receptora mineralokortykoidowego wywiera silne działanie mineralokortykoidowe [35]. Zaburzenie to powinno nasuwać podejrzenie EJC-ACTH lub raka kory nadnerczy. W tych przypadkach zwiększone wydalanie mineralokortykoidów jest dodatkową przyczyną hipokaliemii [1].

Testy służące potwierdzeniu hiperkortyzolemii

Kliniczne podejrzenie ZC należy potwierdzić za pomocą badań biochemicznych. Na początku należy ustalić ewentualną obecność innych chorób, alkoholizmu, zaburzeń afektywnych oraz wpływ przyjmowanych leków, ponieważ czynniki te mogą utrudniać ocenę biochemiczną. Wybór określonych badań przesiewowych zależy najczęściej od sytuacji klinicznej oraz możliwości diagnostycznych danego ośrodka. Należy także podkreślić, że żadne z obecnie dostępnych badań nie ma dostatecznie dużej czułości i swoistości, by mogło stanowić uniwersalny test przesiewowy. Dlatego też ujemny wynik jednego z testów nie zwalnia z przeprowadzenia innych badań mających na celu wykrycie hiperkortyzolemii [31]. Z jednej strony, biochemiczne potwierdzenie ZC u części chorych może być utrudnione z uwagi na to, że często nadmierne wydzielanie kortyzolu ma charakter epizodyczny, zwłaszcza w przypadku guzów nadnerczy wydzielających kortyzol bądź guzów ektopowo wydzielających ACTH [36, 37]. Z drugiej strony, trudności w wykrywaniu hiperkortyzolemii, mogą wiązać się z cyklicznym wydzielaniem kortyzolu występującym w CC [38–42].

Oznaczanie wolnego kortyzolu w dobowej zbiórce moczu

Szczególnie użytecznym badaniem przesiewowym pierwszego rzutu w diagnostyce ZC jest oznaczenie stężenia kortyzolu w dobowej zbiórce moczu (24-h UC, *24-hour urine collection*). W warunkach prawidłowych 10% kortyzolu występuje w surowicy w stanie wolnym, niezwiązanym z białkami surowicy. Frakcja ta odpowiada za efekt biologiczny. Wolny kortyzol jest filtrowany przez nerki, większość ulega ponownej resorpcji w kanalikach nerkowych i tylko około 1% wydzielanego kortyzolu jest wydalany w postaci niezmienionej przez nerki. W stanach hipersekcji kortyzolu pojemność wiążąca globuliny wiążącej GKS (CBG, *corticosteroid-binding globulin*) jest przekroczona i stężenie wolnego kortyzolu w osoczu wzrasta, tak jak i wydalanie tego hormonu z moczem. Dobowe wydalanie wolnego kortyzolu z moczem odzwierciedla stężenie wolnego

kortyzolu w surowicy w tym przedziale czasu i koreluje z klinicznymi objawami hiperkortyzolemii. Oznaczenie stężenia wolnego kortyzolu w moczu stało się klinicznie dostępne w 1968 roku [43]. Metoda ta zastąpiła pomiar dobowego wydalania z moczem metabolitów kortyzolu — 17-hydroksykortykosteroidów (17-OHCS, *17 hydroxycorticosteroids*) [4]. Oznaczenie stężenia wolnego kortyzolu w moczu pozwala zazwyczaj na rozgraniczenie pacjentów z hiperkortyzolemią i otyłych osób bez ZC. Zawartość wolnego kortyzolu w moczu w przypadku otyłości najczęściej nie ulega podwyższeniu lub wzrasta nieznacznie. U mniej niż 5% otyłych osób wykazuje się nieznaczne łagodne zwiększenie wydalania wolnego kortyzolu z moczem [2]. Mengden i wsp. [44], używając do rozpoznawania ZC oznaczenia stężenia wolnego kortyzolu w 24-h UC, odróżnił 48 pacjentów z nadczynnością kory nadnerczy od 98 zdrowych nieotyłych pacjentów i 95 otyłych pacjentów bez ZC. Wykazał on również 100-procentową czułość i 98-procentową swoistość tego testu. Metoda ta ma o wiele większą wartość diagnostyczną w porównaniu z oznaczaniem wydalania 17-OHCS w 24-h UC, które ulega znacznemu zwiększeniu w otyłości i obecnie nie powinno być stosowane [45]. Niestety metoda oznaczania stężenia wolnego kortyzolu w moczu jest zawodna w różnicowaniu ZC z innymi niż otyłość, stanami określanymi mianem rzekomego ZC, w których może występować zwiększone wydalanie wolnego kortyzolu z moczem [46, 47]. Ponadto wadą tej metody jest możliwość nieodpowiedniego wykonania 24-h UC. Wpływ tego czynnika można jednak ograniczyć, udzielając choremu dokładnej instrukcji. Ponadto należy jednocześnie oznaczyć wydalanie kreatyniny, która jest pomocnym wskaźnikiem oceniającym, czy 24-h UC jest zebrana w całości, ponieważ wydalanie kreatyniny jest względnie stałe i powinno w przybliżeniu równać się 1 g kreatyniny na 24 godziny w przypadku pacjenta o masie ciała 70 kg (wartość zależy od masy mięśniowej). Wydalanie kreatyniny nie powinno zmienić się o więcej niż 10% między kolejnymi zbiórkami u tego samego pacjenta [29]. Należy także podkreślić, że jeżeli filtracja kłębuszkowa jest mniejsza niż 30 ml/min, wydalanie wolnego kortyzolu w moczu jest zmniejszone i może być przyczyną fałszywie ujemnego wyniku. Stężenie wolnego kortyzolu w moczu można oznaczać metodą radioimmunologiczną (RIA, *radioimmunoassay*), metodą wysokowydajnej chromatografii cieczowej (HPLC, *high performance liquid chromatography*) lub metodami immunochemicznymi. Na pomiar stężenia wolnego kortyzolu w moczu metodą RIA wpływają różne metabolity GKS oraz syntetyczne steroidy, dlatego tej metody lekarze nie zalecają. Natomiast HPLC jest metodą wysoce swoistą, która pozwala odizolować od pomiaru inne steroidy i ich metabolity. Większość

stosowanych leków nie interferuje z tym oznaczeniem. Wyjątkami są karbamazepina i digoksyna, które mogą fałszywie zawyżać wyniki [48]. Ten problem może rozwiązać spektrometria kombinowana z HPLC — jest ona jednak mało dostępna i droga [31]. Metody immunochemiczne w porównaniu z HPLC są mniej dokładne. Uważa się, że oznaczanie wydalania wolnego kortyzolu w 24-h UC należy powtórzyć 3 razy, ponieważ nawet najlepiej poinformowany i zmotywowany pacjent popełnia błędy oraz dlatego, że sekrecja hormonu może różnić się między poszczególnymi dniami, zwłaszcza w przypadkach epizodycznego i cyklicznego charakteru wydzielania kortyzolu [1, 31]. U 146 pacjentów z nadczynnością kory nadnerczy wykazano 95-procentową czułość dla pomiaru dobowego wydalania kortyzolu w moczu [49]. Jednak w tej grupie badanych u 11% przynajmniej jedno z 4 oznaczeń wolnego kortyzolu w 24-h UC pozostawało w granicach normy. W innych badaniach dobowe wydalanie wolnego kortyzolu było prawidłowe u 8–15% pacjentów z ZC [50, 51]. Zawartość wolnego kortyzolu w 24-h UC 4-krotnie przekraczającą górną granicę normy jednoznacznie potwierdza rozpoznanie ZC. Mniejsze przekroczenie górnej granicy normy wymaga wykonania dodatkowych testów [31]. Wynik prawidłowy nie wyklucza subklinicznego ZC, dlatego też nie może być on uniwersalnym pojedynczym testem przesiewowym potwierdzającym ZC.

