



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

ADRENAL İNSİDENTALOMA JAK2 V617F MUTASYON İLİŞKİSİ

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

UZ.DR. MUSTAFA ÜNÜBOL

DANIŞMAN
Prof. Dr. Engin GÜNEY

AYDIN-2012

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

ADRENAL İNSİDENTALOMA JAK2 V617F MUTASYON İLİŞKİSİ

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

UZ. DR. MUSTAFA ÜNÜBOL

DANIŞMAN
Prof. Dr. Engin GÜNEY

AYDIN-2012

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Eğitimim süresince bilgi, birikim ve deneyimlerinden en üst düzeyde yararlandığım, yetişmemde çok büyük emeği olan, desteğe ihtiyaç duyduğum her anda hep yanımda olan, Endokrinolojiyi sevmem ve seçmemde çok büyük rolü ve katkıları olan, kendime örnek aldığım, değerli büyüğüm, hocam Sayın Prof.Dr. Engin Güney'e,

Bilgi ve tecrübelerini bizlerle paylaşan, kendisinden mesleki açıdan yararlanma olanağı bulduğum, eğitimime değerli katkıları olan Sayın Yrd.Doç.Dr.Mediha Ayhan'a

Bilgi ve deneyimleriyle her zaman bana yol gösteren, desteğini ve yardımlarını her alanda hep hissettiğim, çalışma disiplini ve enerjisini hep örnek aldığım, değerli ağabeyim Sayın Doç.Dr.İrfan Yavaşoğlu'na,

Uzmanlık eğitimim süresince eğitimimde büyük katkı ve emekleri olan değerli hocalarımla, İç hastalıkları Anabilim Dalı başkanı Sayın Prof.Dr.Gürhan Kadıköylü nezdinde tüm İç hastalıkları öğretim üyesi hocalarıma,

Tezimde büyük emekleri olan İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Bilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Yusuf Baran'a ve ekibine,

Çalışmalarında desteğini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. İmran Kurt Ömürlü'ye,

Berber çalışmaktan mutluluk duyduğum, İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda görevli tüm değerli yan dal ve uzmanlık araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Ve tabii ki, hayatımın her anını umut, sevgi ve mutlulukla yaşamamı sağlayan canlarım Ayşe'me ve Ayşenaz'ıma teşekkür ederim.

Dr. Mustafa ÜNÜBOL

Aydın, 2012

İÇİNDEKİLER

Sayfa Numarası

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO DİZİNİ	iv
ŞEKİL DİZİNİ	iv
RESİM DİZİNİ	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	v
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1 Adrenal Bezlerin anatomi ve histolojisi	2
2.2 Adrenal İnsidentaloma	2
2.2.1 İnsidans ve Prevelans	3
2.2.2 Etiyoloji	3
2.2.3 Adrenal İnsidentaloma Değerlendirmesi	9
2.2.4 Adrenal İnsidentaloma İzlemi	18
2.2.5 Adrenal İnsidentaloma Cerrahisi	21
2.3 JAK2 V617F gen mutasyonu	22
2.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu	24
2.4.1 Polimeraz zincir reaksiyonu tekniği	24
2.4.2 Primerler	24
2.4.3 Polimeraz zincir reaksiyonu evreleri	25
2.4.4 Amplifikasyon ürünlerinin elde edilmesi	25
3.GEREÇ ve YÖNTEM	26
3.1. Hasta Grubu Seçimi	26
3.2. Çalışma Protokolü ve Testler	27
3.3. İstatistiksel analiz	
4. BULGULAR	30
5. TARTIŞMA	35
6. SONUÇLAR	41
7. ÖZET	42
8. İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY)	43
9. KAYNAKLAR	44

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Adrenal insidentaloma nedenleri	4
Tablo 2. Adrenal insidentalomalı hastaların fonksiyonel değerlendirme sonuçları	31
Tablo 3. Adrenal insidentalomalı hastalarda DM ve hipertansiyon sıklığı	32
Tablo 4. Gruplar arasında hematolojik parametrelerin karşılaştırılması	34
Tablo 5. Gruplar arasında lipid parametrelerinin ve glukoz düzeyinin karşılaştırılması	35

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Terzolo ve ark.nın 2009 yılında yayınlanan adrenal insidentaloma yönetimi	20
Şekil 2. Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün (NIH) 2002 yılında yayınlanan uzlaşma raporuna ve 2012'de yayınlanan adrenal insidentaloma kılavuzuna göre algoritm	21
Şekil 3. Cinsiyet dağılımı	30
Şekil 4. Adrenal insidentalomalı hastaların fonksiyon durum grafiği	31
Şekil 5. Opere edilen adrenal insidentalomaların patoloji sonuçlarının dağılımı	32

RESİM DİZİNİ

Resim 1. JAK2 V617F'nin PCR/RFLP yöntemi ile değerlendirilmesi	29
Resim 2. Real time PCR ile erime eğrisi analizi ve genotiplendirme (JAK2 V617F mutasyon heterozigot pozitif)	33

KISALTMALAR DİZİNİ

BT	Bilgisayarlı tomografi
JAK2	Janus Kinaz 2
STAT	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
ACTH	Adrenokortikotropik hormon
MEN	Multiple endokrin neoplazi
DM	Diabetes mellitus
MRG	Magnetik rezonans görüntüleme
PA	Primer aldosteronizm
PRA	Plazma renin aktivitesi
HÜ	Hounsfield Ünit
PET	Pozitron emisyon tomografisi
FDG	Fluorodeoksiglukoz
USG	Ultrasonografi
I	İyodin
MIBG	Metaiodobenzilguanidine
İİAB	İnce iğne aspirasyon biyopsisi
NIH	Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institutes of Health)
DHEAS	Dehidroepiandrosteronsülfat
CRH	Kortikotropin salıcı hormon
VMA	Vanilil-mandelik asit
NaCl	Sodyum Klorür
PV	Polistemia Vera
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR)
UV	Ultraviyole
VKİ	Vücut kitle indeksi
CGH	Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon
Et-Br	Etidyum Bromid
StAR	Steroidojenik akut düzenleyici protein

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Görüntüleme yöntemlerinin yaygın olarak kullanılması ile birlikte, insidentaloma adı verilen, klinik olarak belirgin olmayan adrenal kitlelere sık rastlanılmaya başlanılmıştır. Tesadüfen saptanan adrenal kitlelerin sıklığı, otopsi serilerinde %6 (%1-32) olarak bulunmuştur. Adrenal dışı herhangi bir nedenle çekilen abdominal bilgisayarlı tomografilerde (BT) prevalansı %2-7 olarak bulunmuştur (1-4). Adrenal insidentaloma etiyopatogenezini araştırmak üzere yapılmış çalışmalar mevcuttur. Ancak tam olarak nedenleri ortaya konulamamıştır (5-7).

Janus Kinaz 2 (JAK2) ilk kez 2005 yılında dört farklı çalışma grubunun birbirinden bağımsız olarak yaptığı çalışmalarda tanımlanmıştır (8-11). JAK2 17. kromozom üzerinde 617. pozisyonda valin-fenilalanin (V617F) somatik tek nokta mutasyonunu göstermişlerdir. JAK2 V617F mutasyonu, JAK2'deki bir guaninin timidine yer değiştirmesidir JAK2'nin kodon 617'sinde valinin fenilalanine yer değiştirmesi ile sonuçlanır (12). JAK2, fosfoinozitol-3 kinazı, Ras'ı, MAP kinazı ve transkripsiyonu aktive eden sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatör (STAT) proteinlerini aktive etmektedir. Konstitütif aktivasyon, hücre proliferasyonuna ve apoptozun disregüle olmasına yol açmaktadır (13). JAK2'de mutasyon kazanılması miyeloproliferatif hastalık spektrumunda gözlemlenmektedir (14). JAK2 V617F mutasyonunun diğer hematolojik malignitelere veya hematolojik olmayan tümörlere katkıda bulunup bulunmadığı konusunda çeşitli çalışmalar mevcuttur (15). Uygunsuz JAK sinyalizasyonu çeşitli solid tümörlerin hayatta kalmasını ve hücre proliferasyonuna neden olmaktadır (16). Solid tümör hücre dizisinde STAT3 aktivasyon aracılıklı JAK ailesi kinazların merkezi bir rolü olduğu düşünülmektedir. STAT3 ve STAT5'in kalıcı aktivasyonu, solid ve hemaolojik tümörlerde, tümör hücre proliferasyonu, hayatta kalma, metastaz ve tümör destekli inflamasyonda artışa neden olmaktadır (17).

Pekçok hematolojik ve solid tümör etiyopatogenezinde saptanan düzensiz JAK sinyalizasyonu, literatür taramamızda adrenal tümörlerde daha önce araştırılmamıştır. JAK2 mutasyonunun saptanması hedeflenmiş moleküler tedavi açısından müdahale noktası olabilecektir. Bu nedenle benign adrenal tümör olan adrenal insidentalomaların etiyojisinde daha önce araştırılmayan JAK2 V617F mutasyonun araştırılması amaçlanmıştır. Yapacağımız çalışmayla, adrenal insidentaloma JAK2 V617F mutasyonu ilişkisi literatürde ilk kez tanımlanmış olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Adrenal Bezlerin anatomi ve histolojisi

Adrenal bezler her iki böbreğin üst iç bölümünde, retroperitoneal alanda yer almaktadır. Her ikisinin toplam ağırlığı 8-10 gramdır. Fibröz bir kapsülle çevrilidir. Korteks ve medulla olmak üzere 2 bölümden oluşur. Adrenal korteks, bezin %90'ını oluştururken, %10'u ise iç bölümde yer alan adrenal medulladır. Adrenal korteks, zona glomeruloza, zona fasikülata ve zona retikularis tabakaları içermektedir. Zona glomeruloza adrenal korteksin yaklaşık %15'ini kapsar, aldosteron üretiminden sorumludur. Bu tabakada 17 α -hidroksilaz aktivitesi olmadığından kortizol ve androjen üretimi olmaz. Zona fasikülata en kalın tabakadır, korteksin yaklaşık %75'ini oluşturur. Zona fasikülata ve zona retikularis tabakaları tek bir birim gibi faaliyet gösterir. Bu tabakalar 17 α -hidroksilaz aktivitesine sahiptirler. Bu sebeple glukokortikoidler, androjen ve östrojen hormonlarını üretilir. Buna karşın 11 β -hidroksilaz aktivitesi olmadığı için deoksikortikosteron, kortikosteron ve aldosterona dönüştürülemez. Adrenal medullada ise katekolaminlerin sentezi yapılır (18).

2.2. Adrenal İnsidentaloma

Adrenal insidentaloma, görüntüleme yöntemleri ile tesadüfen saptanan adrenal kitlelere denilmektedir. Adrenal insidentaloma diyebilmek için, görüntüleme yöntemlerinin adrenal bezle ilişkilendirilmeyen belirti ve bulgu nedeniyle istenmesi, olgunun bilinen bir malignitesinin olmaması ve adrenal kitle lezyon çapının 1 cm'den büyük olması gerekmektedir. Görüntüleme yöntemlerinin sık kullanılmaya başlaması ile sıklığı giderek artmaktadır (19).

Adrenal insidentalomaların en önemli bölümünü korteksten kaynaklanan adenomlar oluşturmaktadır. Adrenokortikal kanser ve metastazlar daha nadir görülmektedir (1). Adrenal insidentaloma saptanan bir hastada, kitlenin malign olup olmadığı ve hormonal olarak aktivitesi olup olmadığı araştırılmalıdır. Klinik, laboratuvar ve radyolojik olarak değerlendirilmeleri gerekmektedir. Bu değerlendirmeler sonucu takip ve tedavisi planlanmaktadır (4,18).

2.2.1. İnsidans ve Prevelans

Adrenal insidentaloma sıklığı, 25 serinin değerlendirildiği toplam 87065 otopsinin incelendiği bir metaanalizde %6 (%1-32) olarak bulunmuştur. Adrenal dışı herhangi bir nedenle çekilen abdominal BT'deki prevalansı %2-7 olarak bildirilmiştir (1-4). Mayo kliniğinin serisinde, 1985 ile 1990 yılları arasında çekilen 61054 abdominal BT'deki prevelansı %3.4 olarak saptanmıştır (2). Son yıllarda yapılan farklı bir çalışmada yüksek çözünürlüklü abdominal BT'deki prevelansı %4.4 olarak bildirilmiştir (3). Genel sağlıklı popülasyonda ultrasonografi

(USG) ile adrenal insidentaloma taramasında prevelansı %0.1 iken endokrinolojik olmayan şikayetlerle değerlendirilen hastaların %0.4-2.9'unda adrenal insidentaloma saptanmıştır. Bilinen primer bir kanser hastalığı olan hastalarda ise prevelansı daha yüksek olup %4.4 olarak bulunmuştur (4).

Prevelansı yaşla birlikte artmaktadır. Özellikle otopsi serilerinde 5. ve 7. dekat arasında pik yapmaktadır (20). Otopsilerde 70 yaş ve üzeri yaklaşık %7 oranında görülürken, 30 yaş altı hastalarda %1'den daha az oranında saptanmıştır (21).

Adrenal kitleler hastaların %50-60'ında sağ adrenal bezde, %30-40'ında sol adrenal bezde ve %10-15 bilateral olarak görülür. Kadınlar ve erkeklerde benzer oranda görülmektedir (1).

2.2.2. Etiyoloji

Adrenal insidentalomaları, adrenal korteks ve medulladan kaynaklanan benign ve malign tümörler, metastazlar, bazı infiltratif hastalıklar, adrenal beze komşu yapılardan (böbrek, pankreas, dalak, vasküler) kaynaklanan bazı oluşumlar (psödoadrenal kitleler) oluşturmaktadır. Adrenal insidentaloma nedenleri Tablo I. de verilmiştir (22).

1991-2007 yılları arasında yayınlanan, 70'i Türkiye'den 1804 adrenal insidentaloma olgusunu içeren dokuz çalışmada maligniteye %1.9, metastaza %0.7 oranında rastlanılmıştır. Benign olgular, olguların %97.4'ünü oluşturmaktadır. Bunların %89.7'si fonksiyonel olmayan adenomlar olup, %6.4'ü subklinik cushing sendromu, %3.1'i feokromositoma, %0.6'sı aldosteronomadır (23).

Bilateral adrenal insidentalomaların etiyolojisinde ise, öncelikli olarak metastatik hastalıklar, konjenital adrenal hiperplazi, lenfoma, fungal enfeksiyonlar, tüberküloz, hemoraji, adrenokortikotropik hormon (ACTH) bağımlı cushing sendromu, feokromositoma, amiloidoz ve adrenal bezi etkileyen infiltratif lezyonlar bulunmaktadır (4).

Çok nadir olarak bazı genetik sendromlar adrenokortikal tümör olarak ortaya çıkabilmektedir. Beckwith–Wiedemann sendromu, Li–Fraumeni sendromu, multipl endokrin neoplazi (MEN) 1, Carney kompleksi ve McCune–Albright sendromu adrenokortikal tümöre neden olabilmektedir (4,22). Feokromositoma ile ilişkili MEN 2 (2A, 2B), Von Hippel–Lindau hastalığı ve nörofibromatozis tip 1 de adrenomedüller tümör nedenleri arasında yer almaktadır (4,24).

Tablo I. Adrenal insidentaloma nedenleri

1. Adrenal korteks tümörleri	Adenom (<i>Benign fonksiyone olmayan adenom, Subklinik Cushing sendromu, Aldosteronoma</i>) Nodüler hiperplazi Karsinom
2. Adrenal medulla tümörleri	Feokromositoma Ganglionöroma- Ganglionöroblastoma
3. Diğer adrenal tümörler	Anjiomiyolipom-Miyelolipom Metastazlar Nörofibrom- Hamartom- Teratom Ksantom- Hemanjiomlar Lipom- Liposarkom
4. Enfeksiyonlar, granülomlar, infiltratif hastalıklar	Abse Amiloidoz Fungal enfeksiyonlar Histoplazmozis Tüberkülozis Blastomiçes Koksoidomikozis Sarkoidoz Sitomegalovirüs
5. Adrenal dışı (Psödoadrenal) kitleler	Splenik-Renal-Pankreatik lezyonlar Vasküler lezyonlar (anevrizma, tortiyoz splenik ven) Teknik artefaktlar
6. Kist ve psödokistler	Parazitik Endotelyal Dejeneratif adenomlar
7. Konjenital adrenal hiperplazi	
8. Hemorajiler	

2.2.2.1 Fonksiyone Olmayan Benign Adenomlar

Onkolojik hasta grubu dışındaki genel hasta popülasyonundaki prevalansı büyük ölçüde değişmekle birlikte, tüm sürrenal insidentalomların %70 ile 94'ünü oluşturmaktadır (1,23,25-27). Fonksiyone olmayan benign adenomların klinik önemi bilinmemekle birlikte, son dönemde kardiyovasküler hastalık riskini artırdığı yönünde çeşitli çalışmalar mevcuttur. Fonksiyonel olmayan benign adenomlara sahip hastalarda, metabolik sendrom bulgularının, metabolik bozuklukların ve insülin direncinin daha sık olduğu gösterilmiştir (1,21,26,28). Çok merkezli bir çalışmada, adrenal insidentalomalı 1004 hasta değerlendirilmiş, hastaların %41'inde arteriyel hipertansiyon, %10'unda tip 2 diabetes mellitus (DM), %28'inde obezite saptanmıştır (1). Fonksiyonel olmayan benign adenomu olan hastalarda, bozulmuş glukoz toleransının ya da daha önce bilinmeyen tip 2 DM'un, artmış visseral yağ kütlesinin ve hiperinsülineminin sık olarak görüldüğü bildirilmiştir (29,30). İnsülin direnci varlığı, olası hafif kortizol otonomisi ile ilişkilendirilmiştir. Bu durumun, kardiyovasküler hastalık riskinde artışa yol açtığı düşünülmektedir (28). Reincke ve arkadaşları (31) ilk olarak 13 fonksiyonel olmayan adrenal insidentalomalı hastada insülin direnci ve hiperinsülinizm saptamıştır. Deneyisel modelde, kortizol sentezi üzerine herhangi bir etki olmaksızın, insülinin adrenal korteks hücrelerinde proliferatif etkisi olabileceğini öne sürmüştür. Terzolo ve arkadaşlarının (28) çalışmasında subklinik Cushing sendromlu hastalarda arteriyel hipertansiyon, obezite, bozulmuş glukoz toleransı ve dislipidemi riski olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada, subklinik Cushing sendromlu hastalar ile fonksiyonel olmayan adrenal insidentalomalı hastalar karşılaştırıldığında, benzer kan basıncı, glukoz ve insülin düzeyi olduğu gösterilmiştir. Adrenal insidentaloma varlığının, metabolik sendromun bir parçası olabileceği vurgulanmıştır. Muscogiuri ve arkadaşları (32) da fonksiyonel olmayan adrenal insidentalomalı hastalarda hiperinsülinizm saptamış ve hiperinsülinizmin adrenal kitlede büyüme etkisinin olabileceğini öne sürmüşlerdir. Erbil ve arkadaşlarının (33) çalışmasında fonksiyonel olmayan adrenal insidentalomalı hastalarda bozulmuş glukoz toleransı ve metabolik sendrom görülme sıklığında artış saptamışlar ve prematür aterosklerozun göstergelerinden arteriyel dilatasyonu değerlendirmişlerdir. Bu hastalarda bozulmuş endotel fonksiyonunu göstermişlerdir. Yener ve arkadaşlarının (34) çalışmasında, fonksiyonel olmayan 49 adrenal insidentalomalı hastada, aterosklerozun erken göstergelerinden olan karotis arter intima media kalınlık artışı saptamışlardır. Adrenal insidentalomalı hastaların, ölüm oranlarının genel nüfusa göre daha yüksek olup olmadığı bilinmemektedir. Ancak mevcut sınırlı verilere göre adrenal insidentalomalı hastaların çoğu, sıklıkla kardiyovasküler olaylar nedeniyle ölmektedir (35). Bu veriler ışığında, benign fonksiyonel olmayan adrenal insidentalomların insülin direnci, metabolik sendrom ve kardiyovasküler hastalık riski nedeniyle klinik önemi vurgulanmaktadır (25).