Test hamowania 1 mg deksametazonu

Wartościowym badaniem przesiewowym pierwszego rzutu służącym do wykrycia hiperkortyzolemii jest test hamowania 1 mg deksametazonu (DXM) (inaczej test nocnego hamowania DXM lub krótki test hamowania DXM). Test ten został zaproponowany przez Nugenta i wsp. [52] w 1965 roku. W badaniu tym podaje się 1 mg DXM *p.o.* przed snem (między godziną 23.00 a 24.00) i oznacza się stężenie kortyzolu w surowicy na czczo (między 8.00 a 9.00) następnego dnia. Optymalną metodą oznaczania stężenia kortyzolu (całkowitego) w surowicy jest metoda chemiluminometryczna. Zmniejszenie stężenia kortyzolu poniżej 1,8 $\mu\text{g/dl}$ (50 nmol/l) wyklucza rozpoznanie ZC. Do niedawna za prawidłową wartość uznawano obniżenie kortyzolemii poniżej 5 $\mu\text{g/dl}$ (138 nmol/l), jednak zmniejszenie tej wartości znacznie zwiększyło czułość testu [53, 54]. Znaczny odsetek wyników fałszywie ujemnych przy wartości progowej 5 $\mu\text{g/dl}$ może się wiązać z łagodną hiperkortyzolemią lub spowolnionym metabolizmem DXM. Od czasu wprowadzenia testu sugerowano stosowanie zróżnicowanych dawek DXM (0,5–2 mg), jednak większość autorów uważa, że użycie innej dawki DXM niż 1 mg nie przynosi dodatkowych korzyści, a jej zwiększenie znacząco zmniejsza czułość testu

[50, 55–58]. Ocenia się, że przy obecnych kryteriach test ma wysoką czułość (98%), ale stosunkowo niską swoistość (88%) [53, 54]. Wyniki fałszywie dodatnie mogą być spowodowane zwiększonym stężeniem globuliny wiążącej kortykosteroidy (CBG, *corticoid-binding globulin*) (stany hiperestrogenizmu) lub rzekomym ZC. Przyczyną fałszywie dodatnich wyników może być także upośledzone wchłanianie DXM. Jednoczesny pomiar stężenia kortyzolu i DXM w surowicy mógłby być stosowany w celu kontroli wchłaniania DXM [59]. U pacjentów przyjmujących leki indukujące enzymy mikrosomalne w wątrobie (barbiturany, fenytoina, karbamazepina, rifampicyna, meprobamat, aminoglutetymid, metakwalon) metabolizm deksametazonu może być przyspieszony, przez co nie osiąga on stężeń adekwatnych dla supresji ACTH, co także może być przyczyną fałszywie dodatnich wyników [60]. Być może optymalnym rozwiązaniem jest przyjęcie pośredniej wartości kortyzolu po hamowaniu przez 1 mg DXM. W badaniach holenderskich najlepszą czułość (100-proc.) i wysoką swoistość (94-proc.) testu uzyskano przy przyjęciu za wartość progową 3,4 $\mu\text{g/dl}$ (95 nmol/l) [61].

Oznaczenie stężenia wolnego kortyzolu w ślinie późnym wieczorem

Innym testem proponowanym jako badanie przesiewowe pierwszego rzutu jest oznaczenie stężenia wolnego kortyzolu w ślinie późnym wieczorem. Testy do oznaczania wolnej frakcji kortyzolu w osoczu nie są powszechnie dostępne, zasugerowano więc zastosowanie oznaczenia kortyzolu w ślinie metodą RIA lub metodą kompetycyjnego wiązania przez białka, jako metody alternatywnej. Wolny kortyzol dyfunduje z osocza do śliny niezależnie od szybkości wydzielania, dlatego też stężenie kortyzolu w ślinie lepiej odzwierciedla stężenie wolnego kortyzolu w osoczu niż stężenie całkowitego kortyzolu w osoczu. Test jest prosty w wykonaniu, a próbkę można przechowywać w temperaturze pokojowej. Normy referencyjne powinny być ustalone przez każde laboratorium na dostatecznie dużej grupie kontrolnej. Stwierdzono, że czułość testu wynosi 93%, a jego specyficzność jest bliska 100% [31, 62]. Wiarygodność i przydatność kliniczna tego testu wymaga jednak potwierdzenia.

Test hamowania 2 mg deksametazonu

Badaniem przesiewowym II rzutu jest test hamowania 2 mg DXM, który stanowi I fazę klasycznego testu Liddle'a [63]. Po wykonaniu dwóch 24-h UC w celu określenia podstawowego wydalania kortyzolu, podaje się 0,5 mg DXM *p.o.* co 6 godzin przez 2 doby. W 2. dobie aplikowania DXM dokonuje się kolejnej 24-h UC w celu oznaczenia wydalania wolnego kortyzolu (klasyczny wariant testu). W oryginalnym teście opisanym przez

Liddle'a w 1960 roku zamiast oznaczania wydalania wolnego kortyzolu w 24-h UC, dokonywano pomiaru stężenia 17-OHCS w 24-h UC. Alternatywny wariant testu polega na oznaczeniu stężenia kortyzolu w surowicy o godzinie 9.00 rano przed podaniem DXM i 48 godzin później (czyli po ostatniej dawce DXM), zamiast oznaczeń stężenia kortyzolu w 24-h UC. O prawidłowej odpowiedzi świadczy zmniejszenie dobowego wydalania wolnego kortyzolu z moczem poniżej $10 \mu\text{g}$ na dobę ($27 \text{ nmol}/24 \text{ h}$) lub zmniejszenie stężenia kortyzolu poniżej $1,8 \mu\text{g}/\text{dl}$ ($50 \text{ nmol}/\text{l}$) w próbce krwi pobranej rano po przyjęciu ostatniej dawki DXM [31, 53]. Czułość i swoistość tego testu, w przypadku oznaczania stężenia kortyzolu w surowicy, ocenia się na ponad 95% [4]. Wykazano, że zarówno test hamowania 2 mg DXM oraz test nocnego hamowania DXM wydają się mieć porównywalną czułość (98–100%). Natomiast test hamowania 2 mg DXM ma większą swoistość (97–100%) niż test hamowania 1 mg DXM (88%) [53]. Dlatego też w niektórych ośrodkach test hamowania 2 mg DXM stosuje się jako badanie pierwszego rzutu. Należy zaznaczyć, że w obu wariantach testu zaburzone wchłanianie i metabolizm DXM może wpływać na wyniki testu.

Rytm dobowy kortyzolu

Oznaczenie stężenia kortyzolu w surowicy o północy (w ramach rytmu dobowego) jest badaniem przesiewowym drugiego rzutu używanym w celu wykrycia hiperkortyzolemii. Zniesienie rytmu dobowego uważa się za częstą cechę ZC. Po raz pierwszy zaburzenie to opisał Doe i wsp. w 1960 roku, a jego obserwacja została wielokrotnie potwierdzona [63, 65–68]. W warunkach prawidłowych kortyzol jest wydzielany pulsacyjnie, a rytm jego wydzielania w ciągu doby jest równoległy do rytmu wydzielania ACTH. Ich stężenie jest zwykle najwyższe w ciągu dnia, osiągając minimum późnym wieczorem. U osób z ZC stężenie kortyzolu w osoczu może pozostawać w granicach normy ze względu na to, że prawidłowe wartości stężenia kortyzolu w surowicy mają szeroki zakres [2]. Natomiast cechą charakterystyczną ZC jest brak redukcji kortyzolemii w godzinach popołudniowych, z nadirem około północy. Wykazano, że kortyzolemia o północy u hospitalizowanych pacjentów z ZC w czasie spoczynku nocnego ma wartość powyżej $1,8 \mu\text{g}/\text{dl}$ ($50 \text{ nmol}/\text{l}$). Przy ustaleniu, że wartością prawidłową jest kortyzolemia niższa od $1,8 \mu\text{g}/\text{dl}$, test osiąga 100-procentową czułość [69]. W tym przypadku nie określano swoistości testu. Inni autorzy przy zastosowaniu wyższej wartości progowej — $7,5 \mu\text{g}/\text{dl}$ ($207 \text{ nmol}/\text{l}$) — uzyskali 94-procentową czułość i 100-procentową swoistość w różnicowaniu pacjentów z ZC od osób z rzekomym ZC [70]. Pomiar stężenia kortyzolu o innych porach dnia wydają się mniej użyteczne [70]. W trakcie wykonywania oznaczeń należy pamiętać

o minimalizacji stresu u badanego. Często jednak trudno jest to osiągnąć w trakcie hospitalizacji, co może prowadzić do fałszywie dodatnich wyników.

Test wykluczający rozpoznanie rzekomego zespołu Cushinga

Częstym problemem diagnostycznym jest rozróżnienie pacjentów z łagodnym ZC od pacjentów z rzekomym ZC. Biochemicznymi wykładnikami hiperkortyzolemii spotykanymi w rzekomym ZC są: zwiększenie ilości wolnego kortyzolu wydalanego z moczem, zaburzenia dobowego rytmu wydzielania kortyzolu oraz brak obniżenia stężenia kortyzolu w teście hamowania małą dawką (1 mg albo 2 mg) DXM. Wywiad i badanie przedmiotowe mogą dostarczyć specyficznych wskazówek na temat właściwej diagnozy, ale jej ostateczne biochemiczne potwierdzenie może być trudne i wymagać powtarzania badań. Rozstrzygającym testem służącym do różnicowania prawdziwego i rzekomego ZC jest test hamowania 2 mg DXM z testem stymulacyjnym z użyciem CRH. Polega on na podawaniu DXM przez 48 godzin w dawce 0,5 mg co 6 godzin. Następnie 2 godziny po podaniu ostatniej dawki DXM (tj. o godz. 8.00) należy dożylnie podać CRH w dawce $1 \mu\text{g}/\text{kg m.c.}$ Pomiar stężenia kortyzolu w surowicy należy wykonać po 15 minutach po podaniu CRH. Kortyzolemia powyżej $1,4 \mu\text{g}/\text{dl}$ ($38 \text{ nmol}/\text{l}$) świadczy o ZC. U osób zdrowych i z rzekomym ZC wydzielanie kortyzolu pozostaje zahamowane [47]. W rzekomym ZC występuje przewlekłe nadmierne wydzielanie CRH wywołane stresem, wskutek czego upośledzona jest reakcja na egzogenną CRH podaną po teście hamowania DXM.