2.2.2.2 Subklinik Cushing Sendromu

Adrenal korteksten kaynaklanan insidentalomalar, Cushing sendromunun bulgu ve semptomlarına yol açmadan, otonom olarak kortizol salgılayarak ‘Subklinik Cushing sendromu’ olarak adlandırılan duruma yol açabilmektedirler (36). Bu tabloya ‘subklinik otonom glukokortikoid hipersekresyon’ tablosu da denilmektedir (4). Adrenal insidentalomalı hastalarda en sık görülen hormonal anormallik olup, prevalansı %1 ile 29 arasında değişmektedir ve ortalama prevalansı %9’dur (1,23,25,36,37). Subklinik Cushing sendromu, metabolik sendromun klinik özellikleri, arteriyel hipertansiyon, obezite, bozulmuş glukoz toleransı ve dislipidemisinin yüksek prevalansı ile ilişkili olabilmektedir (38-40). Cerrahi tedavi sonrasında tüm hastalarda bu hormonal ve klinik özelliklerin iyileşmesi, bu ilişkiyi desteklemektedir (38,39,41). Bununla birlikte, subklinik cushing sendromlu hastalarda osteoporoz veya osteopeni ile kardiyovasküler mortalite ve morbidite riskinde artış olup olmadığının prospektif vakakontrollü çalışmalarla araştırılması önerilmektedir (19,42,43).

2.2.2.3 Feokromositoma

Feokromositoma, genellikle histolojik olarak iyi huylu, ancak öngörülemeyen bir şekilde potansiyel olarak ölümcül bir hastalıktır (44). Genel popülasyondaki prevalansı yaklaşık 100.000 erişkinde 1-2’dir (45-47). Tüm hipertansif hastaların yaklaşık %0.01-0.1’inde görülür. Tanısı kolaylıkla gözden kaçmakta ve genellikle geç tanı konulmaktadır (48). Feokromositomaların büyük çoğunluğu (%86) sporadiktir. Geri kalan feokromositomalar (% 14) nörofibromatozis tip 1, von Hippel-Lindau sendromu, multipl endokrin neoplazi tip 1 (MEN 1) ve tip 2 (MEN2), süksinat dehidrogenaz alt birim B, C ve D’yi (SDHB, SDHC ve SDHD) kodlayan gen mutasyonu ile ilişkili feokromositoma/Paraganglioma sendromlarına eşlik etmektedir (46,47).

Feokromositomaların %10’u bilateral görülmektedir. Bunları çoğunlukla ailesel feokromositomalar oluşturmaktadır. Olguların %10’u adrenal dışı yerleşimli olup, %10-13 oranında malign özelliktedirler (42,46,47).

Feokromositomaların yaklaşık %8’i asemptomatiktir (49). Hipertansiyon, olguların yaklaşık %50’sinde vardır, üçte birinde ataklar halindedir. Yaklaşık % 20 hastada hipertansiyon görülmemektedir (50). İlk başvuru ile tanı arasında geçen süre ortalama 3.5 yıl olarak tahmin edilmektedir. Tanı konulamamış olgularda 30 yıla kadar uzun gecikmeler rapor edilmiştir (51). Ayrıca hipertansiyona feokromositomaya özgü semptom triadı eşlik edebilmektedir. Bu triad, baş ağrısı (% 80), çarpıntı (% 64) ve terleme ataklarını kapsamaktadır (46,47).

Klinik olarak semptomsuz, sessiz feokromositomalar da nadir değildir (42). En geniş serili çalışmalarda, adrenal insidentalomaların %3-7’sini feokromositomalar oluşturmaktadır

(1,23,25,52,53). Buna karşın Kore'den yayınlanan bir çalışmada %20 oranında yüksek sıklıkla görüldüğü bildirilmiştir (54). Sessiz feokromositomalar erken teşhis konulmazsa önemli bir morbidite ve mortalite nedenidirler (44).

Adrenal insidentaloması olup kanıtlanmış feokromositomalı 201 hastanın bulunduğu bir seride, olguların sadece % 10'unda feokromositomanın semptom triadı (terleme, baş ağrısı ve çarpıntı) saptanmıştır. Tesadüfen saptanan olguların % 12.5'inin normotansif olduğu bildirilmiştir (55). Başka bir çalışmada, adrenal insidentaloması olup feokromositoma saptanan olguların yarısından fazlasının normotansif olduğu, diğerlerinde ise hafif-orta derecede hipertansiyon bulunduğu bildirilmiştir (20). Hastalar asemptomatik ve normotansif olabileceği için, adrenal insidentalomalı her hastanın feokromositoma için taranması önerilmektedir (4,56-59).

Sürrenal BT 1 cm'den büyük feokromositomaları belirleyebilmektedir. Sürrenal BT'nin feokromositomayı tanımadaki duyarlılığı %77-98, özgüllüğü %29-92'dir. Sınırlı tanısal doğruluk nedeniyle, biyokimyasal tarama testleri ile doğrulanması mutlaka önerilmektedir (60). Feokromositomalar, T2-ağırlıklı magnetik rezonans görüntüleme (MRG) ile yüksek sinyal yoğunluğu gösterirler. T2 ağırlıklı görüntüleme ile duyarlılık yaklaşık %92, özgüllük %88'dir (61).

Feokromositoma saptanan tüm hastalara ameliyat sırasında açığa çıkacak katekolaminlerin etkilerini engellemek için preoperatif tıbbi tedavi yapılması önerilmektedir. Genellikle operasyondan 2 veya daha fazla hafta önce alfa adrenerjik bloker kullanılması önerilmektedir. Selektif olmayan alfa bloker fenoksibenzamin en sık tercih edilen ajandır (62).

2.2.2.4 Aldosteron salgılayan adenom (Aldosteronoma)

Adrenal insidentalomaların yaklaşık %0.6-3.3'ünü aldosteron salgılayan adenomlar oluşturmaktadır (1,19,23,25). Primer aldosteronizm (PA), klasik olarak yüksek aldosteron, düşük plazma renin aktivitesi (PRA) ve hipokalemi ile kendini göstermektedir. Ancak, çeşitli raporlarda hastalığın en sık normokalemik PA olarak görüldüğü bildirilmektedir (1,19,42,26,37). Hipertansiyon en sık görülen bulgudur. Eğer hastalarda hipokalemi varsa, noktüri, poliüri, kas krampları, çarpıntı veya felç görülebilmektedir (63). Adrenal insidentaloması ve hipertansiyonu olan 90 hastanın incelendiği bir çalışmada, hastaların %8.8'inde artmış aldosteron/PRA oranı ve %5.5'inde kanıtlanmış hiperaldosteronizm saptanmıştır (64). Genel hipertansif popülasyonda, PA prevalansı %1 veya daha az iken, son on yıl içinde normokalemik PA'nın daha erken tespit edilmesi nedeniyle, hipertansif bireylerdeki prevalansının %5-12'ye ulaştığı tahmin edilmektedir (65).

2.2.2.5 Adrenokortikal kanser

Adrenokortikal kanserler nadir görülmektedir (25). Genel popülasyonda prevalansı yaklaşık 1.000.000'da 12'dir (66). İnsidansı her yıl her 1.000.000'da 0.6-2 vakadır (67,68). Buna karşın adrenal insidentaloma serilerine ve popülasyonlara göre görülme sıklığı ile ilgili farklı sonuçlar mevcuttur. Adrenal insidentaloma serilerinde %1.9 ile %25 arasında görüldüğü bildirilmektedir (23,25,59,69). Herhangi bir yaşta görülebilmekle birlikte yaş dağılımı bimodaldır. Hayatın 4. ve 5. dekadı ile 5 yaşından önce en sık görüldüğü yaş grubudur. Kadınlarda erkeklerden daha sık görülür (2.5/1) (70). Ortalama yaşam süresi 18 ay olup, 5 yıllık yaşam süresi yaklaşık %16'dır (66). Bu tümörler fonksiyonel açıdan aktif olabilmektedir. Adrenokortikal kanserlerin %80'i fonksiyoneldir. Yaklaşık %45'i sadece glukokortikoid, %45'i glukokortikoid ve androjenler veya sadece androjenleri salgılar. Çoğu olguda hastalığa özgü belirti ve bulgu bulunmamakla birlikte ilk bulgu virilizasyon olabilmektedir (71). Feminizasyona yol açan östrojen salgılayan tümör ve izole mineralokortizolizm nadirdir (<%1) (4). Yüksek mortalite hızı olup, hızlı yaklaşım gerektirmektedir. Bu olgulara kısa sürede tanı konulup cerrahi yapılmalıdır. Ancak tedavi seçenekleri sınırlıdır (25).

2.2.2.6 Adrenal bezlere metastaz

Adrenal bezler yüksek vaskülarite nedeniyle diğer tümörlerden kan yolu ile metastaz almaktadırlar. En sık metastaz yapan tümörler, akciğer, meme, böbrek, gastrointestinal sistem kanserleri ve malign melanomdur. Lenfoma da adrenal bezlere yayılım göstermektedir. Metastazlar genellikle bilateral ve büyüktür (>3 cm). Bilinen malignitesi olan hastalarda adrenal kitlelerin en sık nedeni (%50-75) metastazlardır. Metastazların tek izole adrenal insidentaloma olarak karşımıza çıkması nadirdir (4).

2.2.2.7 Diğer nadir nedenler

Adrenal miyelolipom, adrenal korteks otopsi serilerinde % 0.08-0.2 arasında görülen, matür yağ hücreleri ve değişen oranlarda hematopoetik elemanlardan oluşan, nadir, benign ve genellikle hormonal olarak inaktif adrenal tümörlerdir (72,73). Çoğu asemptomatiktir, özellikle büyük olanları karın ağrısı veya retroperitoneal kanama ile ortaya çıkabilir. Adrenokortikal fonksiyon bozukluğu %10' unda görülebilir. Addison hastalığı, katekolamin veya aldosteron salgılanması nedeniyle hipertansiyon, Cushing hastalığı veya hiperandrojenizm olarak ortaya çıkabilir (73,74).

Diğer çok nadir nedenler; ganglionörom, lipom, anjiyosarkom, kistler, enfeksiyonlar (tüberküloz ve histoplazmozis gibi), hematoma veya adrenal psödötümörlerdir. Bunların dışında, radyolojik görüntülerde adrenal kökenli olduğu sanılan ama aslında böbrek, dalak, pankreas, mide ve lenf düğümleri gibi komşu yapılardan türeyen lezyonlar adrenal insidentaloma olarak değerlendirilebilmektedir (19,21,37,42)

2.2.3. Adrenal İnsidentaloma Değerlendirmesi

2.2.3.1 Malignite değerlendirilmesi

Adrenal insidentalomalı olguların değerlendirilmesinde, olguların malign olup olmadığının belirlenmesi gerekmektedir. Altta yatan malignitesi olan olgular dışında en sık görülen malignite, adrenokortikal karsinomlardır (25). Malignite ayırımında, BT ve MRG ile alınan görüntülerin değerlendirilmesi önemlidir. Adrenal insidentalomanın boyutu ile etyolojisi arasında ilişki mevcuttur. Büyük lezyonlar, küçük olanlara göre daha malign özelliktedir. Bu nedenle kitle çapının değerlendirilmesi ilk adımdır (59). Lezyon boyutu 4 cm'den küçük lezyonların sadece %2'sini adrenokortikal karsinomlar oluştururken, %65'i adenomlardır. Lezyon boyutu 4-6 cm arası olguların %6'sında adrenokortikal kanser saptanmıştır. Lezyon boyutu 6 cm'den büyük olanların %25'i adrenokortikal karsinomlar ve %19'u metastaz olarak saptanmıştır. Sadece %18'ini adenomlar oluşturmaktadır (42). Adrenal insidentalomalı 887 olgunun değerlendirildiği bir çalışmada, kitle çapı boyutu 4 cm üzeri malignite kriteri olarak alındığında adrenal kanseri belirlemede duyarlılık %90, özgüllük %24 olarak bulunmuştur (75).

2.2.3.2 Görüntüleme yöntemleri ile malignite değerlendirilmesi

Adrenal insidentalomalarda, benign ve malign lezyonların invaziv olmayan yöntemler ile ayrımları görüntüleme tekniklerine ve özelliklerine bağlı olarak değişmektedir (76).

2.2.3.2.1 Bilgisayarlı Tomografi ile değerlendirme

Adrenal adenomlar BT'de genellikle küçük, iyi sınırlı, homojen ve yüksek lipid içeriklidir. Malign lezyonlar ise daha büyük, düzensiz sınırlı, belirsiz şekillidir. Çevre dokulara invaze olabilir ve yüksek sinyal intensitesi gösterir (76,77). Benign adrenokortikal adenomlar, yüksek lipid içeriği nedeni ile kontrastsız BT'lerde hipodens (<10 Hounsfield Ünitesi (HÜ)) ve daha homojen olarak görülürler. Kitlenin dansite ortalaması için 10 HÜ sınır değer; %71 duyarlılık, %98 özgüllüğe sahiptir. Adenomların %30'u 10 HÜ'den fazla dansitededir. Bu nedenle diğer lezyonlardan ayrımı zordur. Kontrastsız BT'de 10 HÜ ve altındaki dansitede olan homojen lezyonlar %98 oranında benignidir (77,78). İntravenöz kontrast madde sonrası dansite <30-40 HÜ ve kitle kontrast maddeyi yoğun tutuyor, ancak kontrast madde hızla kayboluyorsa adenom lehinedir. Metastazlar kontrastsız BT'de >10 HÜ, 30.dakikalık geç çekimlerde >40 HÜ olarak görülür (79). Benign adenomları tanımlamada, intravenöz kontrast madenin göreceli olarak %40'dan daha fazla kaybolmasının duyarlılığı %96, özgüllüğü %100'dür (79,80). Kontrastsız BT yoğunluğu ve kontrasttan arınma değerlerinin birlikte kullanılması ile %98 duyarlılık ve %92 özgüllük ile adenomlar diğer adrenal tümörlerden ayırt edilebilmektedir (80,81).

2.2.3.2.2 Magnetik rezonans ile değerlendirme

Sürrenal MRG’de doku özgülüğü daha yüksektir. Adrenokortikal adenomlar tipik homojen sinyal intensitesi gösterirler. T2 ağırlıklı intensitede karaciğer dokusu ile benzer intensite mevcuttur. Sinyal kaybına uğrarlar. Malign adrenal tümörler ise T2 ağırlıklı intensitede karaciğere göre intensite artışı gösterir. T1 ağırlıklı görüntülemelerde hipointenstirler (82,83). Sinyal kaybına uğramazlar (84). Metastazlar da MRG’de sinyal kaybına uğramazlar. T2 görüntülemelerde karaciğere göre hiperintenstir (82).

2.2.3.2.3 Pozitron emisyon tomografisi ile değerlendirme

Pozitron emisyon tomografisi (PET), bilinen malignitesi olan hastalarda adrenal insidentaloma ayırıcı tanısında kullanılabilmektedir (85-88). Malign tümörlerde fluorodeoksiglukoz (FDG) tutulumunun artması nedeniyle glikolitik mekanizma hızlanmıştır. Adrenokortikal kanserli olgularda FDG tutulumu olur ve PET’de benign-malign ayrımı yapılabilir (88). Prospektif, çok merkezli, adrenal kitle nedeniyle opere edilecek 77 hastanın PET ile değerlendirildiği bir çalışmada, preoperatif FDG tutulum derecesi, patolojik bulguları tahmin etmede yüksek duyarlılık göstermiştir. Karaciğer ve adrenal için maksimum standart uptake değerinin (maxSUV) 1.45 üzerinde olmasının adrenokortikal adenom ile adrenokortikal kanserin ayrımında duyarlılığı %100, özgülüğü %88 olarak saptanmıştır (89).

2.2.3.2.4 Ultrasonografi ile değerlendirme

Duyarlılığı BT ve MR’a göre düşüktür. Altmışbir hastadan oluşan bir seride 3 cm’den büyük olan tüm adrenal kitleler ultrasonografi USG ile saptanmış, 3 cm’den küçük olanlar ise %65 oranında saptanabilmiştir. Adrenal kitlenin çap ölçümü USG ve BT’de korelasyon göstermiştir (90). Ancak, kullanımı kişi bağımlı olduğu için adrenal insidentaloma izleminde, boyut takibinde kullanılması sınırlıdır (4).

2.2.3.2.5 Sintigrafi ile değerlendirme

Adrenokortikal morfoloji ve fonksiyonel durumun değerlendirilmesinde ¹³¹iyodin (I), ¹³²I-işaretli metaiodobenzilguanidine (MIBG) ve ¹³¹I-6-betaiodometil- norkolesterol (NP-59) kullanılmaktadır. Bunların dışında ¹¹¹In-Octreotid sintigrafisi de feokromositoma ve diğer sempatomeduller hastalıkların tanımlanması ve lokalizasyonunda kullanılır. MIBG’nin feokromositomayı taramadaki duyarlılığı %87, özgülüğü %95’dir. Adrenal insidentalomalarda sintigrafik tetkikler, sadece malign veya bilateral feokromositoma şüphesi olan vakalarda önerilmektedir (91).