Testy stosowane w diagnostyce różnicowej zespołu Cushinga

Po wykryciu hiperkortyzolemii i rozpoznaniu ZC należy zastosować bardziej swoiste badania, pozwalające określić przyczynę pojawienia się ZC. Na wstępnym etapie różnicowania ZC należy ocenić zależność hiperkortyzolemii od ACTH.

Oznaczenie ACTH w osoczu

Referencyjną metodą oznaczania kortykotropinemii jest metoda immunoradiometryczna (IRMA, *immunoradiometric assay*). Krew do oznaczenia stężenia ACTH należy pobrać o godz. 9.00 rano do schłodzonej probówki, zawierającej kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA, *ethylenediaminetetraacetic*), następnie szybko przetransportować w wodzie z lodem do laboratorium i odwirować w warunkach chłodniczych. W ACTH-niezależnym ZC wartości stężenia ACTH mogą być nieoznaczalne, poniżej lub w dolnej granicy normy. Wydzielanie ACTH może nie być całkowicie zablokowane mimo autonomicznej nadnerczowej produkcji kortyzolu, zwłaszcza

gdy jego wydzielanie jest przerywane lub stosunkowo niewielkie. W CC stężenie ACTH jest zwykle podwyższone lub pozostaje w normie. W EZC-ACTH zwykle znacznie przekracza normę, jednak prawidłowe stężenie ACTH nie wyklucza EZC-ACTH [31]. Zazwyczaj stężenie ACTH niższe niż 10 pg/ml (2 pmol/l) u osoby z hiperkortyzolemią wskazuje na ACTH-niezależny ZC, zaś stężenie powyżej 20 mg/ml (4 pmol/l) sugeruje ACTH-zależny ZC. Stężenia w przedziale 10–20 pg/ml (2–4 pmol/l) wymagają wykonania testu stymulującego z CRH [31]. Oznaczenie jedynie stężenia ACTH rzadko pozwala na różnicowanie między CC a EZC-ACTH, chociaż w drugim przypadku stężenie ACTH jest zwykle wybitnie większe. Guzy produkujące ACTH wydzielają również prekursor ACTH, przy czym guzy ektopowe i makrogruczolaki przysadki charakteryzują się większym wydzielaniem prekursorów kortykotropiny w porównaniu z mikrogruczolakami [71–73]. Uważa się, że produkcja prekursorów wiąże się raczej z inwazyjnością lub złośliwością guza niż jego źródłem [73]. Należy także zaznaczyć, że wartości stężenia ACTH nie mają istotnej wartości diagnostycznej, jeżeli nie są interpretowane w zestawieniu z innymi wynikami badań czy objawami, ze względu na dobową zmienność wydzielania ACTH, jak również możliwość epizodycznego i cyklicznego wydzielania kortykotropiny.

Test hamowania 8 mg deksametazonu

Użytecznym testem w różnicowaniu ZC jest test hamowania 8 mg DXM [31]. Uzasadnieniem dla tej procedury jest fakt, że u pacjentów z CC oś podwzgórze–przysadka–nadnercza można zahamować ponadfizjologicznymi dawkami DXM, natomiast u pacjentów z nadnerczowym ZC (gruczolaki nadnerczy, drobno- lub wielkoguzkowy przerost nadnerczy) i u pacjentów z ektopowym wydzielaniem ACTH nie uzyskuje się zmniejszenia kortyzolemii, ze względu na autonomiczny charakter wydzielania kortyzolu. Test ten stanowi II fazę klasycznego testu Liddle'a [63]. Obecnie istnieje kilka modyfikacji testu hamowania dużą dawką (8 mg) DXM. Standardowo DXM podaje się doustnie w dawce 2 mg co 6 godzin przez 2 doby. Wówczas ocenia się wydalanie wolnego kortyzolu w 24-h UC wyjściowo (przez 2 doby) i w 2. dobie podawania DXM. Rzadziej, po oznaczeniu podstawowej, porannej kortyzolemii, podaje się jednorazowo 8 mg DXM doustnie albo 4–7 mg (1 mg DXM/h) dożylnie o godzinie 23.00 i określa stężenie kortyzolu w osoczu o godzinie 8.00 następnego dnia [4, 31]. Zmniejszenie wydalania kortyzolu z moczem lub stężenia kortyzolu w surowicy do wartości mniejszej niż 50% wartości wyjściowej wskazuje na CC. Natomiast brak hamowania wydzielania kortyzolu świadczy o ektopowej produkcji ACTH lub nadnerczowym ZC. Wykazano jednak, że u około 50% pa-

cientów z rakowiakiem oskrzeli, ektopowo wydzielającym ACTH, występuje hamowanie wydzielania kortyzolu po dużej dawce DXM [1]. Natomiast u niektórych pacjentów z makrogruczolakiem przysadki nie występuje hamowanie wydzielania kortyzolu po podaniu dużej dawki DXM [74]. W przypadku CC stopień hamowania wydzielania kortyzolu po dużej dawce DXM zależy od wielkości podstawowej produkcji kortyzolu [1]. Większe hamowanie jest obserwowane u pacjentów z niższymi podstawowymi stężeniami kortyzolu. Z kolei przy wysokiej kortyzolemii nawet duże dawki DXM zazwyczaj dostatecznie nie hamują wydzielania kortyzolu, co obserwuje się u niektórych pacjentów z makrogruczolakami. Natomiast w niektórych przypadkach rakowiaków oskrzeli i raków rdzeniastych tarczycy wykazano ektopowe wydzielanie CRH, a nie ACTH [75]. Może to wyjaśniać hamowanie wydzielania kortyzolu dużą dawką DXM u niektórych pacjentów z EZC-ACTH. Test ten wprawdzie nie pozwala na ostateczne zróżnicowanie CC i ektopowej produkcji ACTH, ale jeżeli za punkt odcięcia przyjmuje się 50-procentowe zmniejszenie kortyzolemii, to można rozróżnić przysadkowe źródło wydzielania ACTH od ektopowego z 81-procentową czułością i 67-procentową swoistością [76]. Swoistość może być wyższa, jeżeli za punkt odcięcia przyjmie się 80-procentowe zmniejszenie wydzielania kortyzolu [31]. Niewystarczające hamowanie wydzielania kortyzolu u pacjentów z CC może także się wiązać z nieprawidłowym wchłanianiem DXM. Dlatego też zaproponowano test z dożylną infuzją DXM. W 5-godzinny teście podawania DXM *i.v.* w dawce 1 mg/h wykazano 50-procentowe hamowanie wydzielania kortyzolu w CC [77]. Natomiast w badaniach z zastosowaniem 7-godzinnej infuzji DXM (1 mg/h) stwierdzono wysoką czułość przekraczającą 95% i swoistość rzędu 63–90% dla CC [78, 79]. Wyniki testu hamowania dużą dawką (8 mg) DXM należy interpretować ostrożnie.

W 10–40% przypadków CC, na skutek długotrwałej i przewlekłej stymulacji nadnerczy przez ACTH, dochodzi do obustronnego wielkoguzkowego przerostu nadnerczy. Można wówczas stwierdzić jeden lub kilka guzków o średnicy kilku centymetrów. Guzki te mogą uzyskać pewien stopień autonomii i wydelać większe ilości kortyzolu, nieadekwatnie wysokie w stosunku do uwalnianego ACTH. To z kolei prowadzi zwykle do tłumienia wydzielania ACTH. Dlatego też w tym przypadku można stwierdzić stosunkowo niskie stężenie ACTH oraz mniejsze niż w innych przypadkach CC hamowanie wydzielania kortyzolu 8 mg DXM, co w konsekwencji może prowadzić do mylnego rozpoznania nadnerczowego ZC.