2.2.3.2.6 İnce iğne aspirasyon biyopsisi ile değerlendirme

Bilgisayarlı tomografi eşliğinde ince iğne aspirasyon biyopsisi (İİAB), adrenal dışı tümörü olan hastalarda adrenal metastazın tanısında en başarılı yöntemdir (4). İnce iğne aspirasyon biyopsisi ile primer adrenal karsinom ve adrenal adenom ayrımı yapılamamaktadır. İnce iğne aspirasyon biyopsisi adrenal dışı primer tümörü olup metastaz şüphesi olan hastalar ile enfeksiyon şüphesi olan hastalarda önerilmektedir (57). Adrenal beze yönelik İİAB işleminin nadir ama önemli olabilecek komplikasyonları mevcuttur. En sık adrenal hemoraji, pnömotoraks ve ağrı görülebilmektedir (%3) (19,25). Nadiren tümör rekürrensi ve ölüm bildirilmiştir (25). Potansiyel olarak yaşamı tehdit edebilecek hipertansif bir krize neden olmamak için, hastaların biyopsi öncesi feokromositoma açısından değerlendirilmesi önerilmektedir (4). Retrospektif 10 yıllık bir analizde, insidentalomalı 15 hastaya yapılan İİAB sonuçları değerlendirilmiştir. İki hastada feokromositoma saptanırken 13 hastada tanı konulamamıştır. İnce iğne aspirasyon biyopsi sonuçlarının herhangi bir hastada tedavi planını değiştirmedeği gösterilmiştir (92).

2.2.3.3 Hormonal fonksiyonların değerlendirilmesi

Adrenal insidentalomalar için en uygun tanısal yaklaşım konusunda görüş birliği bulunmamaktadır (4). Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün (NIH) 2002 yılında yayınlanan uzlaşma raporuna göre hormonal değerlendirme tavsiye edilmektedir (59). Glukokortikoid, mineralokortikoid, seks steroidleri veya katekolaminlerin hipersekresyonu klinik sendromlara, morbidite ve erken mortaliteye neden olabilmektedir (4). Adrenal insidentalomalar feokromositoma, aldosteronoma, Cushing sendromu, hiperandrojenizm klinik tabloları oluşturacak hormon aktivitesi gösterebilirler (4,23,59). Adrenal hormon hipersekresyonunun en sık 3 formu, kortizol fazlalığı, katekolamin fazlalığı ve eğer hasta hipertansif ise mineralokortikoid fazlalığıdır. Tartışmalar olmakla birlikte, tüm algoritmeler bu tema üzerinden şekillenmektedir (4). İnsidentalomalı olguların hormonal aktivitesini değerlendirmek için yapılacak araştırmalara karar verilmesine maliyet etkinlik analizlerinin yol gösterici olacağı düşünülmektedir (91).

Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün (NIH) 2002 yılında yayınlanan uzlaşma raporu 1 belirsizliğe bir yanıtı olmuştur. Bu yaklaşım dikkatli bir klinik değerlendirme, feokromositoma ve kortizol hipersekresyonu için tüm hastaların, primer hiperaldosteronizm için ise tüm hipertansif hastaların biyokimyasal taramasını önermektedir (59).

2.2.3.3.1 Subklinik kortizol hipersekresyonu

Subklinik Cushing sendromunda, kontrol dışı düzensiz kortizol salgısı, hafif düzeyde kortizol yüksekliği mevcut olup hipofiz-adrenal aks baskılanmamış olabilmektedir. Cushing sendromu tanısında, altın standart olabilecek test konusunda fikir birliği yokken, subklinik

Cushing sendromu tanısı için ise çok daha azdır. Tanıda kullanılan testlerin duyarlılık ve özgüllük eksiklikleri nedeniyle tanıda sorunlar yaşanabilmektedir (4,77).

Endokrin Derneği kılavuzları, subklinik Cushing sendromu tanısında, idrarda serbest kortizol, gece yarısı tükürük kortizol ve/veya düşük doz deksametazon supresyon testi (1 mg veya 2 mg 2 günlük test) kullanıldığında tanı olasılığının yüksek olduğunu bildirmektedir (93).

Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün (NIH) uzlaşma raporları ve Endokrinoloji dernekleri, tarama testi olarak 1 mg deksametazon baskılama testini önermektedir (4,58,59,93). Düşük doz deksametazon baskılama testi sonrası 5 mikrog/dl altındaki sabah kortizol değerleri normal olarak değerlendirilmektedir. Ancak, optimal sınır değer konusunda çelişkiler yaşanmaktadır (36). Son zamanlarda İngiltere laboratuvarlarında yapılan çalışmalar sonrası, bu sınır değer daha aşağı düzeylerde 1.8 mikrog/dl olarak önerilmektedir. Ancak bu sınır değer kullanıldığında da yanlış pozitif sonuçların arttığı belirtilmiştir. Bu nedenle fonksiyonel olmayan adenomların yaklaşık %10'unun subklinik Cushing sendromu tanısı aldığı öne sürülmüştür (21,43,94,95). Psödo-Cushing sendromunda, kortizol bağlayıcı globulin konsantrasyonunda artışa yol açan durumlarda (östrojen kullanımı, gebelik), karaciğerden deksametazon metabolizmasını artıran ilaçların (karbamazepin barbitüratlar, fenitoin, rifampisin ve antikonvülzanlar) kullanımında, deksametazon emilimini azaltan durumlarda, kısmen de depresyonda ve alkol kullanımında yanlış pozitiflikler görülebilmektedir (96). Biyokimyasal taramaya dayalı, düşük doz deksametazon (1 mg) baskılama testinin Cushing sendromu için duyarlılığı %98.1, özgüllüğü %80.5 ile 98.9 arasında bulunmuştur (1,19,21, 25,40,42,94,97). Adrenal insidentalomalı hastalarda sıklıkla düşük doz deksametazon baskılama testi sonucu anormal saptanmakta ve bu nedenle Cushing sendromu tanısı için ek tetkiklerin yapılması gerektiği vurgulanmaktadır (57). Bir çalışmada, düşük doz deksametazon baskılama testi yapılan 39 hastanın 36'sında anormal yanıt saptanmıştır. Ancak sadece 15 hastanın Cushing sendromu ölçütlerini doldurduğu gözlenmiştir (98). Bu nedenle, düşük doz deksametazon baskılama testi pozitif saptanırsa, Cushing sendromu için doğrulamaya gerek vardır. İlk olarak 24 saatlik idrarda serbest kortizol düzeyi bakılması önerilmektedir. Çoğu ölçümlerde normal üst aralığı 80-120 mikrog/24h (220-330 nmol/24h) arasında değişmektedir. Genel olarak yüksek duyarlılığı vardır, ancak düşük doz deksametazon baskılama testi ile karşılaştırıldığında daha düşük özgüllüğe sahiptir (%91'e %97). (99,100).

Önerilen ikinci bir tanısal yaklaşım da, kortizolün diüurnal ritminin belirlenmesidir. Gece yarısı tükürük kortizol ölçümünün subklinik Cushing sendromu için yararlı olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Tükürük kortizolü, plazma serbest kortizol düzeyini yansıtmak-

tadır. Gece yarısı tükürük kortizol düzeyi >2 ng/ml olduğunda duyarlılık %100, özgüllük %96 olarak saptanmıştır (101). Geniş serili başka bir çalışmada ise, 104 adrenal insidentaloma saptanan hastanın 22'sinde subklinik hiperkortizolizm saptanmış, düşük doz deksametazon baskılama testi ve serum ACTH düzeyi %86 hastada anormal, idrar serbest kortizolü %31 hastada anormal saptanmıştır. Gece tükürük kortizolünün duyarlılığı %23, özgüllüğü %88 olarak bildirilmiştir (102).

Bunların dışında 2 gün 2mg deksametazon baskılama testi de kullanılmaktadır. Bu test için 48 saat boyunca her 6 saatte 0.5 mg deksametazon verildikten sonra serum kortizol veya idrar serbest kortizol ve/veya 17-OH kortikosteroid düzeyi bakılmaktadır. Serum kortizol düzeyi <1.8 mikrogram/dl olarak alındığında duyarlılığı %98, idrar serbest kortizol düzeyi <20 mikrogram/24saat (<55 nmol/gün) ve 17-hidroksikortikosteroid düzeyi <3.5 mg/24saat (<7 mikromol/gün) olarak alındığında duyarlılıkları %93 olarak saptanmıştır (103).

Mantero ve arkadaşlarının (1) 946 adrenal insidentaloma olgusu içeren çalışmasında, olguların 92'si subklinik Cushing sendromu olarak tanı almıştır. Bu olgularda, subklinik Cushing sendromu tanısında, plazma ACTH, idrar serbest kortizolü, dehidroepiandrosteron-sülfat (DHEAS), 24 saatlik kortizol ritmi, 17-OH progesteron, 1 mg deksametazon baskılama testi, 100 mikrogram kortikotropin salıcı hormon (CRH), 250 mikrogram ACTH uyarı testi yapılmıştır. Ancak her olguda bütün testler yapılmamıştır. Fonksiyonel olmayan adenomların %15'inde hipofiz-adrenal aksında anormallik saptanmıştır. Bu nedenle, subklinik Cushing sendromu tanısında, iki veya daha fazla testte, hipofiz-adrenal aksında anormallik gösterilmesi gerekliliği vurgulanmıştır. Düşük plazma ACTH düzeyi ile birlikte 1 mg deksametazon testine yanıt alınamaması tanı kriteri olarak alındığında yaklaşık %55 olguya tanı konulmaktadır. Bu çalışmada 1 mg deksametazon baskılama testi için kortizol sınırı <5 mikrogram/dl olarak alınmıştır. İdrar kortizolü fazlalığı ve 1 mg deksametazon testi anormalliği ile %50 olguda doğru tanıya ulaşılmıştır.

2.2.3.3.2 Klinik olarak sessiz (subklinik) Feokromositoma taraması

Adrenal insidentaloma saptanan her hastada feokromositoma için biyokimyasal tarama testleri önerilmektedir (4,23,56,58,59). En iyi tarama testi ve test rejimlerinin karşılaştırıldığı prospektif çalışmalarda dahi görüş birliği yoktur. Plazma serbest metanefrinlerin ölçümü, idrardaki toplam metanefrinlerden ve katekolaminlerden daha iyi duyarlılıktadır (104-106). Ancak özgüllüğü daha düşüktür. İdrar norepinefrin değeri >170 mikrogram/24saat, idrar epinefrin >35 mikrogram/24saat ve idrar toplam metanefrinler en az 1.8 mg/24saat ve vanilil-mandelik asit (VMA) en az 11 mg/24saat olması kuvvetle muhtemel feokromositoma tanısı koydurmaktadır (46,47). Uluslararası bir sempozyum raporu, bu testlerdeki anormal sonuç

sayısı arttıkça doğru patolojik tanı olasılığının arttığını kabul etmekte ve tarama testi olarak kullanılmalarını önermektedir (56). Başka bir raporda, görüntüleme sonuçlarına göre feokromositomanın büyük olasılıklı düşünüldüğü durumlarda plazma serbest metanefrinlerinin kullanılması, feokromositomanın radyolojik bulgusu olmayan hastalarda ise idrar katekolaminlerinin ölçümlerinin kullanılması önerilmektedir (19). Yapılan çalışmalardan çıkan ortak sonuç, feokromositoma tanısında ilk basamak biyokimyasal test olarak plazma metanefrinlerinin kullanımını desteklemektedir (1,19,21,25,37,42,46,47). Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün (NIH) 2002 yılında yayınlanan uzlaşma raporu da tarama testi olarak plazma serbest metanefrinlerinin ölçümünü önermektedir (59). 2009 yılında yayınlanan adrenal insidentaloma kılavuzunda 24 saatlik idrarda fraksiyone metanefrin ölçümleri önerilmekteyken (58), 2012 yılında yayınlanan kılavuzda ise plazma serbest metanefrinlerinin ölçümü önerilmektedir (4). Feokromositoma için katekolaminlerin duyarlılık ve özgüllükleri kötü olduğu için, bu durumun yanlış pozitif sonuçlara yol açabilmesi nedeniyle, adrenal insidentalomalı hastaların hormonal değerlendirmesinde genellikle tavsiye edilmemektedir (42,107).

Kesitsel, çok merkezli, 1260 hastayı içeren geniş bir çalışmada, plazma serbest metanefrinlerinin kombine ölçümünde, testlerin duyarlılığı %100, özgüllüğü %96.7 ve negatif prediktif değeri %100 olarak bulunmuştur (108). Ayrıca, farklı beş bağımsız çalışmanın bulguları, plazma serbest metanefrinleri ölçümünün feokromositoma tanısı koymada duyarlılığını %98, özgüllüğünü %92 olarak göstermektedir (36). Young ve arkadaşlarının(19) ise 24 saatlik idrar fraksiyone metanefrinlerinin (normetanefrin ve metanefrin) ölçümünün mükemmel duyarlılık ve özgüllük gösterdiğini, muhtemelen tarama için en etkili biyokimyasal test olduğunu bildirmişlerdir.

Fraksiyone metabolitlerin değerlendirilmesi, total metanefrinlerin değerlendirilmesinden daha üstündür. Çünkü, sadece üç O-metil metabolitlerinin biri veya hepsi değerlendirildiğinde, tümörü saptamada daha etkin bulunmuştur (109). Plazma normetanefrin düzeyleri <112 pg/ml veya metanefrin düzeyleri <61 pg/ml saptandığında hemen hemen feokromositomayı dışlamaktadır. Plazma normetanefrin konsantrasyonu 400 pg/ml'den veya plazma metanefrin düzeyi 236 pg/ml'den fazla ise feokromositoma olasılığı çok yüksektir. Ara değerler için farmakolojik testler ile daha fazla araştırma önerilmektedir (46).

Farmakolojik test olarak klonidin, histamin veya glukagon ile uyarı testleri yapılabilir. Histamin nadiren kullanılır. Yalnızca klinik bulgular feokromositoma için yüksek anlamlı olduğunda ve plazma katekolaminleri 500-1000 pg/ml arasında olduğunda kullanılmalıdır. Plazma katekolaminlerin toplam düzeyi 2000 pg/ml'den fazla ise feokromositoma için tanısal kabul edilmektedir. Bu değer 500 pg/ml den az ise feokromositoma tanısı dışlanmaktadır.

Pozitif glukagon testi için toplam plazma katekolamin düzeyinde en az 3 kat artış olması ve/veya 2000pg/ml'den fazla olması gereklidir (36, 46). Klonidin supresyon testi ile normal yanıt, başlangıçtaki katekolamin düzeyinde en az %50 düşüş olması ve/veya 500 pg/ml'den düşük olması olarak kabul edilmektedir (42,46,47).

Genellikle plazma fraksiyone metanefrin testi pozitif saptandığında, idrar fraksiyone metanefrinlerinin ölçümü veya klonidin supresyon testi yoluyla teyit edilmesi tavsiye edilmektedir (43, 47, 110).

Bazı durumlarda yanlış pozitif sonuçlar görülebilmektedir (akut kardiyovasküler olay, akut serebrovasküler olay, konjestif kalp yetmezliği, akut alkol veya klonidin çekilme sendromu, arteriyel vazodilatörlerin kullanımı, kokain kullanımı, trisiklik antidepresanlar, fenoksibenzamin, α 1-adrenerjik reseptör blokerleri, klonidin, metildopa, bromokriptin, labetalol, asetaminofen kullanımı, uygunsuz örnekleme koşulları ve beslenme tipi) (46).

İdrar fraksiyone veya plazma katekolaminler ile kromogranin A ise ek ölçümler ile tarama işlemlerinin etkinliğini artırabilmektedir (19, 110).

2.2.3.3.3 Hiperaldosteronizm taraması

Adrenal insidentaloması olan hipertansif hastalarda rutin olarak hiperaldosteronizm açısından tarama önerilmektedir. Primer aldosteronizmi olan olguların yaklaşık %50'sinde serum potasyum düzeyi normal olabileceği için tarama testi olarak sadece serum potasyum düzeyine bakmak yeterli değildir. Primer hiperaldosteronizm tanısında en yararlı test ayakta renin, aldosteron düzeylerine bakmaktır. Plazma aldosteron/PRA oranı testinin duyarlılığı ve özgüllüğü, plazma aldosteron/PRA oranının değerine göre değişmektedir (1,19,26,37,42,43,64,111-115). Plazma aldosteron (ng/dl)/PRA (ng/ml/saat) oranının 20 ve üzerinde olması durumunda mineralokortikoidlerin otonomik olarak salgılandığının gösterilmesi için ek testlere gereksinim vardır (43,111). Bazı araştırmacılar plazma aldosteron/PRA oranının eşik değer olarak 30 ve üstü olarak alınmasını önermektedir. Bu oran 30 ve üzeri alındığında duyarlılığının %90, özgüllüğünün %91 olduğu belirtilmiştir (21,42, 114,115). Bu testin tanı güvenilirliği için özellikle β -blokerler ve dihidropiridin grubu kalsiyum kanal bloke edici ajanların testten önce iki hafta boyunca, spironolakton, eplerenone ve loop diüretiklerin ise altı hafta önceden kesilmesi önerilmektedir. Böbrek yetmezliği olan ve uyuşturucu kullanan hastalarda testin etkilenebileceği vurgulanmıştır (111,114). Primer hiperaldosteronizmin doğrulanması için oral sodyum yükleme testi, intravenöz salin infüzyon testi veya fludrokortizon baskılama testi yapılması önerilmektedir. Oral sodyum yükleme testi için, hasta üç gün yüksek sodyum diyeti (günde 12.8 g sodyum klorür) almalıdır. Primer aldosteronizm tanısı için idrar sodyum düzeyi 200 mmol/gün iken idrar aldosteron düzeyi >27.7 nmol/gün olmalıdır.

Buradaki amaç intravasküler volüm genişlemesi ile aldosteron düzeyinin baskılanamaması temeline dayanmaktadır. Böylece otonomi kazanmış aldosteron üretimini göstermek amaçlanmıştır. İntravenöz salin infüzyon testi, sol ventrikül veya böbrek fonksiyon bozukluğu olan kişilerde dikkatle yapılmalıdır. Saatte 500 cc hızla 4 saatte 2 litre % 0.9 sodyum klorür (NaCl) intravenöz olarak verilmelidir. İnfüzyon sonrası plazma aldosteron düzeyi > 277.4 pmol/l (ya da $>10\text{ng/dl}$) olması primer hiperaldosteronizm göstergesidir. Fludrokortizon supresyon testinin hastaneye yatırma gereksinimi olmaması, düşük maliyet ve uygulanmasının kolay olması nedeniyle ön planda tercih edilmesi önerilmektedir. Fludrokortizon asetat, her 6 saatte 0.1 mg dozunda, sodyum klorür tabletler (2g günde 3 kez) ile birlikte dört gün boyunca verilir. Plazma aldosteron düzeyi 4. gün sonunda saat 10:00'da, dik konumda iken >166 pmol/l (> 6 ng/dl) olması PA için tanısaldır (113-115).

Primer hiperaldosteronizmli hastalarda bilateral hastalık ile tek taraflı hastalığın ayrımı için referans standart test adrenal venöz örneklemedir. Zor bir prosedür olmasıyla birlikte, işlemi gerçekleştirene göre başarı oranı değişmektedir (%74-96) (114-116). Duyarlılığı %95, özgüllüğü %100'dür (115,116).

2.2.3.3.4 Diğer hormonal değerlendirmeler

Cinsiyet hormonları hipersekresyonu son derece nadir görülür. Genellikle adrenokortikal karsinoma bağlı oluşur. Hastalarda hormon fazlalığı ile ilgili belirti ve bulgular (örneğin hirsutizm, virilizasyon, feminizasyon gibi) ile ortaya çıkabilir (36). Adrenal insidentalomalı olgularda, özel klinik belirtiler varsa veya malignite şüphesi varsa hormonal değerlendirme önerilmektedir. Bunun dışında rutin tarama önerilmemektedir (19,42, 43).

Bilateral adrenal insidentaloma ve hiperandrojenizm olan hastalarda, klasik olmayan konjenital adrenal hiperplaziye ekarte etmek için bazal ve ACTH uyarısı sonrası 17-OH progesteron ölçümü tavsiye edilmektedir (36).

Adrenal insidentaloma fonksiyonel değerlendirilmesinde, adrenal androjen fazlalığının bir göstergesi olarak DHEAS'ın değerlendirilmesi ile ilgili veriler hala tartışmalıdır. Benign adrenokortikal lezyonlarda düşük, primer adrenokortikal karsinomda yüksek olarak saptanmış (117) ve duyarlılığı %100, özgüllüğü %46 olarak bildirilmiştir (118,119). Başka bir çalışmada da herhangi bir ilişki ve korelasyon saptanmamıştır (120). Kılavuzlar, malign adrenokortikal tümörde artan testosteron seviyeleri ile birlikte yüksek DHEAS düzeyleri olmasına rağmen, adrenal insidentaloma rutin incelemesi için DHEAS tayinini önermemektedirler (1,19,21,26,37,42, 46,47).

2.2.4 Adrenal İnsidentaloma İzlemi

Adrenal insidentalomalarda izlem en tartışmalı konular arasındadır. Takip iki nedenden dolayı yapılmaktadır. Birincisi, benign görünümlü bir adenomun boyutunda hızlı bir artış olup olmadığının değerlendirilmesidir. Adenom boyutunda artış, malignite lehine bir bulgu olarak değerlendirilip operasyon endikasyonu oluşturmaktadır. İkincisi ise, adrenal insidentalomanın hormonal aktivitesindeki değişikliği değerlendirmek ve hormonal aktiviteye bağlı gelişebilecek komplikasyonları önlemek içindir. En uygun takip stratejisi net değildir. Genellikle insidentalomaların izleminde değişiklik görülmemektedir (4)

Fonksiyonel olmayan adrenal insidentalomalı bir hasta için subklinik hiperfonksiyon açısından kümülatif risk 1 yıl sonra %3.8, 5 yıl sonra %6.6 saptanmıştır. Adrenal insidentalomalı subklinik Cushing sendromu olan hastalar için, aşık Cushing sendromu gelişmesi açısından kümülatif risk 1 yıldan sonra %11 ve 5 yıldan sonra %26 olarak tahmin edilmektedir. Diğer çalışmalarda da benzer oranlarda sonuçlar gösterilmiştir (121-126).

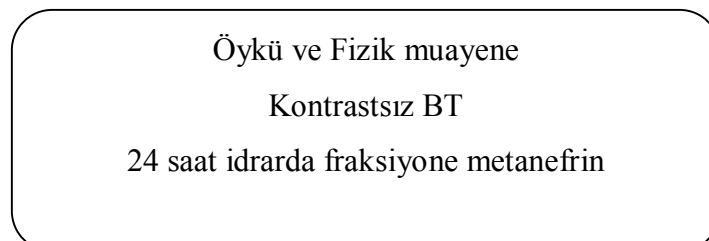
Kılavuzlara göre adrenal insidentaloma izlemi için çeşitli algoritmeler belirlenmiştir. Terzolo ve arkadaşlarının (58) 2009 yılında adrenal insidentaloma yönetimi ile ilgili kılavuzunda, adrenal hiperfonksiyon ve maligniteye işaret eden semptom ve bulgulara yönelik öykü alınması ve fizik muayene yapılması, kontrastsız BT çekilmesi ve 24 saatlik idrarda fraksiyone metanefrinlerin bakılmasını önermektedir. Görüntüleme yöntemleri benign adenomu düşündürüyor ve 24 saatlik idrarda metanefrinler normal saptandıysa, 1 mg deksametazon baskılama testi, ayakta plazma aldosteron/PRA oranı ve gerekirse subklinik Cushing sendromu için ek değerlendirme önermekteydi. Subklinik Cushing sendromu için biyokimyasal değerlendirme ise standartize edilmemişti. Eğer fonksiyonel olmayan, çapı 4 cm'den küçük benign adenom saptanırsa, ilk 3, 6 ve 12. ayda, daha sonra 4 yıl boyunca yılda 1 kez görüntüleme yöntemleri ile adenom çapında artış olup olmadığının değerlendirilmesi önerilmiştir. Hormonal tetkiklerin 4 yıl boyunca yılda bir kez tekrarlanması ve 4 yıllık takip sonunda çapta değişiklik yok ve hormonal fonksiyon saptanmazsa takibin bırakılması önerilmiştir. Terzolo ve arkadaşlarının algoritmi Şekil 1. de verilmiştir.

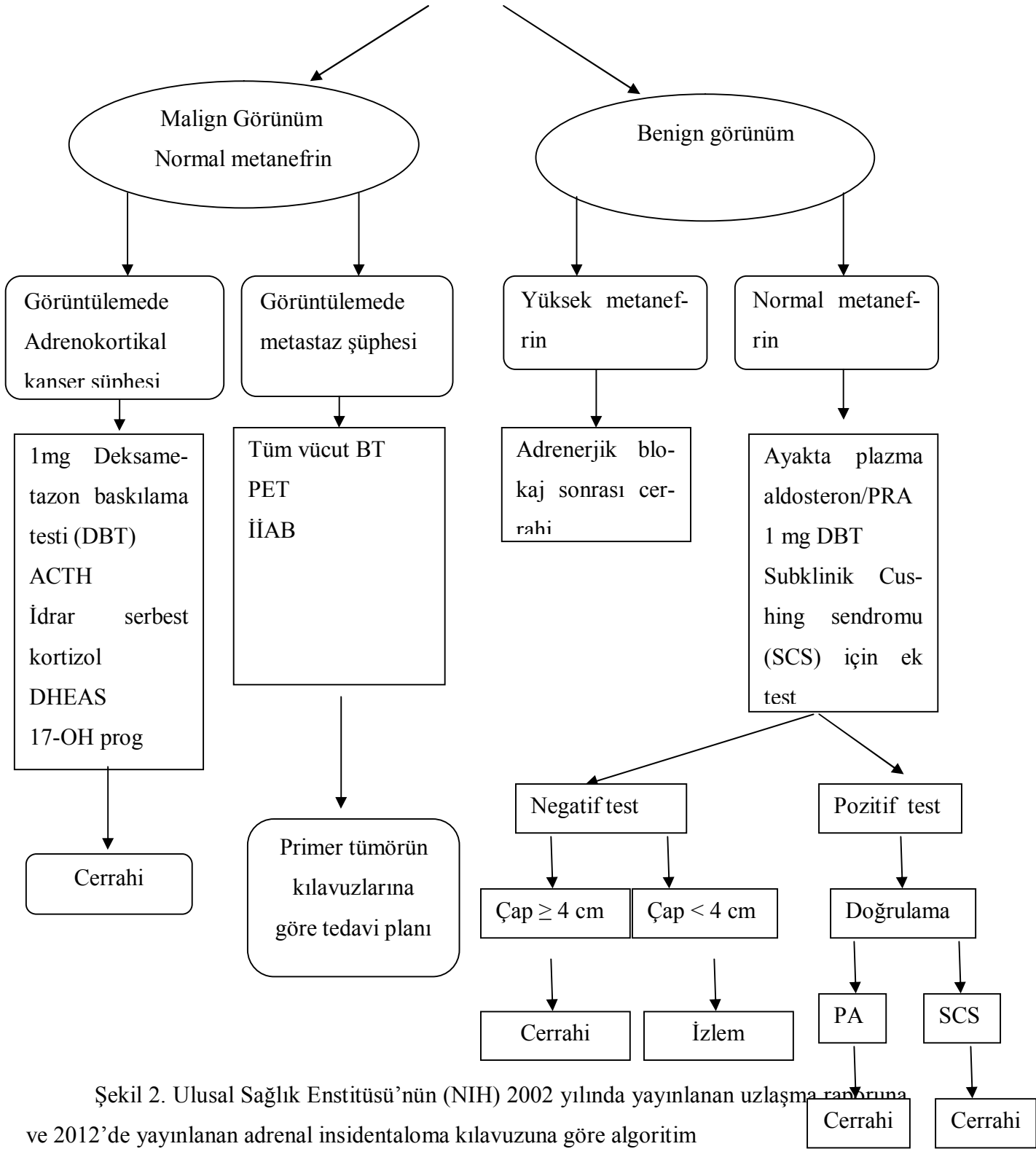
Terzolo ve arkadaşlarının (58) 2009 yılında yayınlanan bu algoritmi 2012 yılında yenilenmiştir. Adrenal insidentaloma saptanan ve malignitesi olmayan bir hastada Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün (NIH) 2002 yılında yayınlanan uzlaşma raporunda belirtilen algoritim tavsiye edilmektedir. İlk vizitte 1 mg deksametazon supresyon testi ile plazma serbest metanefrinlerin bakılması önerilmiştir. Eğer test sonuçları negatif ise hastanın hipertansiyon tanısının olup olmamasına göre değerlendirme planlanmıştır. Eğer yeni saptanmış yüksek kan basıncı yada hipertansiyon varsa serum potasyum ve serum aldosteron/PRA oranı bakılması önerilmiştir. Hipertansiyon yada yeni saptanmış yüksek kan basıncı yoksa hiperaldosteronizm için tarama

önerilmemiştir. Fonksiyonel olmayan, 4 cm'den küçük benign adenomlar için en minimalist yaklaşım olarak, yaklaşık 6 ay içinde tek bir tarama yapılması önerilmiştir (4). Ancak birçok öneri, 4 veya 5 yıl boyunca yıllık BT kontrolü önermektedir. Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün (NIH) 2002 yılında yayınlanan uzlaşma raporuna göre, hormonal aktivite açısından en önemli endişe konusu, subklinik Cushing sendromu gelişmesidir. Bu nedenle en az 4 yıl boyunca yılda bir kez 1 mg deksametazon baskılama testi ile değerlendirilmesi önerilmektedir (4,59,127). Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün (NIH) 2002 yılında yayınlanan uzlaşma raporuna göre ve 2012'de yayınlanan adrenal insidentaloma kılavuzuna göre algoritm Şekil 2.de verilmiştir (4,59).

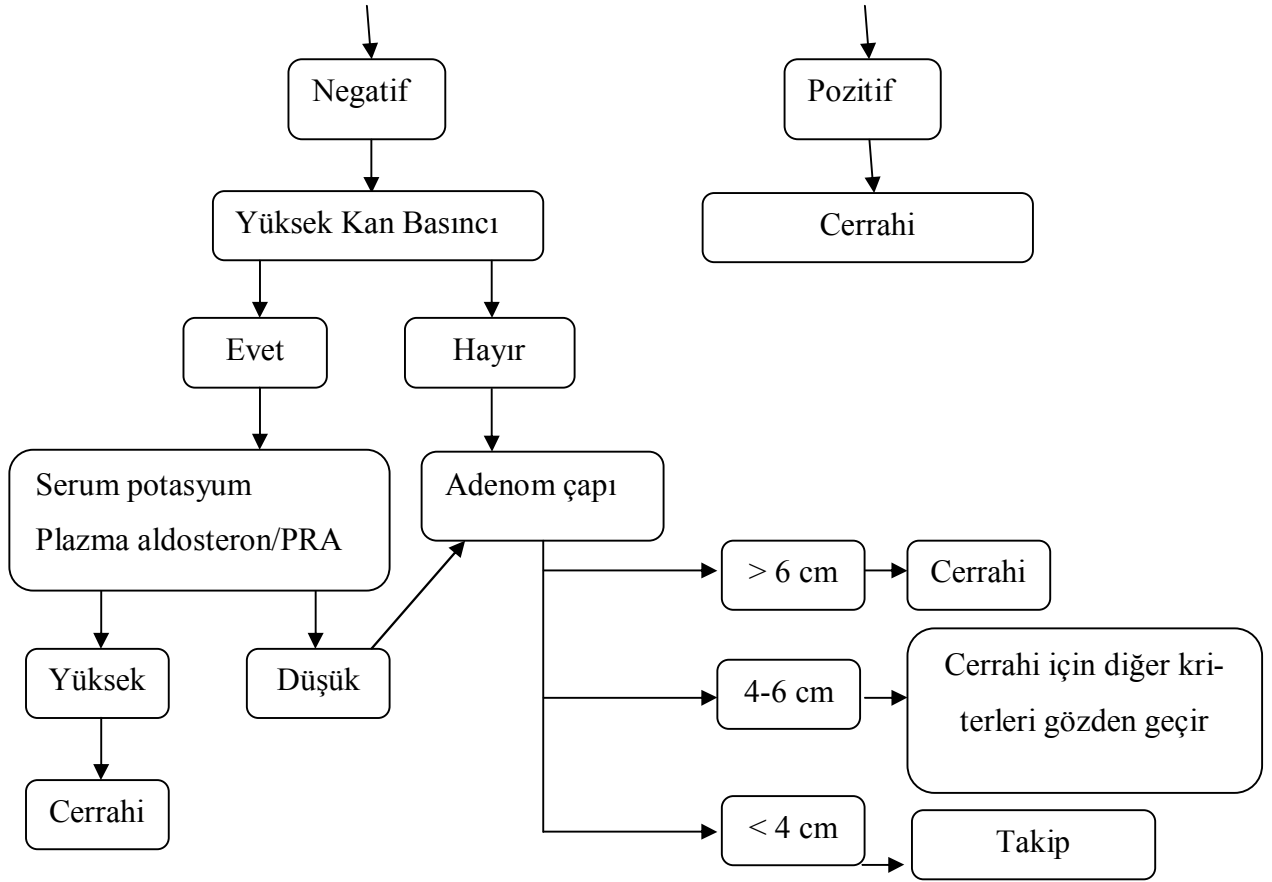
Anagnostis ve arkadaşlarının 2009 yılında yayınladığı kılavuzda ise, ilk vizitte öykü, fizik muayene, 1 mg deksametazon baskılama testi, plazma veya idrarda serbest metanefrinler, hipertansiyon varsa serum potasyum ve plazma aldosteron/PRA oranı bakılmasını önermiştir. Eğer hormonal olarak aktif olmayan bir adenom ise, kontrastsız BT'de <10HU ve kitle çapı <4cm ise 6-12ay sonra görüntüleme tekrarı ve 4 yıl boyunca yılda bir kez hormonal aktivite değerlendirmesi önerilmiştir (36). Farklı bir kılavuzda ise, eğer benign adenom düşünülüyorsa, hormonal değerlendirme için, 1 mg deksametazon baskılama testi, gece yarısı tükürük kortizoli ve 24 saatlik idrarda serbest kortizol, idrar katekolaminleri, plazma serbest metanefrinleri, hasta hipertansif ise plazma aldosteron/PRA oranı bakılması önerilmiştir. Subklinik Cushing sendromu açısından DHEAS ve ACTH da dikkate alınabilir denilmiştir. Eğer hormonal aktivite normal ise, 1 yıl sonra feokromositomanın, hiperkortizolizmin dışlanması, 6. aylarda kitlede büyüme olup olmadığının görüntüleme yöntemleri ile değerlendirilmesi önerilmiştir. Takip süresi ile ilgili olarak da bir uzlaşma olmadığı belirtilmiştir. Ancak maliyet-etkinlik analizi bilinmemekle birlikte birçok yazar tarafından 4 yıl boyunca yılda bir kez feokromositoma ve hiperkortizolizm açısından biyokimyasal tarama önerildiği belirtilmiştir (57).