Test stymulacyjny z CRH

Owczą kortykoliberynę (oCRH, *ovine corticotropin-releasing hormone*) po raz pierwszy wyizolowano w 1981

roku, a w 1983 roku poznano strukturę aminokwasową ludzkiej kortykoliberyny (hCRH, *human corticotropin-releasing hormone*) [80, 81]. Ludzka kortykoliberyna przy zbliżonej strukturze do oCRH ma krótszy czas działania i powoduje mniejszy wzrost stężenia ACTH i kortyzolu u zdrowych, otyłych i pacjentów z CC [82]. Zaleca się, aby test wykonywano rano, u pacjentów będących na czczo i leżących. Po pobraniu krwi w celu oznaczenia wyjściowego stężenia ACTH i kortyzolu, należy podać dożylnie syntetyczną owczą lub ludzką CRH w dawce 1 µg/kg m.c. albo pojedynczą dawkę 100 µg. Następnie należy pobierać próbki krwi, w celu dokonania pomiaru stężenia ACTH i kortyzolu co 15 minut przez 1–2 godziny od momentu podania CRH. U zdrowych osób CRH powoduje wzrost wydzielania ACTH i kortyzolu o około 15–20% [1]. Zwiększenie stężenia ACTH i kortyzolu w osoczu pod wpływem CRH występuje u większości chorych z CC i jest wyższe niż u osób zdrowych. Odpowiedź na CRH występuje także w niewielu przypadkach ektopowego wydzielania ACTH, natomiast nie występuje lub jest nieznaczna w ACTH-niezależnym ZC. Do kryteriów diagnostycznych CC w teście z oCRH, zaproponowanych przez Kaye i Crapo, należą wzrost stężenia ACTH powyżej 50% i wzrost stężenia kortyzolu powyżej 20% po podaniu oCRH [83]. Przy takiej wartości progowej wzrostu stężenia ACTH wykazano 86-procentową czułość i 95-procentową swoistość testu. Natomiast przy osiągnięciu progowego wzrostu stężenia kortyzolu uzyskano 91-procentową czułość i 95-procentową swoistość. W innym badaniu oceniającym efekt działania oCRH u 100 pacjentów z CC i 16 pacjentów z EZC-ACTH wykazano, że wzrost stężenia ACTH o 35% w 15. i 30. minucie po podaniu oCRH w stosunku do wartości z 5. i 1. minuty przed podaniem oCRH sprawia, że test osiąga 93-procentową czułość i 100-procentową swoistość w diagnozowaniu CC. Natomiast, oceniając odpowiedź kortyzolu, wykazano, że przy uzyskaniu przynajmniej 20-procentowego wzrostu stężenia kortyzolu w 30. i 45. minucie po podaniu oCRH można z 91-procentową czułością i 88-procentową swoistością zdiagnozować CC [84]. W jednym z badań oceniano wartość diagnostyczną hCRH u 101 pacjentów z CC i 14 pacjentów z EZC-ACTH [85]. Najlepszym kryterium odróżniającym CC od EZC-ACTH był wzrost stężenia kortyzolu o 14% w stosunku do stężenia wyjściowego, w 15. i 30. minucie po podaniu hCRH. Przy takim kryterium test osiągnął 85-procentową czułość i 100-procentową swoistość. Natomiast gdy oceniano maksymalny wzrost stężenia ACTH (przynajmniej o 105%), wykazano tylko 70-procentową czułość i 100-procentową swoistość testu. W badaniach porównawczych testów z użyciem oCRH i hCRH w różnicowaniu ACTH-zależnej nadczynności kory nadnerczy wykazano wyższą wartość

diagnostyczną testu z oCRH [86]. Przewaga testu z oCRH nad testem z hCRH polega na większej sile stymulacji ACTH, co przede wszystkim wiąże się z wolniejszym odszczepianiem oCRH od białka nośnikowego [87]. Wyniki innych badań porównujących oba typy CRH w diagnostyce różnicowej CC i EZC-ACTH wykazały, że 50-procentowy wzrost stężenia ACTH i kortyzolu pozwala ze 100-procentową swoistością zdiagnozować CC. Oceniając odpowiedź ACTH, można stwierdzić, że czułość i swoistość testów była porównywalna w przypadku obu typów CRH (czułość: 85% vs. 87% odpowiednio dla oCRH i hCRH). Natomiast, oceniając odpowiedź kortyzolu, wykazano, że czułość była znacząco większa w teście z oCRH w porównaniu z hCRH (czułość: 67% vs. 50% odpowiednio dla oCRH i hCRH) [51].

Podsumowując, test stymulacyjny z CRH jest pomocny w różnicowaniu ACTH-zależnego ZC. Niestety nie ma ustalonego konsensusu co do kryteriów diagnostycznych. Interpretacja wyników zależy od rodzaju stosowanego CRH, czasu dokonywania pomiarów i ocenianych parametrów biochemicznych. Jednak na podstawie przedstawionych danych, biorąc pod uwagę podwyższone wartości wyjściowe stężeń ACTH i kortyzolu u pacjentów z CC, wydaje się, że dla testu stymulacji CRH najlepszym kryterium potwierdzającym rozpoznanie tej choroby jest zwiększenie stężenia ACTH już o 35–50% w 15–30 minut i wzrost kortyzolemii już o 14–20% w 15–45 minut. Z uwagi na to, że około 10% pacjentów z CC nie odpowiada na CRH oraz na możliwość reakcji na CRH niektórych pacjentów z EZC-ACTH, test powinien być interpretowany w zestawieniu z innymi testami stosowanymi w różnicowaniu ZC [31].

Test z metopironem

Metopiron (MTP, *metoprion*) blokuje przemianę 11-deokykortyzolu (11DK) do kortyzolu i deokykortykosteronu (DOC, *deoxycorticosteroid*) do kortykosteronu przez hamowanie 11β-hydroksylazy. W ten sposób obniża stężenie kortyzolu i poprzez sprzężenie zwrotne zwiększa wydzielanie ACTH. To z kolei pobudza wydzielanie steroidów nadnerczowych syntetyzowanych przed blokiem. Metopiron podawany w dawce 750 mg co 4 godziny w ciągu doby u pacjentów z CC powoduje wyolbrzymiony wzrost stężenia ACTH i 11DK w surowicy — w 24. godzinie testu stężenia przewyższają 1000 nmol/l (35 µg/dl). U większości pacjentów z nadnerczowym ZC brakuje odpowiedzi na MTP. Podobnych wyników stymulacji MTP można się spodziewać u chorych z EZC-ACTH. Jednak u niektórych z nich występuje wzrost stężenia 11DK, podobnie jak u pacjentów z CC, co może się wiązać z wydzielaniem zarówno ACTH, jak i CRH [88]. Obecnie test z MTP nie jest rekomendowany w diagnostyce różnicowej ZC, ze względu na małą wiarygodność. Jednak może być

pomocny w przypadku pacjentów, u których wyniki innych testów są dwuznaczne [1].

Test z wazopresyną

Wazopresyna zwiększa wydzielanie ACTH poprzez receptor V3 (V1b) występujący w komórkach kortykotropowych. Próbowano ją wykorzystać w różnicowaniu ACTH-zależnego ZC, ale u 27% pacjentów z CC stwierdzono fałszywie ujemną odpowiedź [89–96]. Jednak testu tego, ze względu na mniejszą wartość diagnostyczną w porównaniu z testem z CRH, nie zaleca się w diagnostyce różnicowej ACTH-zależnego ZC [97, 98]. Dożylnie podanie analogu wazopresyny — desmopresyny (agonisty receptorów V2 i V3) w dawce 10 µg zwiększa wydzielanie ACTH u 80–90% pacjentów z CC, u 20–50% chorych z EZC-ACTH (związane najprawdopodobniej z obecnością receptorów V3) oraz u nieznacznej liczby osób zdrowych lub z zespołem rzekomego ZC [21, 99]. Znaczny odsetek pacjentów z EZC-ACTH, u których obserwowano dodatni wynik testu pobudzenia desmopresyną, ogranicza jego użyteczność w różnicowaniu ACTH-zależnego ZC. Próbowano łączyć test z desmopresyną ze stymulacją CRH w celu podwyższenia wartości diagnostycznej, jednak w opublikowanych ostatnio danych wykazano małą wartość kliniczną takiego skojarzenia [99].

Wzrost stężenia kortyzolu po podaniu egzogennej wazopresyny lub desmopresyny może się wiązać z występowaniem ektopowych receptorów dla tego hormonu w guzach nadnerczy i ACTH-niezależnym przerzucie nadnerczy, co może znaleźć zastosowanie w diagnostyce ACTH-niezależnego ZC (tab. IV).

Inne potencjalnie użyteczne testy różnicujące przyczynę zespołu Cushinga

Hormon wzrostu (GH, *growth hormone*) zwiększa wydzielanie ACTH w większym stopniu niż CRH i wazopresyna u pacjentów z CC, przy czym mikrogruczolakom przysadki zwykle towarzyszy wyższy wzrost ACTH niż makrogruczolakom [100]. Jednak GH pobudza także wydzielanie ACTH w EZC-ACTH, w związku z czym testu z GH nie zaleca się w standardowej praktyce klinicznej [31].

Loperamid może hamować wydzielanie ACTH u osób zdrowych, nie wykazując takiego działania w przypadku pacjentów z ZC. Nalokson z kolei pobudza wydzielanie ACTH u pacjentów z ZC, ale w mniejszym stopniu niż u osób zdrowych. Testy z użyciem tych substancji nie mają ustalonej wartości diagnostycznej [4, 31].

W przypadku podejrzenia występowania ektopowych receptorów w nadnerczach można przeprowadzić testy przedstawione w tabeli IV. Jednak ich przydatność w rutynowej praktyce klinicznej nie została w pełni potwierdzona [21].