Şekil 1. Terzolo ve arkadaşlarının 2009 yılında yayınlanan adrenal insidentaloma yönetimi





- 1 mg deksametazon baskılama testi
- Plazma serbest metanefrinler



2.2.5 Adrenal İnsidentaloma Cerrahisi

Adrenal insidentalomalı hastalarda kitlenin boyutu, izlemde boyut değişiklikleri, görüntüleme yöntemlerindeki özellikleri ve hormonal aktivite durumuna göre cerrahi kararı planlanmaktadır (4). Çeşitli kılavuzlarda, cerrahi için önerilen kitle çapları farklılık göstermektedir. Büyük çapı 6cm ve daha büyük kitlelere, şüpheli görüntüleme özellikleri (hızlı büyüme oranı, heterojen, düzensiz şekil, kalsifikasyon, nekroz, komşu yapılara invazyon) olan kitlelere ve hormonal aktif saptanan kitlelere cerrahi önerilmektedir (19,21,42,36,43,128). Terzolo ve arkadaşlarının 2009 yılında yayınlanan kılavuzunda ise 4 cm ve üzeri kitlelere cerrahi önerilmektedir (58). Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün (NIH) 2002 yılında yayınlanan uzlaşma raporuna ve 2012'de yayınlanan adrenal insidentaloma kılavuzuna göre, kitle çapı 6 cm ve üzeri ise cerrahi, 4 cm altında ise izlem ve 4-6 cm arası ise diğer faktörlere göre değerlendirme önerilmektedir (4,36,59,127). Bunlardan farklı olarak 5 cm ve üzeri kitlelere cerrahi öneren yayınlar da mevcuttur (111,129-131). Hastalarda hormonal aktivite durumuna göre preoperatif, intraoperatif ve postoperatif yaklaşım farklı olabilmektedir (4). Laparoskopik yada açık operasyon seçimi ise adrenal insidentalomanın boyutuna, radyolojik görüntüleme

yöntemlerine göre insidentalomanın etiyolojisine ve cerrahi ekibin deneyimine bağlı olarak değişmektedir. Randomize, kontrollü çalışmalar yeterli olmamasına rağmen, laparoskopik yaklaşım, kısa hastanede kalış süresi, düşük morbidite oranları, daha az karın ağrısı ve kan kaybı, hızlı iyileşme ve normal günlük aktivitelerine erken dönebilme nedeniyle daha faydalı olma eğilimindedir. Çoğu araştırmacı, laparoskopik adrenalektomi sonrası, intra ve postoperatif komplikasyonlar ve lokal nüks açısından değişik takip zamanlarında olumlu sonuçlar bildirmişlerdir (19,42,43,111,128,132-134). Son olarak, yapılacak cerrahinin olası riskleri ve potansiyel faydaları hakkında hasta tercihlerini dikkate almak gerekliliği vurgulanmıştır (4).

Subklinik Cushing sendromunu olan ve tek taraflı adrenalektomi planlanan hastalarda diğer adrenal bez atrofik durumda olabilmektedir. Operasyon öncesi akut adrenal yetmezlik tedavi protokolü uygulanmalıdır. Diğer adrenal bez zamanla fonksiyon kazanıp yeterli steroid sentezini sağlaması mümkün olacağı için bu zamana kadar fizyolojik dozda glukokortikoid replasman tedavisi yapılmalıdır. Bilateral adrenalektomi uygulanan vakalarda hayat boyu glukortikoid ve mineralokortikoid replasmanı vermek gereklidir (4,18).

2.3 JAK2 V617F gen mutasyonu

JAK2 ilk kez 2005 yılında dört farklı çalışma grubunun birbirinden bağımsız olarak yaptığı çalışmalarda tanımlanmıştır. JAK2 17. kromozom üzerinde 617. pozisyonda valin-fenilalanin (V617F) somatik tek nokta mutasyonunu göstermişlerdir. JAK2 V617F mutasyonu, JAK2'deki bir guaninin timidine yer değiştirmesidir JAK2'nin kodon 617'sinde valinin fenilalanine yer değiştirmesi ile sonuçlanır (8-12). Çoğu sitokin reseptörleri birden fazla JAK kinaz ile ilişki kurabilir, fakat JAK2-eksik miyeloid öncüllerin eritropoetin, trombopoetin veya granülosit-monosit koloni stimülan faktöre cevap veremediği ve JAK2 eksikliğinin definitif eritropoezin yokluğu ile sonuçlandığı gösterilmiştir (135). Bu veri JAK2'nin miyeloid hücre çoğalmasında ve farklılaşmasında baskın JAK kinaz olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle, JAK2'de mutasyon kazanılmış olması çeşitli miyeloid malignensi spektrumunda gözlemlenmektedir (14). Miyeloproliferatif hastalık veya diğer insan malignensilerinde günümüze kadar bu kodonda alternatif başka bir mutasyon tanımlanmamıştır. JAK2 mutasyonu polistemia vera'lı (PV) hastaların yaklaşık olarak %95'inde bulunur (136). William Vainchenker ve arkadaşlarının öncülük ettiği çalışmada PV'da hematopoetik öncü hücrelerde JAK2'nin küçük molekül veya siRNA bağımlı inhibisyonunun endojen eritroid koloni oluşumunu iptal ettiğini gözlemlemişlerdir (137). JAK2 mutasyonu polisiteminin diğer nedenlerinde bulunmamaktadır (138). Bu nedenle JAK2 mutasyonunun PV tanısı için sensitif bir tanısal belirteç olduğu düşünülmüştür (139-141). Ancak miyeloid neoplazmlar içinde JAK2 mutasyonu PV için özgül değildir. Esansiyel trombositoz, primer miyelofibrozis veya belirgin

trombositozun eşlik ettiği refrakter anemi ring sideroblastlı hastaların yaklaşık %50'sinde ve diğer miyeloid neoplazmlardan Ph negatif kronik miyeloid lösemide %19, megakaryositik akut miyeloid lösemide %18, kronik miyelomonositik lösemide %18, miyelodisplastik sendromda %1 olarak görülmektedir. Akut miyeloid lösemi ve Akut lenfoblastik lösemi'de mutasyon %1'in altında saptanmıştır (142-145).

Janus kinaz 2, aynı zamanda fosfoinozitol-3 kinazı, Ras'ı, MAP kinazı ve transkripsiyonu aktive eden STAT proteinlerini aktive etmektedir (13). Çeşitli kanser türlerinde düzensiz JAK sinyalizasyonuna ait kanıtlar mevcuttur. Uygunsuz JAK sinyalizasyonu çeşitli solid tümörlerin hayatta kalmasına ve hücre proliferasyonuna neden olmaktadır (16). Birçok hematolojik ve solid tümör etiyopatogenezinde saptanan düzensiz JAK sinyalizasyonu ve JAK2 V617F mutasyonu adrenal tümörlerde daha önce araştırılmamıştır.

2.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR)

2.4.1 Polimeraz zincir reaksiyonu tekniği

Polimeraz zincir reaksiyonu 1985 yılında Karry B. Mullis tarafından geliştirilmiştir. Bu tekniğin amacı, bir DNA dizisinin in vitro koşullarda oluşturulan kimyasal reaksiyonlar ile istenilen miktarda çoğaltılmasıdır (146). Nükleik asitlerin in vitro şartlarda replikasyonu için geliştirilmiş bir test sistemidir. Hedef DNA/RNA'nın selektif olarak amplifikasyonuna imkan verir. İn vivo şartlarda bölünen bir hücrede DNA'nın replikasyonu çeşitli enzimler tarafından düzenlenen ve genomun kopyalanması ile sonuçlanan bir işlemdir. Bir test tüpü içerisinde gerçekleştirilen PCR'da in vivo çoğalma örnek olarak alınmıştır. Yalnızca DNA polimeraz enzimi yardımı ile genomun tamamının değil, spesifik bölgelerin kopyalanması sağlanır. Amplifikasyon bazlı teknikler; birinci reaksiyonda üretilen bütün nükleik asitlerin bir sonraki reaksiyon için kalıp görevi gördüğü, bir birini izleyen siklus serisi içinde tekrarlandıkları için 'zincir reaksiyonu' (chain reaction) olarak adlandırılmıştır (147). Polimeraz zincir reaksiyonu, dizisi bilinen iki bölge arasında uzanan DNA parçasını çoğaltmak için kullanılır. İki tane oligonükleotid, DNA polimeraz tarafından katalizlenen bir seri sentetik tepkimenin primerleri olarak kullanılır. Bu oligonükleotidler farklı dizilere sahip olup, kalıp DNA'nın karşılıklı dizilerine bağlanırlar. Kalıp DNA ilk önce primerlerin varlığında denatüre edilir. Reaksiyon karışımı daha sonra, kalıp dizilere, primerlerin bağlanması için gereken sıcaklığa düşürülür. Bağlanmış olan primerler, uygun sıcaklığa çıkartılarak DNA polimeraz ile uzatılması sağlanır (148).

2.4.2. Primerler

Oligonükleotid primerler, primer sentezi yapan laboratuvarlardan veya ticari firmalardan elde edilirler (149). Oligonükleotidler genellikle 18–30 baz arasında sentezlenir ama daha az karmaşık olan DNA'ların (plazmidler veya daha önceden amplifiye edilen DNA'lar) amplifikasyonu için daha kısa primerler kullanılabilir (149,150). Bir PCR'da başarılı bir amplifikasyon için önemli değişkenlerden biri, primerlerin doğru tasarlanmasıdır. İyi tasarlanmış primerler arka plan ve özgül olmayan ürünlerin oluşmasını engellemeye yardımcı olur (148). Primer dizilerinin G+C içeriği, amplifiye edilecek bölgenin G+C içeriğine yakın olmalıdır. Özellikle 3' ucunda sekonder yapılar taşıyan dizilerden kaçınılmalıdır. Primerler birbirleriyle komplementer oluşturacak nitelikte olmamalıdır. Uzun primerler (24–30 bazlık) 60°C ve üzerindeki bağlanma sıcaklığında oldukça iyi çalışmaktadır (150).

Düşük konsantrasyonda primer kullanımı az miktarda reaksiyon ürünü elde edilmesine, yüksek konsantrasyonlarda kullanım ise düşük spesifikiteye neden olur ki bu durum jelde çok farklı ampikonların tespiti ile mümkündür. Ancak yüksek primer konsantrasyonları, primer-dimer artefaktlarının oluşmasına da neden olmaktadır. Primerlerin genellikle 0.1–0.5 µM arasındaki derişimi en elverişli olanıdır (148). Sık aralıklarla tekrarlayan dondurup-çözdürme olmaksızın hazırlanan primerler –20°C'de amonyumlu sıvılarda uygun bir şekilde saklanabilirler (150).

2.4.3 Polimeraz zincir reaksiyonu evreleri

Polimeraz zincir reaksiyonunda 3 temel basamak vardır. Çoğaltılmış ürün miktarı, teorik olarak bu üç adımın tekrarlanma sayısına bağlıdır. İlk basamak, çift iplikli hedef DNA'nın ısı ile (95°C) tek iplikli DNA'ya denatürasyonudur. Sonra ikinci basamak, ortamın 55°C'ye soğutulması ile primerlerin DNA'ya bağlanmasıdır. Son basamak ise, sıcaklığın 75°C'ye yükseltilmesi ile yeni DNA zincirlerinin sentezlenmesidir (151).

Polimeraz zincir reaksiyonu uygulamalarında üç evre bir döngü olarak kabul edilmektedir. Bir döngü 3-5 dakika sürer. Bir döngü sonunda sentezlenen ürün, öncekinin iki katı kadardır. Döngü sayısı “n” olarak kabul edilirse “2n”, çoğaltılmış DNA materyali miktarını verir. En uygun siklus sayısı hedef DNA'nın başlangıç konsantrasyonuna bağlı olarak değişkenlik gösterir. Siklus sayısının gerekenden fazla olması istenmeyen ürünlerin sentezinin artmasına neden olur. Yaklaşık 2-3 saat süren 20 döngülük bir reaksiyon sonunda 1.048.576 amplifikasyon ürünü, 30 siklus sonunda ise 270.000.000 amplifikasyon ürünü elde edilir. İdeal siklus sayısı 25-35 arasındadır (152).

2.4.4 Amplifikasyon ürünlerinin elde edilmesi

2.4.4.1 Agaroze jel elektroforezi

Hedef bölgenin amplifikasyonundan sonra, elde edilen ürünlerin bir şekilde belirlenmesi ve analizlerinin yapılması için uygulanan en basit konvansiyonel yöntem agaroz jel elektroforezidir (151). Elde edilen PCR ürünlerinin parça büyüklükleri, çalışmanın en başında bellidir. Seçilen veya dizayn edilen primerlerin hedefledikleri bölge literatür bilgileri ile bilinir. PCR’da elde edilecek olan fragment büyüklüklerinde aynı olması gerekir. Bunun tespiti, elektriksel bir ortamda molekül ağırlığına göre ayrımının sağlandığı elektroforez metodlarıyla gerçekleştirilir. DNA negatif elektrik ile yüklü olduğundan dolayı pozitif kutuba doğru göç eder. Agaroz jeli, porlu bir yapıya sahip olduğundan, elektriksel ortamda göç eden DNA fragmentlerini büyüklüklerine göre birbirinden ayırır. Jel ya elektroforezden önce veya elektroforezden sonra Etidyum Bromid gibi bir DNA boyası ile boyanır. Bu boya 312 nm dalga boyundaki UV (Ultraviyole, mor ötesi) ışığı ile floresan vermektedir (151,152). Bu sebeple, Et-Br ile boyanmış jel UV transilüminatöründe görüntülenir ve fotoğrafı çekilerek incelenir. İstenen büyüklükteki DNA fragmentlerinin tespit edildiği örnekler “pozitif” kabul edilir. Fragment büyüklüğü hesaplamalarında, ticari olarak temin edilebilen standart DNA molekül ağırlığı kullanılmaktadır (150).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Grubu Seçimi

Çalışmaya Temmuz 2009 ile Temmuz 2012 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı'na başvuran, adrenal insidentaloma tanısı alan 63 hasta dahil edildi. Herhangi bir nedenle BT yada MRG ile abdominal görüntülemesi yapılmış, sürrenal bezleri normal olarak saptanmış, bilinen herhangi bir kronik hastalığı olmayan 35 sağlıklı birey kontrol grubu olarak çalışmaya alındı. Adrenal insidentaloma tanısı ile çalışmaya alınma kriteri olarak, yapılan görüntüleme yöntemlerinin adrenal bezle ilişkilendirilmeyen belirti ve bulgu nedeniyle istenmiş olması, olgunun bilinen bir malignitesinin olmaması ve adrenal kitle lezyon çapının 1 cm den büyük olması kriterleri kullanıldı.

Adrenal insidentaloma tanısı konulan hastaların Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı'nda yapılmış olan malignite ve hormonal değerlendirme tetkikleri dosyalarından kaydedildi. Hormonal değerlendirme tetkikleri olarak, 1 mg deksametazon baskılama testi, 24 saatlik idrarda metanefrin, normetanefrin, vanilmandelik asit, serum potasyumu, plazma aldosteron/PRA oranları değerlendirilmiştir. Bilateral adenom saptanan hastalardan 17-OH progesteron düzeyi bakılmıştır. Subklinik Cushing sendromu açısından, 1 mg deksametazon supresyon testi sonrası kortizol değeri $<1.8\text{mg/dl}$ olması normal olarak kabul edilmiştir. Bir mg deksametazon baskılama testi ile kortizol değeri baskılanamayan ($>1.8\text{mg/dl}$) hastalara 2 mg deksametazon baskılama testi, 24 saatlik idrarda serbest kortizol düzeyi ve diürenal ritimi değerlendirmek için gece yarısı venöz kortizol düzeyi bakılmıştır. Subklinik Cushing sendromu saptanan ve bilateral adrenal insidentaloması olan hastaların sabah ACTH düzeyleri değerlendirilmiştir. Primer hiperaldosteronizm açısından plazma aldosteron/PRA oranı <20 saptanan hastalara salin infüzyon testi ile doğrulama yapılmıştır.

Çalışma öncesinde Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alındı. Etik kurul onayı alındıktan sonra çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı ile İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalı işbirliği ile gerçekleştirildi. Hastalara ve kontrol grubuna çalışmanın amacı, yapılacak işlemler hakkında bilgi verildi ve çalışmayla ilgili olarak düzenlenmiş olan bilgilendirilmiş onam formu verilerek yazılı onamları alındı.

3.2. Çalışma Protokolü ve Testler

3.2.1 Hasta Alımı

Çalışmaya katılmayı kabul eden hastalara ve sağlıklı kontrol grubuna telefonla ulaşıldı. Hastalara tarafımızdan randevu verildi. Hastaların EDTA'lı bir tüpe 3-5 cc venöz kanları alındı. Çalışma, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı ile Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalının ortaklaşa yürüteceği bir çalışma olarak dizayn edildi. Literatür taramasında daha önce adrenal insidentalomalı hastalarda JAK2 mutasyonunu değerlendiren yapılmış benzer çalışma olmadığı için çalışmanın gücü ve örneklem büyüklüğü hesaplanamadı. Adrenal insidentaloması olan hastalar, adenom boyutu, hormonal aktivite (hiperaldostero-nizm, feokromositoma, subklinik cushing sendromu, fonksiyone olmayan benign adenom) ve malignite değerlendirme sonuçlarına göre gruplandırıldı.

3.2.2 Kan örneklerinden genomik DNA'nın izole edilmesi

Kontrol grubu ve hastalardan temin edilen kanlardan 24 saat içinde aşağıda belirtilen yöntem ile total genomik DNA izolasyonu yapıldı.

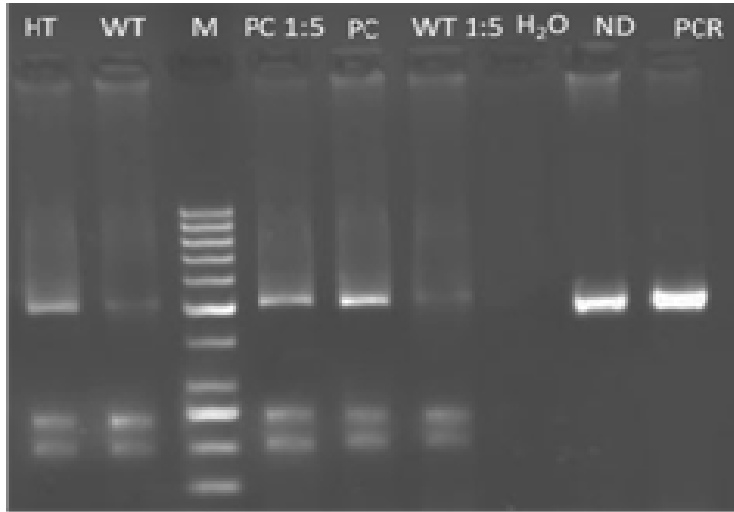
- 200 µl kan örneğine 20 µl proteinaz K ve 20 µl RNaseA eklendi ve iyice homojenize edildikten sonra 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 200 µl lizis tamponu eklendi ve homojen bir solüsyon elde edildi
- Elde edilen solüsyon 55°C de 10 dakika inkübe edildi
- 200 µl %96-100 etanol oluşan lizata eklenerek homojenizasyon sağlandı
- Lizat DNA'yı tutabilen özel kolonlara aktarıldı ve 10,000xg'de 1 dakika oda sıcaklığında santrifüjlendi
- Kolona 500 µl etanol içeren yıkama solüsyonu 1 eklenerek 10,000xg'de 1 dakika santrifüj yapıldı
- Kolon 500 µl yıkama solüsyonu 2 ile muamele edildi ve maksimum hızda 3 dakika santrifüjlendi
- Kolon steril bir santrifüj tüpüne alınarak üzerine 50 µl elüsyon tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi
- Maksimum hızda santrifüj yapıldıktan sonra saf genomik DNA örneği elde edildi.
- İzole edilen DNA'ların saflığı ve miktarı 260 nm de absorbans ölçümü yapılarak tayin edildi.

3.2.3 JAK2 V617F PCR/RFLP Testi

Katılımcıların venöz kan örneklerinden DNA izole edilmesini takiben, JAK2 geninin 12. eksonunu mutasyon bölgesini de kapsayacak şekilde amplifiye etmek amacıyla bir PCR geliştirildi. JAK2'nin 502 baz çifti (bç) uzunluğundaki fragmenti V617F genotip analizi için, belirtilen primer çiftleri ile LightCycler ver:1.5 (Roche Diagnostic) cihazında amplifiye edildi. JAK2 ileri primer: 5'-CAC AGG GGT TTC CTC AGA ACG-3' ve geri primer JAK2: 5'-

TCT ATT GTT TGG GCA TTG TAA CCT TC-3' (ThermoFisher Scientific) PCR reaksiyonlarında kullanıldı. 10 µl' lik reaksiyon karışımı, 25 mM MgCl₂, 1 µM her bir primerden, 2 µl Fast Start SyberGreen hibridizasyon probu ve 3 µl genomik DNA' dan oluşmaktadır. 95°C' de 10 dakika denatürasyon basamağından sonra, 40 sikluluk PCR reaksiyonu [95 °C' de 10 s; 60 °C' de 7 s; 72 °C' de 7 s: tek ölçüm] ile DNA çoğaltıldı. Erime eğrisi analizi [95 °C' de 0 s; 65 °C' de 15 s; 95 °C' de 0 s: sürekli ölçüm] basamaklarını takiben, 40 °C' de 30 s soğuma ile PCR reaksiyonu tamamlandı.

Polimeraz zincir reaksiyonunun %2 jel elektroforezi ile konfirmasyonu sonrasında (502 bç. lik JAK2 fragmenti verilmektedir) genotiplendirme, restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemine göre yapıldı. 3 µl PCR ürünü, 3U BsaXI restriksiyon enzimiyle (New England Biolabs, Westburg B.V., Leusden, The Netherlands) 37 °C' de 4 saat kesilmiş ve kesilen ürünler %2 agaroz jelde görüntülenmiştir. 502 bç.lik PCR ürünü, JAK2 V617F mutasyonu yokken (yabanıl tip) 246 bç., 226 bç. ve 30 bç. lik fragmentler meydana getiriyorken; JAK2 V617F mutasyonu varlığında 502 bç. lik PCR ürünü kesilmeden kalmaktadır (mutant). Heterozigot genotipli olgularda ise tüm fragmentler gözlenmekte ve PCR ürünü 502 bç., 246 bç., 226 bç. ve 30 bç.'e kesilmektedir (Resim 1).



Resim 1. JAK2 V617F'nin PCR/RFLP yöntemi ile değerlendirilmesi: Agaroz jelde elektroforez sonrası parçalanmış PCR ürünlerini göstermektedir.

HT (heterozigot); JAK2 V617F için heterozigot olarak tespit edilen örneği göstermektedir.

WT - WT 1:5; yabanıl tip kontroldür.

PC – PC 1:5; pozitif kontroldür. Bilinen bir heterozigot örnek ve 01:05 sulandırılmış biçimi.

ND; parçalanmamış, BsaXI enzim olmadan

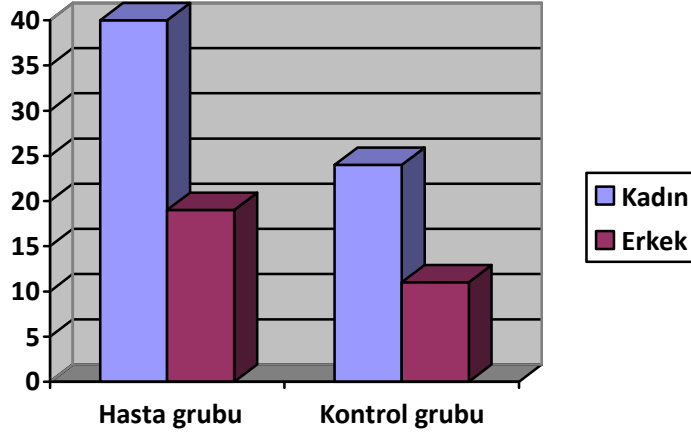
PCR; 502 bp uzunluğunda PCR ürünü.

3.3. İstatistiksel analiz

Çalışmadan elde edilen veriler SPSS 17.0 (Statistical Package for the Social Science, version 17.0) kullanılarak değerlendirildi. Verilerin analizlerinin karşılaştırılmasında Kolmogorov-Smirnov testi ile dağılım yapıları değerlendirildikten sonra Student T Test, Mann-Whitney U testleri ve chi-square kullanıldı. p değeri <0.05 olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya Temmuz 2009 ile Temmuz 2012 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji ve Metabolizma Bilim dalında tanı konulan 63 adrenal insidentaloma tanılı hasta ile 35 sağlıklı kontrol (11 erkek, 24 kadın) alındı. Adrenal insidentalomalı 4 hastanın alınan venöz kan örneğinden teknik olarak yeterli miktarda DNA elde edilemediği için 4 hasta çalışma dışı bırakıldı. Böylece, adrenal insidentalomalı 59 hasta (19 erkek, 40 kadın) değerlendirmeye alındı.

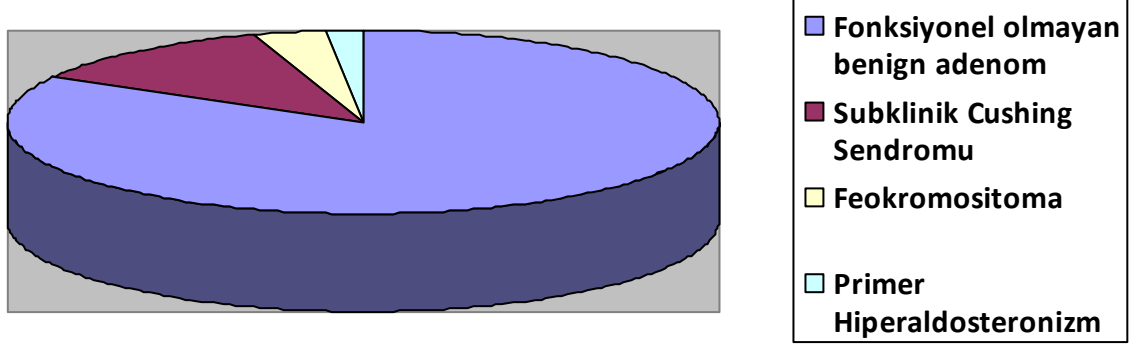


Şekil 3. Cinsiyet dağılımı

Çalışmaya alınan adrenal insidentalomalı hastaların ortalama yaşı 58.83 ± 12.56 , sağlıklı kontrol grubunun 56.06 ± 8.82 olup iki grup arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p > 0.05$). Adrenal insidentaloma olarak değerlendirilen 59 hastanın 7'sinde subklinik Cushing sendromu, 2 hastada primer hiperaldosteronizm ve 1 hastada feokromositoma saptandı. Geriye kalan 49 hasta fonksiyonel olmayan adrenal insidentaloma olarak değerlendirildi (Tablo 2).

Tablo 2. Adrenal insidentalomalı hastaların fonksiyonel değerlendirme sonuçları

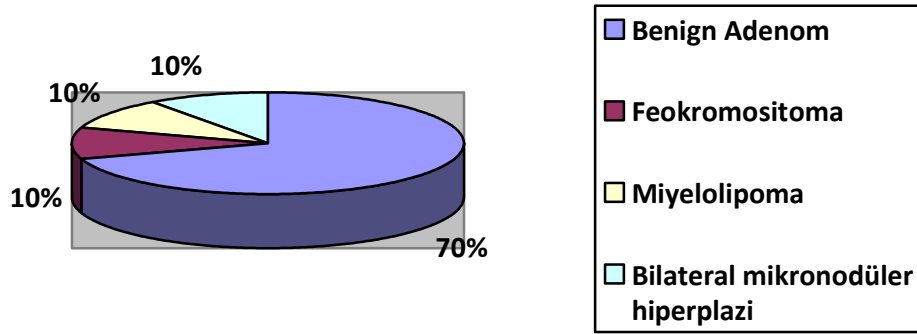
Adrenal insidentaloma fonksiyon durumu	Hasta Yüzdesi (n=59)
Fonksiyonel olmayan benign adrenal adenom	%83.1
Subklinik Cushing Sendromu	%11.9
Primer Hiperaldosteronizm	%3.4
Feokromositoma	%1.7



Şekil 4. Adrenal insidentalomalı hastaların fonksiyon durum grafiği

Adrenal insidentalomalı hastaların ortalama adenom çapı 23.10 ± 11.75 mm (en küçük 10 mm, en büyük 75 mm) olarak saptandı. Hastaların 28'inde adenom (%47.5) sol adrenalde, 25'inde (%42.4) sağ adrenalde olup 6 (%10.2) hastada bilateraldi.

Hastalardan 10 tanesi opere edilmişti. Opere edilme endikasyonları ise, 9 hastada biyokimyasal tarama testleri sonucunda fonksiyonel olarak saptanması (6'sı subklinik Cushing sendromu, 2'si primer hiperaldosteronizm, 1'i feokromositoma), 1 hastada radyolojik görüntüleme yöntemlerinde kitlenin büyük çapının 7.5 cm olması idi. Subklinik cushing sendromlu 1 hasta operasyonu kabul etmemesi nedeniyle opere edilmemişti. Patoloji sonuçları, 7 hastada benign sürrenal adenom, 1 hastada bilateral mikronodüler hiperplazi, 1 hastada feokromositoma ve 1 hastada (fonksiyonel olmayan, 7.5 cm kitle olan hasta) miyelolipom olarak saptandı.



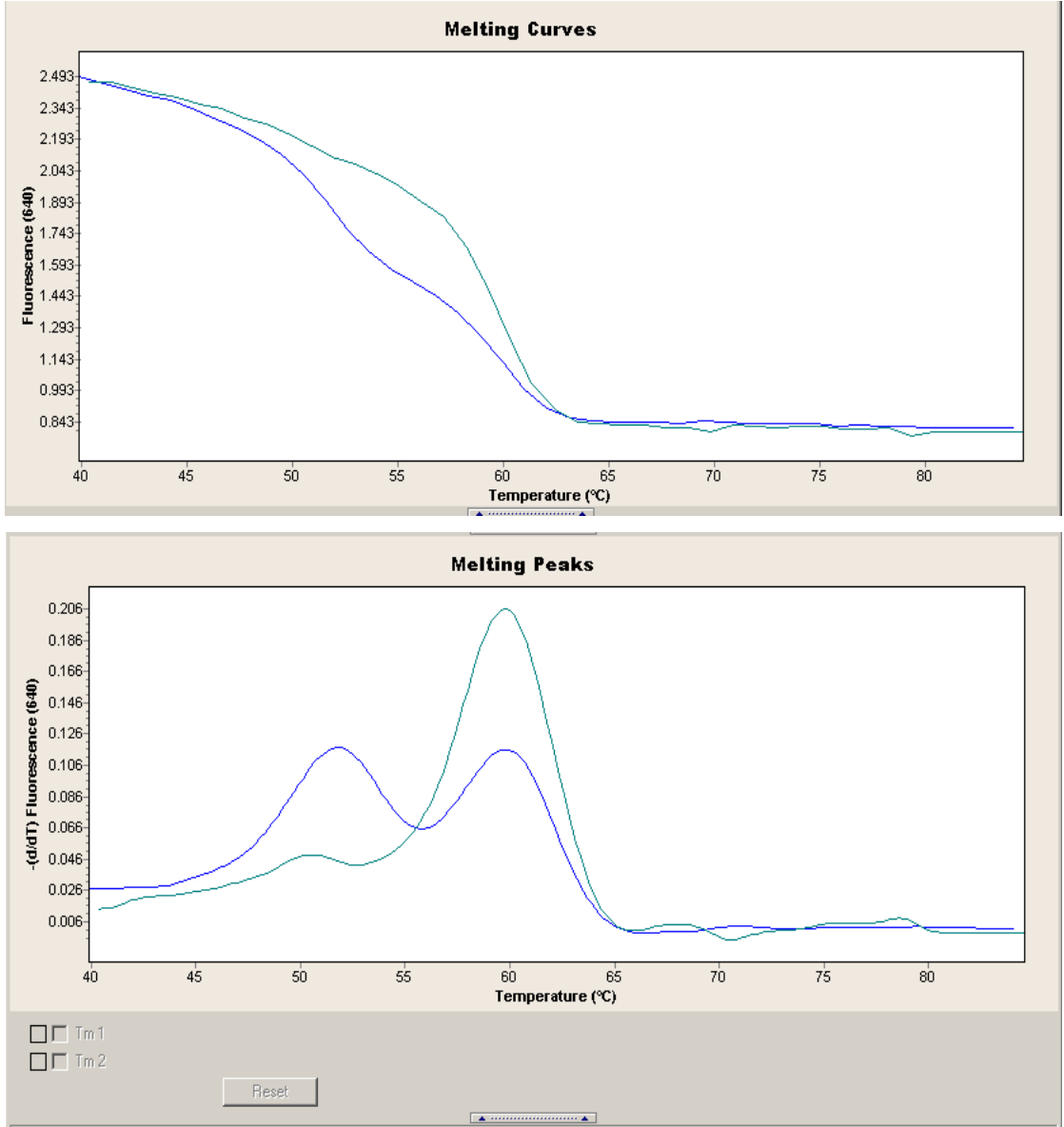
Şekil 5. Opere edilen adrenal insidentalomaların patoloji sonuçlarının dağılımı

Adrenal insidentalomalı hastaların 14'ünde (%23.7) DM, 34'ünde (%57.6) hipertansiyon tanısı mevcuttu. Hastaların ortalama vücut kitle indeksi (VKİ) $29.2 \pm 5.13 \text{ kg/m}^2$, sağlıklı kontrol grubunun ise $26.31 \pm 5.7 \text{ kg/m}^2$ olup 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p=0.013$). Fonksiyonel olmayan adrenal insidentalomalı hasta grubumuzun VKİ $29.09 \pm 5.16 \text{ kg/m}^2$ olup kontrol grubuna göre anlamlı yüksek saptandı ($p=0.021$). Subklinik Cushing sendromlu 7 hastanın 5'inde DM ve 5'inde de hipertansiyon mevcuttu. Feokromositomalı 1 hastada hipertansiyon tanısı mevcut olup, DM tanısı bulunmamaktaydı. Primer hiperaldosteronizmi 2 hastada da hipertansiyon mevcuttu. Fonksiyonel olmayan benign adenomu olan 49 hastanın 9'unda (%18.37) DM, 26'sında (%53.06) hipertansiyon tanısı mevcuttu (Tablo 3).

Tablo 3. Adrenal insidentalomalı hastalarda DM ve hipertansiyon sıklığı

	DM (%)	Hipertansiyon (%)
Fonksiyonel olmayan benign adenom (n=49)	18.37	53.06
Subklinik Cushing sendromu (n=7)	71.43	71.43
Primer hiperaldosteronizm (n=2)	-	100
Feokromositoma (n=1)	-	100

Adrenal insidentalomalı 3 hastada JAK2 V617F mutasyonu pozitif saptandı. Hastalardan 2 tanesi heterozigot, 1 tanesi homozigot olarak pozitif idi. Resim 2. de JAK2 V617F mutasyonu heterozigot pozitif saptanan bir hastanın Real Time PCR'da erime eğrileri ve erime piki verilmiştir.



Resim 2. Real time PCR ile erime eğrisi analizi ve genotiplendirme (JAK2 V617F mutasyon heterozigot pozitif)

Adrenal insidentaloması olmayan sağlıklı kontrol grubunun tamamında JAK2 V617F mutasyonu negatif saptandı. Adrenal insidentalomalı hastalarda JAK2 V617F mutasyon pozi-

tiflik görülme oranı %5.1 olarak değerlendirildi. Sağlıklı kontrol grubunda ise %0 olarak saptandı. Ancak adrenal insidentalomalı hastalar ile sağlıklı kontrol grubu JAK2 V617F mutasyonu görülmesi açısından karşılaştırıldığında her 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$).

JAK2 V617F mutasyonu pozitif saptanan 3 hasta fonksiyonel olmayan adrenal insidentaloma olarak değerlendirildi. Adenomların büyük çapları 30 mm, 13 mm ve 10 mm idi. Radyolojik görüntülemelerde malignite düşündüren bulgu yoktu. Hastaların yaşları 82, 73 ve 38 idi. Olgulardan 73 yaşındaki erkek olguda eşlik eden diğer hastalıklar Tip 2 DM ve hipertansiyondu. Diğer 2 olguda esansiyel trombositoz tanısı mevcuttu.

Adrenal insidentaloma grubundaki hastalardan, hormonal değerlendirmede fonksiyonel saptananlar ile adrenal miyelolipom saptanan olgu çıkarıldıktan sonra geriye kalan 48 fonksiyonel olmayan benign adrenal adenomlu olgularla sağlıklı kontrol grubu JAK2 V617F mutasyonu açısından karşılaştırıldığında da anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$).

Adrenal insidentalomalı hastalar ile sağlıklı kontrol grubu arasında tam kan sayımı (hemoglobin, lökosit, trombosit) ve biyokimyasal parametrelerden üre, kreatinin, aspartat amino transferaz, alanin amino transferaz, alkalen fosfataz, gama glutamil transferaz, sodyum, potasyum, kalsiyum değerleri arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 4).

Tablo 4. Gruplar arasında hematolojik parametrelerin karşılaştırılması

	Adrenal insidentalomalı hasta grubu (n=59)	Sağlıklı kontrol grubu (n=35)	p
Hemoglobin (g/dl)	12.96±1.43	12.54±1.31	>0.05
Lökosit (/mm ³)	7388.3±1250.2	7000.3±1284.6	>0.05
Trombosit (/mm ³)	327980±244651	270690±51818	>0.05

*Değerler ortalama ± SD olarak verildi. Student's t testi kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Adrenal insidentaloması olan hastaların açlık venöz glukoz düzeyi 115.11±50.14 mg/dl olup sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı yüksek saptandı ($p=0.003$). Her 2 grup arasında lipid parametreleri değerlendirildiğinde; LDL, total kolesterol, serum trigliserid düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptanamazken ($p>0.05$), adrenal insidentalomalı hasta grubun-

da HDL değeri sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı (p=0.001) (Tablo 5).