Badania obrazowe

W przypadku stwierdzenia ACTH-zależnego ZC należy zobrazować przysadkę metodą magnetycznego rezonansu jądrowego (MRJ) z użyciem gadolinu jako środka kontrastowego, co pozwala na uwidocznienie gruczolaka u około 50–60% pacjentów z CC [30, 51]. Wykazano, że MRJ gradientowy ujawnia mniejsze guzy przysadki w porównaniu z MRJ spinowym [101]. Stosunkowo wysoki odsetek zmian nieulegających uwidocznieniu wynika z tego, że około 90% guzów przysadki wydzielających ACTH stanowią mikrogruczolaki (guzy o średnicy < 10 mm), z których połowa ma średnicę nieprzekraczającą 5 mm [1]. Z jednej strony, w przypadku potwierdzenia ACTH-zależnego ZC i stwierdzeniu obecności gruczolaka przysadki o średnicy większej niż 6 mm z wysokim prawdopodobieństwem można rozpoznać CC [31]. Z drugiej strony u około 10% populacji za pomocą MRJ można przypadkowo wykryć zmianę w obrębie przysadki (*incidentaloma*), niemającą znaczenia klinicznego. W większości przypadków średnica takiej zmiany nie przekracza 5 mm [31]. Tomografia komputerowa (TK) ma mniejszą czułość w wykrywaniu mikrogruczolaków przysadki (40–50%), dlatego nie jest w tym przypadku metodą z wyboru [51, 83].

Do najczęściej występujących pozaprzysadkowych guzów wydzielających ACTH należą nowotwory neuroendokrynne: oskrzeli, grasicy, trzustki, przewodu pokarmowego oraz rak rdzeniasty tarczycy i guz chromochłonny. W poszukiwaniu tych guzów są pomocne TK lub MRJ klatki piersiowej, szyi i jamy brzusznej, aczkolwiek ze względu na mały rozmiar niektóre z tych nowotworów mogą nie zostać uwidocznione [31]. Niektóre guzy wykazują obecność receptorów somatostatynowych i dzięki temu można je zobrazować, wykonując scyntyografię z użyciem analogu somatostatyny [102]. Szczególnie przydatna w poszukiwaniu tych ektopowych guzów wydzielających ACTH, których nie udaje się uwidocznić za pomocą innych badań obrazowych, może się okazać pozytronowa tomografia emisyjna (PET, *positron tomography emission*) [31].

W ACTH-niezależnym ZC w uwidacznianiu zmian w nadnerczach badaniem z wyboru jest TK [103]. Tomografia komputerowa pozwala na zobrazowanie nie tylko zmian ogniskowych, ale także przerostu guzkowego nadnerczy. Scyntygrafia z zastosowaniem cholesterolu znakowanego ¹³¹I umożliwia zobrazowanie zmian przerostowych obu nadnerczy, natomiast TK w takiej sytuacji może ujawnić zmiany tylko w jednym z nich [104, 105]. Przeważająca część guzów nadnerczy ma charakter łagodnych gruczolaków. W TK gruczolaki to zazwyczaj zmiany okrągłe, wyraźnie odgraniczone od otoczenia, homogenne, o wielkości do 4 cm [106–108]. W badaniu TK z kontrastem mają zazwyczaj gęstość niższą

Tabela IV

Zmiany wydzielania kortyzolu związane z obecnością ektopowych receptorów w korze nadnerczy w odpowiedzi na bodźce (na podstawie [21])

Table IV

Changes in cortisol excretion connected with presence of ectopic receptors in the cortex of suprarenal glands in response to stimuli (based on [21])

Receptory	Wydzielanie kortyzolu
Wazopresynowy	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ po AVP • ↓ po podaniu wody • ↑ po infuzji soli • test z desmopresyną: brak ↑ →obecność V1; ↑ obecność →V2
β-adrenergiczny	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ w hipoglikemii poinsulinowej • ↑ po infuzji izoproterenolu • ↓ po lekach β-adrenolitycznych
Dla angiotensyny II	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ po infuzji angiotensyny II • ↑ po pionizacji (zahamowany przez antagonistę receptora AT1)
Dla TSH	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ po ludzkiej TSH • ↓ po T4 lub T3
Dla TRH	<ul style="list-style-type: none"> • brak ↑ po ludzkiej TSH • ↓ po T4 lub T3
Dla PRL	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ po chlorpromazynie • ↓ po bromokryptynie
Dla LH	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ po hCG lub LH • brak ↑ po FSH • długotrwałe ↓ po agonistach GnRH
Dla FSH	<ul style="list-style-type: none"> • brak ↑ po LH lub hCG • ↑ po FSH • długotrwałe ↓ po agonistach GnRH
Dla GnRH	<ul style="list-style-type: none"> • brak ↑ po LH lub hCG • brak ↑ po FSH • początkowe ↑ i możliwe długotrwałe ↓ po agonistach GnRH
Dla GIP	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ po doustnym podaniu glukozy, tłuszczów, białek • brak ↑ po dożylnym podaniu glukozy • ↓ po somatostatynie • ↑ po infuzji GIP
Serotoninowy 5HT ₄	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ po metoklopramidzie lub cyzaprydzie

↑ — zwiększenie stężenia kortyzolu; ↓ — zmniejszenie stężenia kortyzolu; AVP (*arginine vasopresin*) — wazopresyna; TSH (*thyroid stimulating hormone*) — hormon tyreotropowy; TRH (*thyrotropin-releasing hormone*) — tyreoliberyna, PRL (*prolactine*) — prolaktyna, LH (*lutetrophic hormone*) — lutropina, FSH (*follicle-stimulating hormone*) — folitropina; hCG (*human chorionic gonadotropin*) — gonadotropina kosmówkowa; GnRH (*gonadotrophin-releasing hormone*) — gonadotropina; GIP (*gastric inhibitory peptide*) — żołądkowy peptyd hamujący

niż 10 j.H. (jednostki Hounsfieldda) w I fazie badania i niższą niż 40 j.H. w 30. minucie II fazy badania [107, 109]. W tego typu zmianach mała gęstość wiąże się ze znaczną zawartością lipidów. Cechami sugerującymi złośliwy charakter uwidocznionej zmiany są: średnica guza powyżej 4–6 cm, nieregularne obrysy, niehomogenna struktura (ogniska martwicy i zwapnienia), nieostre odgraniczenie od otoczenia, gęstość powyżej 10 j.H. w I fazie badania TK z kontrastem i powyżej 40 j.H. w 30. minucie II fazy badania [107, 109, 110]. Dodatkowych informacji na temat zawartości lipidów w zmianie może

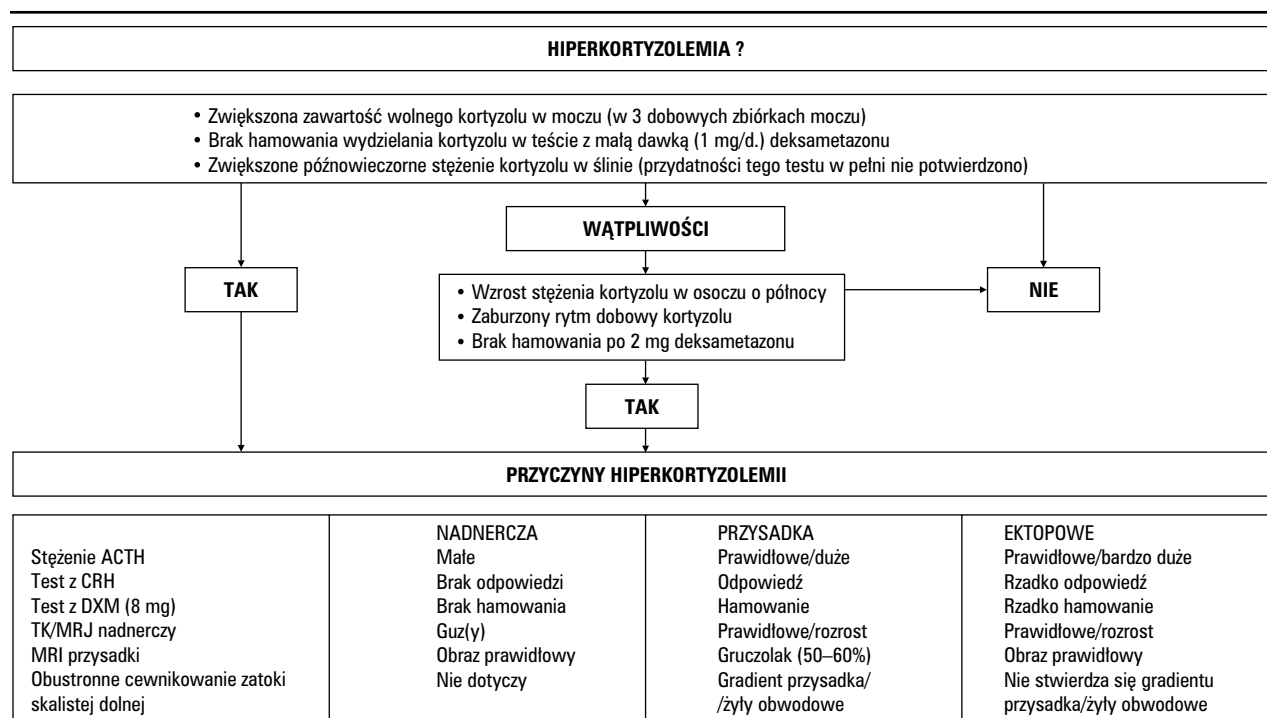
dostarczyć badanie MRJ, co pomaga w różnicowaniu gruczolaka i raka nadnerczy. Zawartość lipidów w gruczolaku jest zazwyczaj znaczna, dlatego też w obrazach T2-zależnych uzyskuje się obniżenie sygnału z tego rodzaju zmian. Intensywność sygnału jest tylko nieznacznie większa niż intensywność sygnału wątroby. Natomiast rak nie zawiera lipidów lub zawiera ich niewiele. W tym przypadku intensywność sygnału jest znacznie wyższa niż intensywność sygnału wątroby. Inne doniesienia wskazują, że narządem referencyjnym bardziej właściwym od wątroby jest śledziona, ponieważ

Tabela V

Rozpoznawanie zespołu Cushinga (na podstawie [31])

Table V

The diagnosis of Cushing syndrome (based on [31])



ACTH (*adrenocorticotrophic hormone*) — kortykotropina; CRH (*corticotropin-releasing hormone*) — kortykoliberyna; DXM (*dexametazon*) — deksametazon; TK, tomografia komputerowa; MRJ, magnetyczny rezonans jądrowy

intensywność sygnału wątroby może być zmieniona przez często spotykane choroby jej mięszu (np. stłuszczenie) [111–113]. Występowanie lipidów można również wykazać w MRJ przeprowadzonym metodą przesunięcia chemicznego.

Podczas wykonywania badania TK jamy brzusznej u ponad 5% populacji przypadkowo wykrywa się guzy nadnerczy (*incidentaloma*) [1]. W 90% przypadków *incidentaloma* nadnerczy są nieczynne hormonalnie, ale u blisko 10% osób z przypadkowo wykrytymi guzami nadnercza występuje nieznaczna autonomiczna nadprodukcja kortyzolu [31].

Badania inwazyjne

Jeżeli u chorego z ACTH-zależnym ZC wyniki badań klinicznych, biochemicznych lub obrazowych są sprzeczne, to należy rozważyć cewnikowanie zatok skalistych dolnych (IPSC, *inferior petrosal sinus catheterization*), polegające na zacewnikowaniu przez radiologa obu zatok skalistych dolnych i pobraniu krwi w celu oznaczenia stężenia ACTH wyjściowo oraz po 3 i 5 minutach (w niektórych ośrodkach również po 10 min) od dożylnego wstrzyknięcia CRH w dawce 1 µg/kg m.c. lub 100 µg. Krew jest pobierana równocześnie z obu

zatok skalistych dolnych i z żył obwodowych. Rozpoznanie CC potwierdza stosunek stężenia ACTH we krwi pobranej z zatoki skalistej dolnej (IPS, *interior petrosal sinus*) do stężenia ACTH we krwi obwodowej (P, *peripheral*) (wskaźnik IPS/P) powyżej 2,0 w warunkach podstawowych lub powyżej 3,0 w teście stymulacyjnym z CRH [31]. Cewnikowanie zatok skalistych dolnych wykonywane w ośrodkach z doświadczonym personelem pozwala z bardzo dużą czułością (95–99%) rozpoznać CC, o ile wykonuje się je po potwierdzeniu zwiększonego stężenia kortyzolu w surowicy, świadczącego o aktualnej czynności wydzielniczej guza wytwarzającego ACTH [114]. Mniejsze wartości wskaźnika IPS/P świadczą o obecności EZC-ACTH ze swoistością 95–99-procentową, aczkolwiek w niektórych rzadkich przypadkach CC stwierdza się również małe wartości wskaźnika IPS/P. Trudności techniczne lub anomalie unaczynienia żylnego bywają niekiedy przyczyną wyniku fałszywie ujemnego, nawet u chorych ze znacznie zwiększonym wydzieleniem ACTH przez przysadkę. Mimo to IPSC pozostaje najbardziej wiarygodnym badaniem w rozpoznawaniu CC [31]. Mimo zalet, cewnikowanie zatok skalistych dolnych może stanowić zagrożenie dla życia pacjenta i dlatego powinno być wykonywane tylko w uzasadnionych przypadkach

i w ośrodkach neurochirurgicznych z doświadczonym personelem.

Podsumowanie

Biorąc pod uwagę złożony charakter diagnostyki ZC oraz wątpliwości związane z jego rozpoznawaniem i różnicowaniem, w 2002 roku w Ankonie zespół ekspertów przedstawił propozycję algorytmu diagnostycznego, mogącego służyć jako kliniczny przewodnik, który należy modyfikować w zależności od obrazu klinicznego oraz możliwości i doświadczeń poszczególnych ośrodków (tab. V) [31].

Piśmiennictwo

1. Stewart PM. The adrenal cortex. W: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS (red.). Williams Textbook of Endocrinology. Saunders, Philadelphia 2002; 491–551.
2. Aron DC, Findling JW, Tyrrell JB. Glukokortykosteroidy i androgeny nadnerczowe. W: Greenspan FS, Gardner DG (red.). Endokrynologia ogólna i kliniczna. Czelej, Lublin 2004; 363–407.
3. Yanovski JA, Cutler Jr GB. Glucocorticoid action and the clinical features of Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1994; 23: 487–509.
4. Newell-Price J, Trainer P, Besser M i wsp. The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states. *Endocr Rev* 1998; 19: 647–672.
5. Carney JA, Gordon H, Carpenter PC i wsp. The complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity. *Medicine (Baltimore)* 1985; 64: 270–283.
6. Stratakis CA, Carney JA, Lin JP i wsp. Carney complex, a familial multiple neoplasia and lentiginosis syndrome. Analysis of 11 kindreds and linkage to the short arm of chromosome 2. *J Clin Invest* 1996; 97: 699–705.
7. Casey M, Mah C, Merliss AD i wsp. Identification of a novel genetic locus for familial cardiac myxomas and Carney complex. *Circulation* 1998; 98: 2560–2566.
8. Kirschner LS, Carney JA, Pack S i wsp. Mutations of the gene encoding the protein kinase A Type 1- α regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nat Genet* 2000; 26: 89–92.
9. Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV i wsp. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N Engl J Med* 1991; 325: 1688–1695.
10. Boston BA, Mandel S, LaFranchi S i wsp. Activating mutation in the stimulatory guanine nucleotide-binding protein in an infant with Cushing's syndrome and nodular adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 890–893.
11. Lieberman SA, Eccleshall TR, Feldman D. ACTH-independent massive bilateral adrenal disease (AIMBAD): a subtype of Cushing's syndrome with major diagnostic and therapeutic implications. *Eur J Endocrinol* 1994; 131: 67–73.
12. Stratakis CA, Kirschner LS. Clinical and genetic analysis of primary bilateral adrenal diseases (micro- and macronodular disease) leading to Cushing syndrome. *Horm Metab Res* 1998; 30: 456–463.
13. Malchoff CD, Rosa J, DeBold CR i wsp. Adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia: an unusual cause of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68: 855–860.
14. Doppman JL, Miller DL, Dwyer AJ i wsp. Macronodular adrenal hyperplasia in Cushing disease. *Radiology* 1988; 166: 347–352.
15. Doppman JL, Nieman LK, Travis WD i wsp. CT and MR imaging of massive macronodular adrenocortical disease: a rare cause of autonomous primary adrenal hypercortisolism. *J Comput Assist Tomogr* 1991; 15: 773–779.
16. Findlay JC, Sheeler LR, England WC i wsp. Familial adrenocorticotropin-independent Cushing's syndrome with bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 189–191.
17. Minami S, Sugihara H, Sato J i wsp. ACTH-independent Cushing's syndrome occurring in siblings. *Clin Endocrinol* 1996; 44: 483–488.
18. Cooper RJ, Udelsman R, Resta C i wsp. Familial Cushing's syndrome secondary to bilateral macronodular hyperplasia. Program and Abstracts of The 80th Annual Meeting of The Endocrine Society, New Orleans, LA, 1998 (Abstract P2–397), p. 333.
19. Grunenberger F, Noal E, Bachelier P i wsp. Hypercorticisme familial non ACTH dépendant par hyperplasie macronodulaire bilatérale des surrénales. *Ann Endocrinol (Paris)* 1999; 60: 290 (Abstract A04).
20. Fragoso MCB, Latronico AC, Domenice S i wsp. Activation mutation in the stimulatory guanine nucleotide-binding protein in a woman with Cushing's syndrome by ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. Program and Abstracts of The 81st Annual Meeting of The Endocrine Society, San Diego, CA, 1999 (Abstract P2–150), p. 312.
21. Lacroix A, N' diaye N, Tremblay J i wsp. Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endocr Rev* 2001; 22: 75–110.
22. Hamet P, Larochelle P, Franks DJ i wsp. Cushing syndrome with food-dependent periodic hormonogenesis. *Clin Invest Med* 1987; 10: 530–533.
23. Lacroix A, Bolte E, Tremblay J i wsp. Gastric inhibitory polypeptide-dependent Cortisol hypersecretion — a new cause of Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 1992; 327: 974–980.
24. Reznik Y, Allali-Zerah V, Chayvialle JA i wsp. Food-dependent Cushing's syndrome mediated by aberrant adrenal sensitivity to gastric inhibitory polypeptide. *N Engl J Med* 1992; 327: 981–986.
25. Marieb NJ, Spangler S, Kashgarian M i wsp. Cushing's syndrome secondary to ectopic Cortisol production by an ovarian carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57: 737–740.
26. Newfield RS, Kalaitzoglou G, Licholai T i wsp. Normocortisolemic Cushing's syndrome initially presenting with increased glucocorticoid receptor numbers. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 14–21.
27. Gold PW, Loriaux DL, Roy A i wsp. Responses to corticotrophin-releasing hormone in the hypercortisolism of depression and Cushing's disease. Pathophysiologic and diagnostic implications. *N Engl J Med* 1986; 314: 1329–1335.
28. Colao A, Pivonello R, Spiezia S i wsp. Persistence of increased cardiovascular risk in patients with Cushing's disease after five years of successful cure. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2664–2672.
29. Orth DN. Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 1995; 332: 791–803.
30. Boscaro M, Barzon L, Fallo F i wsp. Cushing's syndrome. *Lancet* 2001; 357: 783–791.
31. Araldi G, Angeli A, Atkison AB i wsp. Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5593–5602.
32. Ross EJ, Linch DC. Cushing's syndrome-killing disease: discriminatory value of signs and symptoms aiding early diagnosis. *Lancet* 1982; 2: 646–649.
33. Urbanic RC, George JM. Cushing's disease: 18 years' experience. *Medicine* 1981; 60: 14–24.
34. Ferguson JK, Donald RA, Weston TS i wsp. Skin thickness in patients with acromegaly and Cushing's syndrome and response to treatment. *Clin Endocrinol* 1983; 18: 347–353.
35. Stewart PM, Walker BR, Holder G i wsp. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase activity in Cushing's syndrome: explaining the mineralocorticoid excess state of the ectopic adrenocorticotropin syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 3617–3620.
36. Bertagna C, Orth DN. Clinical and laboratory findings and results of therapy in 58 patients with adrenocortical tumors admitted to a single medical center (1951–1978). *Am J Med* 1981; 71: 855–875.