Tablo 5. Gruplar arasında lipid parametrelerinin ve glukoz düzeyinin karşılaştırılması

	Adrenal insidentaloma- malı hasta grubu (n=59)	Sağlıklı kontrol grubu (n=35)	p
Açlık venöz glukoz (mg/dl)	115.11±50.14	89.31±7.69	0.003*
LDL (mg/dl)	124.12±35.82	114.15±36.57	>0.05*
HDL (mg/dl)	45.47±9.07	53.17±10.82	0.001*
Trigliserid (mg/dl)	131 (94-163.5)	102 (72-155)	>0.05**
Total kolesterol (mg/dl)	202.2±46.38	193.17±40.42	>0.05*

*Normal dağılım gösteren verilerde değerler ortalama $\pm$ SD olarak verildi. Student's t testi kullanıldı. p <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

**Normal dağılım göstermeyen verilerde değerler medyan, 25 ve 75. persentil olarak verildi. Mann Whitney U testi kullanıldı. p <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

TARTIŞMA

Görüntüleme yöntemlerinin yaygın olarak kullanılması ile birlikte, insidentaloma adı verilen, klinik olarak belirgin olmayan adrenal kitlelere sık rastlanmaya başlanılmıştır (1). Etiyopatogenezini araştırmak üzere yapılmış çalışmalar mevcuttur. Ancak tam olarak nedenleri ortaya konamamıştır. Çalışmamızda adrenal insidentaloma etiyolojisinde JAK2 V617F mutasyonunun araştırılması yapılmıştır. Çalışmamız sonucunda adrenal insidentalomalı hastalarda da %5.1 sıklığında görüldüğü saptanmış olup, ancak sağlıklı kontrollere göre anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Adrenal insidentaloma prevalansı özellikle 5. ve 7. dekad arasındada pik yapmaktadır (20). Çalışmamızdaki hastaların ortalama yaşı da literatürle uyumlu şekilde 58.83 ± 12.56 olarak saptandı. Adrenal insidentalomalar kadın ve erkekler arasında benzer oranda görülmektedir (1). Ülkemizden yapılmış bir çalışmada ise kadın/erkek oranı 2.41 olarak saptanmıştır (153). Bizim çalışmamızda da ülkemizde yapılmış olan çalışmanın sonuçlarına benzer şekilde adrenal insidentalomalı hastaların %67.8'ini kadın hastalar oluşturmaktaydı.

Adrenal kitleler hastaların %50-60'ında sağ adrenal bezde, %30-40'ında sol adrenal bezde ve %10-15 bilateral olarak görülmektedir (1). Bizim çalışmamızda da adrenal insidentaloma, literatürle uyumlu şekilde hastaların %47.5'inde sol adrenalde, %42.4'ünde sağ adrenalde ve %10.2 hastada bilateral saptandı.

Yapılan bir çalışmada benign olgular, adrenal insidentalomaların %97.4'ünü oluşturmaktadır (23). Farklı bir metanalizde, 14 çalışmada 3088 adrenal insidentalomalı hasta değerlendirilmiştir. Hastaların %73.9'u fonksiyonel olmayıp, %7'si subklinik Cushing sendromu, %4.7'si feokromositoma, %1.2'si aldosteron üreten adenom olarak değerlendirilmiştir. Hastaların %4.8'i adrenokortikal kanser olup, %2.3'ü metastaz olarak saptanmıştır (25). Retrospektif çok merkezli farklı bir çalışmada, adrenal insidentalomaların %85'i nonfonksiyonel iken, %9 kortizol sekrete eden ve subklinik CS'na neden olan adenom, %4 feokromositoma, %2 aldosteronoma bulunduğu bildirilmektedir (1).

Çömlekçi ve arkadaşlarının çalışmasında adrenal insidentalomalı hastaların %73.5'i fonksiyonel olmayan adenom, %12'si subklinik Cushing sendromu, %5.9'u feokromositoma, %4.4'ü Cushing Sendromu, %4.4'ü primer hiperaldosteronizm olarak saptanmıştır (153).

Bizim çalışmamızda literatürle uyumlu şekilde %83.1'i fonksiyonel olmayan adrenal adenom, %11.9'u subklinik Cushing sendromu, %3.4'ü primer hiperaldosteronizm, %1.7 feokromositoma olarak saptandı. Çalışmamızda 10 hastada doku tanısı mevcuttu. Bu 10 hastanın patoloji sonuçları değerlendirildiğinde, %70 benign sürrenal adenom, %10 bilateral mik-

ronodüler hiperplazi, %10 hastada feokromositoma ve %10 miyelolipom olarak saptandı. Hasta grubumuzun içinde adrenokortikal kanser ve metastaz saptanan bulunmamaktaydı.

Çok merkezli bir çalışmada, fonksiyonel olmayan adrenal insidentalomalı hastaların %41'inde arteriyel hipertansiyon ve %10'unda DM saptanmıştır (1). Erbil ve arkadaşlarının (33) çalışmasında ise fonksiyonel olmayan adrenal insidentalomalı hastaların %17.5'inde DM saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da ülkemizde yapılmış olan Erbil ve arkadaşlarının çalışmasına benzer şekilde fonksiyonel olmayan benign adenomu olan hastaların %18.37'sinde DM tanısı mevcuttu. Hastaların %53.06'sında hipertansiyon tanısı mevcuttu.

Yener ve arkadaşlarının (34) çalışmasından fonksiyonel olmayan benign adrenal insidentalomalı olguların ortalama VKİ $28.8 \pm 4.2 \text{ kg/m}^2$, Erbil ve arkadaşlarının (33) çalışmasında $29.4 \pm 2.7 \text{ kg/m}^2$, Muscogiuri ve arkadaşlarının (32) çalışmasında $27.3 \pm 6.4 \text{ kg/m}^2$ saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da literatüre benzer şekilde, fonksiyonel olmayan adrenal insidentalomalı hasta grubumuzun VKİ $29.09 \pm 5.16 \text{ kg/m}^2$ olarak saptandı. Çalışmamızın sonuçları, fonksiyonel olmayan benign adenomlara sahip hastalarda, metabolik sendrom bulgularının, insülin direncinin, DM'un ve hipertansiyonun sık olduğu görüşünü destekleyici niteliktedir (1,21,26,28,32-34).

Adrenal insidentalomaların etiyojisine yönelik olarak yapılmış çeşitli genetik çalışmalar mevcuttur. Adrenokortikal kanser ve adenomların etiyopatogenezinin değerlendirildiği bir çalışmada, karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) kullanılarak DNA sekans kopya değişiklikleri karşılaştırılmıştır. Adenom boyutu ve malignite ile DNA anomali sayısı arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Bu çalışmadaki genetik anomaliler, bir kromozomun tamamında veya bir kısmında kayıp yada artış ile ilişkili olarak gösterilmiştir. Malign adrenal tümörlerde en sık görülen değişiklikler; hastaların %50'sinde görülen kromozom 2, 11q ve 17p'de kayıp ve %50'sinde saptanmış olan kromozom 4 ve 5'de kazanım olarak gösterilmiştir (5). Yano ve arkadaşlarının (154) çalışmasında 8 sporadik adrenal benign tümör, 8 tekrarlayan adrenokortikal kanser ve 1 primer adrenokortikal kanser vakasında heterozigotisi kaybı gösterilmiştir. Adrenokortikal tümörlerin çoğu sporadik olmakla birlikte, Beckwith-Wideman (11p15.5), Li-Fraumeni (17p13'de p53 lokusu) ve MEN1 (11q13'de) gibi kalıtsal kanser formlarıyla birlikte bulunabilmektedir. (6,155-157). Sporadik olgularda da 11p kromozomunda değişiklikler tanımlanmıştır (158). Güney Brezilyalı adrenokortikal tümörü olan çocukların çoğunda germ line TP53 R337H mutasyonu saptanmıştır (159). Adrenokortikal tümörlerin patogeneğinde steroidojenik faktör-1 transkripsiyon faktör ekspresyonu ve kopya sayısında artış (7,160) ve alfa inhibin genin koruyucu rolünün kaybı gibi başka faktörler de suçlanmıştır (161). Yetişkin adrenokortikal tümörü olan hastaların değerlendirildiği başka bir çalışmada,

IGF-II gen ekspresyonu ve 11p15 bölgesinde anormallik karsinom vakalarında sık, ama adenom vakalarda nadir olarak saptanmıştır(162). Adrenal insidentalomalı hastaların %28'sinde CGH ile kromozomal değişiklikler saptanmıştır Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon ve mikrosatellit analizlerin kullanıldığı yaklaşımlar da, çeşitli kromozom ve lokusları etkileyen değişiklikler belirlenebilmiştir. Farklı bir çalışmada CGH ile benign tümörlerin %61'inde değişiklikler saptanmıştır. En sık saptanan değişiklik de kromozom 5,12,19 ve 4 de gösterilmiştir (5). Steroidojenik akut düzenleyici protein'in (StAR) steroidogenezde önemli rolü vardır. StAR gen mutasyonlarında konjenital lipoid adrenal hiperplaziler görülmektedir. Yapılan çalışmalarda adrenal insidentalomalarda da StAR gen mutasyonları tanımlanmıştır (163).

Ras proteinleri membran ilişkili proteinlerdir. Ras proteinleri (H,N,K) insan kanserlerinde en yaygın mutasyona uğramış onkogenlerdir (164). Onkogenik ras proteinleri 12, 13, 61. pozisyonadaki tek bir aminoasit değişikliği ile normal homologlarından farklıdır (165). Bu ras onkogenik proteininin GTPaz aktivite eksikliği, hücre proliferasyonunu kontrol eden normal düzenleyici mekanizmalarda düzensizlik ile sonuçlanabilmektedir (166). Adrenal tümörlerde p53 gen mutasyonları yüksek sıklıkta saptanmış olup tümörögenizde multigen kusurları olduğu öne sürülmüştür. Aynı zamanda onkogenlerin etkisi suçlanmıştır. Adrenal tümörü olan hastalarda yapılan bir çalışmada tümör dokusunun yaklaşık %46'sinde K-ras mutasyonu bulunmuştur (167). Farklı bir çalışmada adrenokortikal tümörlerde kodon 61'de N-ras mutasyonlarının tümör oluşumuna katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür (168). Adrenokortikal tümörü olan hastaların bir bölümünde BRAF/RAS ve EGFR mutasyonları saptanmıştır. Ras/ Raf/ MEK/ ERK ve EGFR yolaklarında aktive edici mutasyonu olan hastalarda inhibitörlerin, seçilmiş hastalarda klinik araştırmalarla hedefe yönelik tedaviler için araştırılabileceği öne sürülmüştür (169).

Janus kinaz 2 (JAK2), fosfoinozitol-3 kinazı, Ras'ı, MAP kinazı ve transkripsiyonu aktive eden STAT proteinlerini aktive etmektedir. Konstitütif aktivasyon hücre proliferasyonuna ve apoptozun disregüle olmasına yol açar (13). JAK2'deki mutasyon bir guaninin timidine yer değiştirmesidir. JAK2'nin kodon 617'sinde valinin fenilalanine yer değiştirmesi ile sonuçlanır. Çoğu sitokin reseptörleri birden fazla JAK kinaz ile ilişki kurabilir, fakat JAK2-eksik miyeloid öncüllerin eritropoetin, trombopoetin veya granülosit-monosit koloni stimülan faktöre cevap veremediği ve JAK2 eksikliğinin definitif eritropoezin yokluğu ile sonuçlandığı gösterilmiştir (135). Bu veri JAK2'nin miyeloid hücre çoğalmasında ve farklılaşmasında baskın JAK kinaz olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle, JAK2'de mutasyon kazanılması çeşitli miyeloid malignensi spektrumunda gözlemlenmektedir (14). Miyeloproliferatif hastalıkta veya diğer insan malignensilerinde günümüze kadar bu kodonda alternatif başka bir mu-

tasyon tanımlanmamıştır. JAK2 mutasyonu PV'lı hastaların yaklaşık olarak %95'inde bulunmaktadır (134). Mutant JAK2, in vivo kinaz aktivitesini artırır, BaF3 hücrelerini sitokin bağımsız hale getirir ve in vivo eritrositoza yol açar. V617F mutasyonu, PV dışında idiopatik miyelofibrozis ya da esansiyel trombositemili hastaların önemli bir oranında görülmektedir. Bu V617F JAK2 mutasyonunun diğer hematolojik maligniteler veya hematolojik olmayan tümörlere katkıda bulunup bulunmadığı konusu çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır (15,16). Uygunsuz JAK sinyalizasyonu çeşitli solid tümörlerin hayatta kalmasına ve hücre proliferasyonuna neden olmaktadır. 10507 katılımcının JAK2 mutasyonu için tarandığı bir çalışmada 18 kişide (%0.2) mutasyon pozitif saptanmış. Genel nüfustaki sıklığının düşük olmasına karşın, mutasyon pozitiflerin negatiflere göre miyeloproliferatif hastalık, hematolojik kanser, herhangi bir kanser görülme oranı ile mortalite riskinin arttığı saptanmıştır. JAK2 mutasyonu pozitif 18 hastada görülen hematolojik olmayan maligniteler, 2 hastada akciğer kanseri, 2 hastada meme kanseri, 2 hastada melanoma dışı deri kanseri olmakla birlikte diğerlerinde bazal hücreli deri kanseri, testis, beyin, karaciğer ve mesane kanseri olarak saptanmıştır. Bununla birlikte 4 hastada 2 farklı malignite birlikte saptanmıştır (16).

Bizim çalışmamızda ise 35 sağlıklı kontrolün hiçbirinde JAK2 V617F mutasyonu pozitif saptanmadı. Adrenal insidentalomalı 59 hastanın %5.1'inde JAK2 V617F mutasyonu pozitif saptandı. JAK2 V617F mutasyonun toplumdaki insidansının 10507 katılımcının tarandığı çalışmada %0.2 gibi düşük bir oranda pozitif olması, çalışmamızda adrenal insidentalomalı hasta grubundaki pozitiflik oranının 25 kat daha fazla olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızdaki kontrol grubunun sayısının az olması nedeniyle sağlıklı kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadığını düşünmekteyiz.

Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatör proteinleri, büyüme faktörü yanıtları ve sitokin aracılıklı transkripsiyon faktörlerinin bir ailesini oluşturmaktadır (170). Kalıcı STAT3 aktivasyonu onkojeniktir (171). Meme, prostat, baş-boyun, yumurtalık kanserleri, diğer solid ve hematolojik tümörleri içeren çeşitli insan kanserlerinde çok yaygındır (16). Sitokinler tarafından STAT aktivasyonu, Janus ailesi kinazları (JAK1, JAK2, JAK3 ve Tyk2) ile olmaktadır (172). JAK1, JAK2 ve Tyk2 her yerde eksprese edilmektedir. JAK3 ise sadece primer lenfoid doku ile sınırlıdır (173). Solid tümör hücre dizisinde STAT3 aktivasyon aracılıklı JAK ailesi kinazların merkezi bir rolü olduğu düşünülmektedir. STAT3 ve STAT5 kalıcı aktivasyonu, solid ve hematolojik tümörlerde, tümör hücre proliferasyonu, hayatta kalma, metastaz ve tümör destekli inflamasyonda artışa neden olmaktadır (17). Kalıcı aktif STAT3 akciğer adenokarsinomlarında % 50 bulunmuş ve öncelikle epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) mutasyon barındıran tümörlerinde gözlenmiştir (174).

Pirazolil pirimidin AZD1480, JAK2 kinazın güçlü bir kompetitif ATP inhibitörüdür. JAK inhibisyonu, STAT3 aktivasyonu üzerine etkisiyle tümör büyümesini bastırabilmektedir. Bu veriler miyeloproliferatif neoplazmlar dışındaki tümörler için de moleküler bir hedef olarak JAK'ın olabileceğini doğrulamıştır. Kalıcı STAT3 aktivasyonu barındıran insan solid tümörlerin tedavisinde JAK inhibitörleri gelişimini desteklemektedir. JAK2 mutasyonunun saptanması hedeflenmiş moleküler tedavi açısından müdahale noktası olabilecektir (175).

Pekçok hematolojik ve solid tümör etiopatogenezinde saptanan düzensiz JAK sinyalizasyonunun ve JAK2 V617F mutasyonunun, literatür taramamızda adrenal tümörlerde daha önce araştırılmadığı görülmüştür. Bu nedenle adrenal insidentalomaların etiyolojisinde daha önce araştırılmayan JAK2 V617F mutasyonu tarafımızdan ilk kez değerlendirilmiştir. Bu çalışmada adrenal insidentalomalı hastalarda JAK2 V617F mutasyonu %5.1 oranında saptanmıştır. Bu oran toplumda beklenen mutasyon oranına göre oldukça yüksektir. Bu sonuçlar, adrenal insidentalomaların etiopatogenezinde JAK2 V617F mutasyonunun etkisinin daha geniş serilerde araştırılmasının yararlı olacağını düşündürmektedir.

6. SONUÇLAR

Adrenal insidentaloma en sık 5.dekadda görülmektedir.

Ülkemizdeki çalışmalara benzer şekilde adrenal insidentalomalar, kadınlarda erkeklere göre daha sık görülmektedir.

Adrenal insidentalomaların %83.1'ini fonksiyonel olmayan adrenal insidentaloma, %11.9'unu subklinik Cushing sendromu, %3.4'ünü primer hiperaldosteronizm ve %1.7'ini feokromositoma oluşturmaktadır.

Adrenal insidentaloma nedeniyle opere edilen hastaların %70'i benign sürrenal adenom, %10'u bilateral mikronodüler hiperplazi, %10'u feokromositoma ve %10'u miyelolipom olarak saptanmıştır.

Hipertansiyon, obezite ve DM, fonksiyonel olmayan benign adenomu olan hastalara sık eşlik eden hastalıklardır.

Adrenal insidentalomalı hastalarda JAK2 V617F mutasyonu pozitifliği oranı %5.1 olarak saptanmıştır.

Sağlıklı kontrollerin tamamında JAK2 V617F mutasyonu negatif saptanmıştır.