37. Bailey RE. Periodic hormonogenesis — a new phenomenon. Periodicity in function of a hormone-producing tumor in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1971; 32: 317–327.
38. Brown RD, Van Loon GR, Orth DN i wsp. Cushing's disease with periodic hormonogenesis: one explanation for paradoxical response to dexamethasone. *J Clin Endocrinol Metab* 1973; 36: 445–451.
39. Jordan RM, Ramos-Gabatin A, Kendall JW i wsp. Dynamics of adrenocorticotropin (ACTH) secretion in cyclic Cushing's syndrome: evidence for more than one abnormal ACTH biorhythm. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 55: 531–537.
40. Atkinson AB, Kennedy AL, Carson DJ i wsp. Five cases of cyclical Cushing's syndrome. *Br Med J Clin Res Ed* 1985; 291: 1453–1457.
41. Kuchel O, Bolte E, Chretien M i wsp. Cyclical edema and hypokalemia due to occult episodic hypercorticism. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64: 170–174.
42. Atkinson AB, McCance DR, Kennedy L i wsp. Cyclical Cushing's syndrome first diagnosed after pituitary surgery: a trap for the unwary. *Clin Endocrinol* 1992; 36: 297–299.
43. Murphy BE. Clinical evaluation of urinary cortisol determinations by competitive protein-binding radioassay. *J Clin Endocrinol Metab* 1968; 28: 343–348.
44. Mengden T, Hubmann P, Muller J i wsp. Urinary free cortisol versus 17-hydroxycorticosteroids: a comparative study of their diagnostic value in Cushing's syndrome. *Clin Investig* 1992; 70: 545–548.
45. Vila R, Granada ML, Guitierrez RM i wsp. Urinary free cortisol excretion pattern in morbid obese women. *Endocr Res* 2001; 27: 261–268.
46. Carroll BJ, Curtis GC, Davies BM i wsp. Urinary free cortisol excretion in depression. *Psychol Med* 1976; 6: 43–50.
47. Yanovski JA, Cutler GB Jr, Chrousos GP i wsp. Corticotropin-releasing hormone stimulation following low-dose dexamethasone administration. A new test to distinguish Cushing's syndrome from pseudo-Cushing's states. *JAMA* 1993; 269: 2232–2238.
48. Turpeinen U, Markkanen H, Valimaki M i wsp. Determination of urinary free Cortisol by HPLC. *Clin Chem* 1997; 43: 1386–1391.
49. Nieman LK, Cutler GB Jr. The sensitivity of the urine free cortisol measurement as a screening test for Cushing's syndrome. Program of the 72nd Annual Meeting of The Endocrine Society, Atlanta, GA, 1990 (Abstract P-822), p. 111.
50. Crapo L. Cushing's syndrome: a review of diagnostic tests. *Metabolism* 1979; 28: 955–977.
51. Invitti C, Giraldi FP, Martin M i wsp. Diagnosis and management of Cushing's syndrome: results of an Italian multicentre study. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 440–448.
52. Nugent CA, Nichols T, Tyler FH. Diagnosis of Cushing's syndrome-single dose dexamethasone suppression test. *Arch Intern Med* 1965; 116: 172–176.
53. Wood PJ, Barth JH, Freedman DB i wsp. Evidence for the low dose dexamethasone suppression test to screen for Cushing's syndrome — recommendations for a protocol for biochemistry laboratories. *Ann Clin Biochem* 1997; 34: 222–229.
54. Findling JW, Raff H. Newer diagnostic techniques and problems in Cushing's disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999; 28: 191–210.
55. Shimizu N, Yoshida H. Studies on the "low dose" suppressible Cushing's disease. *Endocrinol Jpn* 1976; 23: 479–484.
56. McHardy-Young S, Harris PW, Lessof MH i wsp. Single dose dexamethasone suppression test for Cushing's Syndrome. *Br Med J* 1967; 2: 740–744.
57. Seidensticker JF, Folk RL, Wieland RG i wsp. Screening test for Cushing's syndrome with plasma 11-hydroxycorticosteroids. *JAMA* 1967; 202: 87–90.
58. Odagiri E, Demura R, Demura H i wsp. The changes in plasma cortisol and urinary free cortisol by an overnight dexamethasone suppression test in patients with Cushing's disease. *Endocrinol Jpn* 1988; 35: 795–802.
59. Meikle AW. Dexamethasone suppression tests: usefulness of simultaneous measurement of plasma cortisol and dexamethasone. *Clin Endocrinol* 1982; 16: 401–408.
60. Putignano P, Kaltsas GA, Satta MA i wsp. The effects of anti-convulsant drugs on adrenal function. *Horm Metab Res* 1998; 30: 389–397.
61. Holleman F, Ender E, Prummel MF i wsp. Evaluation of endocrine tests. B: screening for hypercortisolism. *Neth J Med* 2005; 63: 348–353.
62. Papanicolaou DA, Mullen N, Kyrou I i wsp. Nighttime salivary Cortisol: a useful test for the diagnosis of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4515–4521.
63. Liddle GW. Tests of pituitary-adrenal suppressability in the diagnosis of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1960; 20: 1539–1560.
64. Doe RP, Vennes JA, Flink FB. Diurnal variation of 17-hydroxycorticosteroids, sodium, potassium, magnesium, and creatinine in normal subjects and in cases of treated adrenal insufficiency and Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1960; 30: 253–265.
65. Krieger DT, Allen W, Rizzo F i wsp. Characterization of the normal temporal pattern of plasma corticosteroid levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1971; 32: 266–284.
66. Sederberg-Olsen P, Binder C, Kehlet H i wsp. Episodic variation in plasma corticosteroids in subjects with Cushing's syndrome of differing etiology. *J Clin Endocrinol Metab* 1973; 36: 906–910.
67. Hagen C, Kehlet H, Binder C. Diurnal variation in plasma Cortisol and prolactin in patients with Cushing's syndrome. *Acta Endocrinol* 1978; 88: 737–743.
68. Boyar RM, Witkin M, Carruth A i wsp. Circadian cortisol secretory rhythms in Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 48: 760–765.
69. Newell-Price J, Trainer P, Perry L i wsp. Single sleeping midnight cortisol has 100% sensitivity for the diagnosis of Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol* 1995; 43: 545–550.
70. Papanicolaou DA, Yanovski JA, Cutler Jr GB i wsp. A single midnight serum cortisol measurement distinguishes Cushing's syndrome from pseudo-Cushing states. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1163–1167.
71. Stewart PM, Gibson S, Crosby SR i wsp. ACTH precursors characterize the ectopic ACTH syndrome. *Clin Endocrinol* 1994; 40: 199–204.
72. White A, Gibson S. ACTH precursors: biological significance and clinical relevance. *Clin Endocrinol* 1998; 48: 251–255.
73. Raffin-Sanson ML, Massias JF, Dumont C i wsp. High plasma proopiomelanocortin in aggressive adrenocorticotropin-secreting tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 4272–4277.
74. Findling JW, Doppman JL. Biochemical and radiological diagnosis of Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1994; 23: 511–537.
75. Carey RM, Varma SK, Drake CR Jr i wsp. Ectopic secretion of corticotrophin-releasing factor as a cause of Cushing's syndrome: a clinical morphologic, and biochemical study. *N Engl J Med* 1984; 311: 13–20.
76. Aron DC, Raff H, Findling JW. Effectiveness versus efficacy: the limited value in clinical practice of high dose dexamethasone suppression testing in the differential diagnosis of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1780–1785.
77. Croughs RJ, Docter R, de Jong FH. Comparison of oral and intravenous dexamethasone suppression tests in the differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Acta Endocrinol* 1973; 72: 54–62.
78. Biemond P, de Jong FH, Lamberts SW. Continuous dexamethasone infusion for seven hours in patients with the Cushing syndrome. A superior differential diagnostic test. *Ann Intern Med* 1990; 112: 738–742.
79. van den Bogaert DP, de Herder WW, de Jong FH i wsp. The continuous 7-hour intravenous dexamethasone suppression

- test in the differential diagnosis of ACTH-dependent Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol* 1999; 51: 193–198.
80. Vale W, Spiess J, Rivier C i wsp. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 1981; 213: 1394–1397.
 81. Shibahara S, Morimoto Y, Furutani Y i wsp. Isolation and sequence analysis of the human corticotrophin-releasing factor precursor gene. *EMBO J* 1983; 2: 775–779.
 82. Trainer PJ, Faria M, Newell-Price J i wsp. A comparison of the effects of human and ovine corticotrophin-releasing hormone on the pituitary-adrenal axis. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 412–417.
 83. Kaye TB, Crapo L. The Cushing syndrome: an update on diagnostic tests. *Ann Intern Med* 1990; 112: 434–444.
 84. Nieman LK, Oldfield EH, Wesley R i wsp. A simplified morning ovine corticotrophin-releasing hormone stimulation test for the differential diagnosis of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1308–1312.
 85. Newell-Price J, Morris DG, Drake WM i wsp. Optimal response criteria for the human CRH test in the differential diagnosis of ACTH-dependent Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1640–1645.
 86. Nieman LK, Cutler GB Jr, Oldfield EH i wsp. The ovine corticotropin-releasing hormone (CRH) stimulation test is superior to the human CRH stimulation test for the diagnosis of Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69: 165–169.
 87. Trainer PJ, Woods RJ, Korbonits M i wsp. The pathophysiology of circulating corticotrophin-releasing hormone-binding protein levels in the human. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1611–1614.
 88. Avgerinos PC, Yanovski JA, Oldfield EH i wsp. The metyrapone and dexamethasone suppression tests for the differential diagnosis of the adrenocorticotropin-dependent Cushing syndrome: a comparison. *Ann Intern Med* 1994; 121: 318–327.
 89. Landon J, James VH, Stoker DJ. Plasma-cortisol response to lysine-vasopressin. Comparison with other tests of human pituitary-adrenocortical function. *Lancet* 1965; 2: 1156–1159.
 90. Croughs RJ. Use of lysine-vasopressin in the differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Acta Endocrinol* 1970; 65: 595–607.
 91. Webb-Peploe MM, Spathis GS, Reed PI. Cushing's syndrome: use of lysine vasopressin to distinguish overproduction of corticotrophin by pituitary from other causes of adrenal cortical hyperfunction. *Lancet* 1967; 1: 195–197.
 92. Tucci JR, Espiner EA, Jagger PI i wsp. Vasopressin in the evaluation of pituitary-adrenal function. *Ann Intern Med* 1968; 69: 191–202.
 93. Bethge H, Bayer JM, Winkelmann W. Diagnosis of Cushing's syndrome. The differentiation between adrenocortical hyperplasia and adrenocortical adenoma by means of lysine-vasopressin. *Acta Endocrinol* 1969; 60: 47–59.
 94. Coslovsky R, Wajchenberg BL, Nogueira O. Hyperresponsiveness to lysine-vasopressin in Cushing's disease. *Acta Endocrinol* 1974; 75: 125–132.
 95. Krieger DT, Luria M. Plasma ACTH and cortisol responses to TRF, vasopressin or hypoglycemia in Cushing's disease and Nelson's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; 44: 361–368.
 96. Raux MC, Binoux M, Luton JP i wsp. Studies of ACTH secretion control in 116 cases of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1975; 40: 186–197.
 97. Tabarin A, San Galli F, Dezou S i wsp. The corticotropin-releasing factor test in the differential diagnosis of Cushing's syndrome: a comparison with the lysine-vasopressin test. *Acta Endocrinol* 1990; 123: 331–338.
 98. Catania A, Cantalamessa L, Orsatti A i wsp. Plasma ACTH-response to the corticotropin releasing factor in patients with Cushing's disease. Comparison with the lysine-vasopressin test. *Metabolism* 1984; 33: 478–481.
 99. Tsagarakis S, Tsigos C, Vasilou V i wsp. The desmopressin and combined CRH-desmopressin tests in the differential diagnosis of ACTH-dependent Cushing's syndrome: constraints imposed by the expression of V2 vasopressin receptors in tumors with ectopic ACTH secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1646–1653.
 100. Arvat E, Giordano R, Ramunni J i wsp. Adrenocorticotropin and cortisol hyperresponsiveness to hexarelin in patients with Cushing's disease bearing a pituitary microadenoma, but not in those with macroadenoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 4207–4211.
 101. Batista D, Courkoutsakis NA, Oldfield EH i wsp. Detection of adrenocorticotropin-secreting pituitary adenomas by magnetic resonance imaging in children and adolescents with Cushing disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5134–5140.
 102. Lamberts SW, de Herder WW, Krenning EP i wsp. A role of (labeled) somatostatin analogs in the differential diagnosis and treatment of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 17–19.
 103. Korobkin M, Francis IR. Adrenal imaging. *Semin Ultrasound CT MR* 1995; 16: 317–330.
 104. Gross MD, Rubello D, Shapiro B. Is there a future for adrenal scintigraphy? *Nucl Med Commun* 2002; 23: 197–202.
 105. Rubello D, Bui C, Casara D i wsp. Functional scintigraphy of the adrenal gland. *Eur J Endocrinol* 2002; 147: 13–28.
 106. Bastounis EA, Karayiannakis AJ, Anapliotou ML i wsp. Incidentalomas of the adrenal gland: diagnostic and therapeutic implications. *Am Surg* 1997; 63: 356–360.
 107. Szolar DH, Kammerhuber F. Quantitative CT evaluation of adrenal gland masses: a step forward in the differentiation between adenomas and nonadenomas? *Radiology* 1997; 202: 517–521.
 108. McNicholas MM, Lee MJ, Mayo-Smith WW i wsp. An imaging algorithm for the differential diagnosis of adrenal adenomas and metastases. *AJR Am J Roentgenol* 1995; 165: 1453–1459.
 109. Korobkin M, Brodeur FJ, Francis IR i wsp. Delayed enhanced CT for differentiation of benign from malignant adrenal masses. *Radiology* 1996; 200: 737–742.
 110. Alolio B, Hahner S, Weismann D i wsp. Management of adrenocortical carcinoma. *Clin Endocrinol* 2004; 60: 273–287.
 111. Bilbey JH, McLoughlin RF, Kurkjian PS i wsp. MR imaging of adrenal masses: value of chemical-shift imaging for distinguishing adenomas from other tumors. *AJR Am J Roentgenol* 1995; 164: 637–642.
 112. Schwartz LH, Panicek DM, Doyle MV i wsp. Comparison of two algorithms and their associated charges when evaluating adrenal masses in patients with malignancies. *AJR Am J Roentgenol* 1997; 168: 1575–1578.
 113. Hönigschnabl S, Gallo S, Niederle B i wsp. How accurate is MR imaging in characterisation of adrenal masses: update of a long-term study. *Eur J Radiol* 2002; 41: 113–122.
 114. Oldfield EH, Doppman JL, Nieman LK i wsp. Petrosal sinus sampling with and without corticotropin-releasing hormone for the differential diagnosis of Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 1991; 325: 897–905.