Literatürde JAK2 V617F mutasyonun toplumdaki insidansının %0.2 gibi düşük bir oranda pozitif olması, adrenal insidentalomalı hasta grubundaki pozitiflik oranının toplumdaki sıklığına göre daha fazla olduğunu düşündürmektedir. Ancak, çalışmamızdaki kontrol grubunun sayısının az olması nedeniyle sağlıklı kontrol grubu ile anlamlı farklılık saptanmadığını düşünmekteyiz.

Pekçok hematolojik ve solid tümör etiyopatogenezinde saptanan düzensiz JAK sinyalizasyonunun ve JAK2 V617F mutasyonunun, literatür taramamızda adrenal tümörlerde daha önce araştırılmadığı görülmüştür. Bu nedenle adrenal insidentalomaların etiyolojisinde daha önce araştırılmayan JAK2 V617F mutasyonu tarafımızdan ilk kez değerlendirilmiştir. Bu çalışmada adrenal insidentalomalı hastalarda JAK2 V617F mutasyonu %5.1 oranında saptanmıştır. Bu oran toplumda beklenen mutasyon oranına göre oldukça yüksektir. Bu sonuçlar, adrenal insidentalomaların etiyopatogenezinde JAK2 V617F mutasyonunun etkisinin daha geniş serilerde araştırılmasının yararlı olacağını düşündürmektedir.

7. ÖZET

Amaç: Görüntüleme yöntemlerinin yaygın olarak kullanılması ile birlikte, insidentaloma adı verilen, klinik olarak belirgin olmayan adrenal kitlelere sık rastlanılmaya başlanılmıştır. Sık görülen adrenal insidentalomaların etyolojisi ve nedeni tam olarak bilinmemektedir. Etiyopatogenezini araştırmak üzere yapılmış çalışmalar mevcuttur. Ancak tam olarak nedenleri ortaya konamamıştır. Çeşitli kanser türlerinde düzensiz JAK sinyalizasyonuna ait kanıtlar mevcuttur. Uygunsuz JAK sinyalizasyonu çeşitli solid tümörlerin hayatta kalmasını ve hücre proliferasyonuna neden olmaktadır. Çalışmamızda, adrenal insidentalomaların etiyolojisinde daha önce araştırılmayan JAK2 mutasyonun araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmaya Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji ve Metabolizma hastalıkları bilim dalında tanı konulmuş ve hormonal değerlendirmesi tanımlanmış çalışmaya katılmayı kabul etmiş, gönüllü olur formu alınmış 59 adrenal insidentaloma hastası ile farklı bir sebeple çekilmiş abdominal BT'sinde adrenal adenom saptanmamış, bilinen bir hastalığı olmayan, benzer yaş grubunda sağlıklı kontrol alındı. JAK2 geni PCR ile çoğaltıldı. RFLP yöntemi ile JAK 2 V617F mutasyonu çalışıldı.

Bulgular: Çalışmaya adrenal insidentalomalı 59 hasta (19 erkek, 40 kadın) ile 35 sağlıklı kontrol (11 erkek, 24 kadın) alındı. Adrenal insidentalomalı hastaların ortalama yaşı 58.83 ± 12.56 , sağlıklı kontrol grubunun 56.06 ± 8.82 idi ($p > 0.05$). Adrenal insidentalomalı 3 hastada (%5.1) JAK2 V617F mutasyonu pozitif saptandı. Sağlıklı kontrol grubunun tamamında JAK2 V617F mutasyonu negatif saptandı. Ancak adrenal insidentalomalı hastalar ile sağlıklı kontrol grubu JAK2 V617F mutasyonu pozitifliği açısından karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmadı ($p > 0.05$).

Sonuç: Bu çalışmada adrenal insidentalomalı hastalarda JAK2 mutasyonu %5.1 oranında pozitif saptanmıştır. Bu oran toplumda beklenen mutasyon oranına göre oldukça yüksektir. Bu sonuçlar, adrenal insidentalomaların etiyopatogenezinde JAK2 mutasyonunun etkisinin daha geniş serilerde araştırılmasının yararlı olacağını düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Adrenal insidentaloma, JAK 2 mutasyon, polimeraz zincir reaksiyonu

8. SUMMARY

RELATIONSHIP BETWEEN JAK2 V617F MUTATION AND ADRENAL INCIDENTALOMA

Objective: With the common use of imaging methods, the occurrence of so called incidentalomas; clinically silent adrenal masses; have been increased. There are studies that have been conducted in order to ascertain the etiopathogenesis. However, the exact reasons as not been established. Proofs of irregular JAK signalization are present in various cancer types. Inappropriate JAK signalization leads to the survival of various solid tumors and cell proliferation. In our study, our aim was to investigate the JAK2 mutation that was not hitherto assessed in the etiology of adrenal incidentalomas.

Material Methods: Fifty-nine patients with adrenal incidentaloma who had the appropriate diagnosis at Medical Faculty of Adnan Menderes University's Endocrinology and Metabolic Disorders Department and had a complete hormonal assay and signed the informed consent were enrolled in this study. A matching number of otherwise healthy individuals within the same age group who had an abdominal CT for non adrenal related reasons were enrolled as the control group. JAK2 gene was amplified by PCR. JAK 2 V617F mutation were studied by RFLP method.

Results: Fifty-nine patients (19 males, 40 females) with adrenal incidentaloma and thirty-five healthy volunteers (11 males, 24 females) were enrolled this study. Mean age was 58.83 ± 12.56 years in patients with adrenal incidentaloma and 56.06 ± 8.82 years in the control group ($p > 0.05$). JAK2 V617F mutation was positive in 3 patients (5.1 %) with adrenal incidentaloma. JAK2 V617F mutation were negative in all of the healthy control group. But, there was no significant difference between JAK2 V617F mutation positivity of patients with adrenal incidentaloma compared to control group ($p > 0.05$).

Conclusions: In this research, JAK-2 gene mutation in adrenal insidentoma patients is detected as possitive at the ratio of 5.1%. This ratio is above the estimated general population ratio. These results indicates us, it may be usefull, if 'the effects of JAK-2 gene mutation in adrenal insidentoma patients' have been researched with more many case series.

Keywords: Adrenal incidentaloma, JAK 2 mutation, polymerase chain reaction

9. KAYNAKLAR

- 1- Mantero F, Terzolo M, Arnaldi G. A survey on adrenal incidentaloma in Italy. Study group on adrenal tumors of the Italian society of endocrinology J Clin Endocrinol Metabol 2000;85:1440-8.
- 2- Herrera MF, Grant CS, van Heerden JA, Sheedy PF, Ilstrup DM. Incidentally discovered adrenal tumors: an institutional perspective. Surgery 1991;110:1014-21.
- 3- Bovio S, Cataldi A, Reimondo G, Sperone P, Novello S, Berruti A et al. Prevalence of adrenal incidentaloma in a contemporary computerized tomography series. J Endocrinol Invest 2006;29:298-302.
- 4- Aron D, Terzolo M, Cawood TJ. Adrenal incidentalomas. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 2012;26:69-82
- 5- Kjellman M, Kallioniemi OP, Karhu R, Höög A, Farnebo LO, Auer G, et al. Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy. Cancer Res 1996;15:4219-23
- 6- Rosati R, Cerrato F, Doghman M, Pianovski MA, Parise GA, Custódio G, et al. High frequency of loss of heterozygosity at 11p15 and IGF2 overexpression are not related to clinical outcome in childhood adrenocortical tumors positive for the R337H TP53 mutation. Cancer Genet Cytogenet. 2008;186:19-24.
- 7- Figueiredo BC, Cavalli LR, Pianovski MAD, Lalli E, Sandrini R, Ribeiro RC, et al. Amplification of the Steroidogenic Factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. J Clin Endocrinol Metab 2005;90:615-9
- 8- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorder. Lancet 2005;365:1054-61
- 9- Levine RL, Wadleigh M, Cools J. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. Cancer Cell 2005;7:387-97
- 10- James C, Ugo V, Le Couedic JP. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature 2005;434:1144-8
- 11- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. The New England Journal of Medicine 2005;350:1779-90
- 12- Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teqlund S. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. Cell 1998;93:385-9
- 13- Ihle JN. Cytokine receptor signalling. Nature 1995;377:591-41

- 14-Steensma DP, Dewald GW, Lasho T, Powell HL, McClure RF, Levine RL. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both “atypical” myeloproliferative disorders and the myelodysplastic syndrome. *Blood* 2005;106:1207-9
- 15-Scott LM, Campbell PJ, Baxter EJ, Todd T, Stephens P, Eddins S, et al. The V617F JAK2 mutation is uncommon in cancers and in myeloid malignancies other than the classic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005;106:2920-1
- 16-Nielsen C, Birgens HS, Nordestgaard BG, Kjaer L, Bojesen SE. The JAK2 V617F somatic mutation, mortality and cancer risk in the general population. *Haematologica* 2011;96:450-3.
- 17-Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009;9:798–809
- 18-Carroll TB, Aron DC, Findling JW, Tyrrell JB. Glucocorticoids and adrenal androgens. In: Gardner DG, Shoback D, Editors. *Greenspan’s Basic&Clinical Endocrinology*. Ninth Edition. Mc Graw Hill 2011;9:285-7
- 19-Young WF Jr. Clinical practice. The incidentally discovered adrenal mass. *N Engl J Med* 2007;356:601–10
- 20-T Mantero F, Albiger N. A comprehensive approach to adrenal incidentalomas. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2004;48:583–91
- 21-Grumbach MM, Biller BM, Braunstein GD, Campbell KK, Carney JA, Godley PA et al. Management of the clinically inapparent adrenal mass (‘incidentaloma’). *Ann Intern Med* 2003;138:424–9
- 22-Aron DC. Endocrine Incidentalomas. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2002; 29: 1–238.
- 23-Young WF, Jr. Kaplan NM, Eds. The adrenal incidentaloma. www.uptodate.com accessed 8.4.2008
- 24-Pacak K, Linehan WM, Eisenhofer G, Walther MM & Goldstein DS. Recent advances in genetics, diagnosis, localization, and treatment of pheochromocytoma. *Ann Intern Med* 2001;134: 315–29
- 25-Androulakis II, Kaltsas G, Piaditis G, Grossman AB. The clinical significance of adrenal incidentalomas. *Eur J Clin Invest* 2011; 41: 552–60
- 26-Kloos RT, Gross MD, Francis IR, Korobkin M, Shapiro B. Incidentally discovered adrenal masses. *Endocr Rev* 1995;16:460–84

- 27- Caplan RH, Strutt PJ, Wickus GG. Subclinical hormone secretion by incidentally discovered adrenal masses. *Arch Surg* 1994;129: 291-6.
- 28- Terzolo M, Pia A, Ali A, Osella G, Reimondo G, Bovio S et al. Adrenal incidentaloma: a new cause of the metabolic syndrome? *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:998–1003.
- 29- Fernandez-Real JM, Engel WR, Simo R, Salinas I, Webb SM. Study of glucose tolerance in consecutive patients harbouring incidental adrenal tumours. Study Group of Incidental Adrenal Adenoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;49:53–61.
- 30- Garrapa GG, Pantanetti P, Arnaldi G, Mantero F, Faloia E. Body composition and metabolic features in women with adrenal incidentaloma or Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5301–6.
- 31- Reincke M, Fassnacht M, Vāth S, Mora P, Allolio B. Adrenal incidentalomas: a manifestation of the metabolic syndrome? *Endocr Res.* 1996;22:757-61
- 32- Muscogiuri G, Sorice GP, Priolella A, Mezza T, Cipolla C, Salomone E, et al. The size of adrenal incidentalomas correlates with insulin resistance. Is there a cause-effect relationship? *Clin Endocrinol (Oxf).* 2011;74:300-5.
- 33- Erbil Y, Ozbey N, Barbaros U, Unalp HR, Salmaslioglu A, Ozarmagan S. Cardiovascular risk in patients with nonfunctional adrenal incidentaloma: myth or reality? *World J Surg.* 2009;33:2099-105
- 34- Yener S, Genc S, Akinci B, Secil M, Demir T, Comlekci A, Ertlav S, Yesil S. Carotid intima media thickness is increased and associated with morning cortisol in subjects with non-functioning adrenal incidentaloma. *Endocrine.* 2009;35:365-70
- 35- Siren J, Tervahartiala P, Sivula A, Haapiainen R. Natural course of adrenal incidentalomas: seven-year follow-up study. *World J Surg* 2000;24:579–82.
- 36- Anagnostis P, Karagiannis A, Tziomalos K, Kakafika AI, Athyros VG, Mikhailidis DP. Adrenal incidentaloma: a diagnostic challenge. *Hormones (Athens).* 2009;8:163-84
- 37- Barzon L, Sonino N, Fallo F, Palu G, Boscaro M. Prevalence and natural history of adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol* 2003;149: 273-85
- 38- Reincke M, Nieke J, Krestin G P, Saeger W, Allolio B, Winkelmann W, Preclinical Cushing's syndrome in adrenal "incidentalomas": comparison with adrenal Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:826-32
- 39- Ross NS. Epidemiology of Cushing's syndrome and subclinical disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1994;23:539-46

- 40- Barzon L, Fallo F, Sonino N, Boscaro M. Development of overt Cushing's syndrome in patients with adrenal incidentaloma. *Eur J Endocrinol* 2002;146: 61-6
- 41- Rossi R, Tauchmanova L, Luciano A, Di Martino M, Battista C, DelViscovo L, et al, Subclinical Cushing's syndrome in patients with adrenal incidentaloma: clinical and biochemical features. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85: 1440-8
- 42- Mansmann G, Lau J, Balk E, Rothberg M, Miyachi Y, Bornstein SR. The clinically inapparent adrenal mass: update in diagnosis and management. *Endocr Rev* 2004;25:309-40
- 43- Gopan T, Remer E, Hamrahian AH. Evaluating and managing adrenal incidentalomas. *Cleve Clin J Med*. 2006;73: 561-8
- 44- Sutton MG, Sheps SG, Lie JT. Prevalence of clinically unsuspected pheochromocytoma. Review of a 50-year autopsy series. *Mayo Clin Proc* 1981;56:354-60.
- 45- Beard CM, Sheps S G, Kurland LT, Carney JA, Lie JT. Occurrence of pheochromocytoma in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979. *Mayo Clin Proc* 1983;58: 802-4
- 46- Karagiannis A, Mikhailidis DP, Athyros VG, Harsoulis F. Pheochromocytoma: an update on genetics and management. *Endocr Relat Cancer* 2007;14: 935-56
- 47- Bravo EL, Tagle R. Pheochromocytoma: state-of-the-art and future prospects. *Endocr Rev* 2003;24: 539-53
- 48- Cicala MV, Sartorato P, Mantero F. Incidentally discovered masses in hypertensive patients. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006;20:451-66
- 49- Kudva YC, Sawka AM, Young WF Jr. Clinical review 164: The laboratory diagnosis of adrenal pheochromocytoma: the Mayo Clinic experience. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88: 4533-9
- 50- Motta-Ramirez GA, Remer EM, Herts BR, Gill IS, Hamrahian AH. Comparison of CT findings in symptomatic and incidentally discovered pheochromocytomas. *AJR Am J Roentgenol* 2005;185:684-8
- 51- Mannelli M, Ianni L, Cilotti A, Conti A. Pheochromocytoma in Italy: a multicentric retrospective study. *Eur J Endocrinol* 1999;141:619-24
- 52- Bernini GP, Vivaldi MS, Argenio GF, Moretti A, Sgro` M, Salvetti A. Frequency of pheochromocytoma in adrenal incidentalomas and utility of the glucagon test for the diagnosis. *J Endocrinol Invest* 1997;20:65-71
- 53- Bülow B, Ahre´n B. Adrenal incidentaloma—experience of a standardized diagnostic programme in the Swedish prospective study. *J Intern Med* 2002;252:239-46

- 54- Kim HY, Kim SG, Lee KW, Seo JA, Kim NH, Choi KM, et al. Clinical study of adrenal incidentaloma in Korea. *Korean J Intern Med* 2005;20:303–9
- 55- Kopetschke R, Slisko M, Kilisli A, Tuschy U, Wallaschofski H, Fassnacht M, et al. Frequent incidental discovery of pheochromocytoma: data from a German cohort of 201 pheochromocytoma. *Eur J Endocrinol* 2009;161:355–61
- 56- Pacak K, Eisenhofer G, Ahlman H, Bornstein SR, Gimenez-Roqueplo AP, Grossman AB, et al. Pheochromocytoma: recommendations for clinical practice from the First International Symposium, October 2005. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007;3:92–102
- 57- Nieman LK. Approach to the patient with an adrenal incidentaloma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:4106-13. Review
- 58- Terzolo M, Bovio S, Pia A, Reimondo G, Angeli A. Management of adrenal incidentaloma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009;23:233-43. Review
- 59- NIH state-of-the-science statement on management of the clinically inapparent adrenal mass ('incidentaloma'). *NIH Consens State Sci Statements* 2002;19:1-25
- 60- Ilias I, Pacak K. Current approaches and recommended algorithm for the diagnostic localization of pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:479–91
- 61- Kievit J, Haak HR. Diagnosis and treatment of adrenal incidentaloma. A cost-effectiveness analysis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000;29:69–90
- 62- Midorikawa S, Sanada H, Hashimoto S, Suzuki T, Watanabe T. The improvement of insulin resistance in patients with adrenal incidentaloma by surgical resection. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001;54:797–804
- 63- Karagiannis A, Tziomalos K, Kakafika A, Harsoulis F, Zamboulis C. Paralysis as first manifestation of primary aldosteronism. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19: 2418-9
- 64- Bernini G, Moretti A, Argenio G, Salvetti A. Primary aldosteronism in normokalemic patients with adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol* 2002;146: 523-9
- 65- Mazza A, Zamboni S, Armigliato M, Zennaro R, Cuppini S, Rempelou P, et al. Endocrine arterial hypertension: diagnostic approach in clinical practice. *Minerva Endocrinol* 2008;33: 127-46
- 66- Koschker A, Fassnacht M, Hahner S, Weismann D et al. Adrenocortical carcinoma – improving patient care by establishing new structures. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006;114:45–51.
- 67- Nawar R, Aron D. Adrenal incidentalomas—a continuing management dilemma. *Endocr Relat Cancer* 2005;12:585–98.

- 68-Latronico AC, Chrousos GP. Extensive personal experience: adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1317–24
- 69-Terzolo M, Ali M, Osella G, Mazza E. Prevalence of adrenal carcinoma among incidentally discovered adrenal masses. A retrospective study from 1989 to 1994. Gruppo Piemontese Incidentalomi Surrenali. *Arch Surg* 1997; 32: 914–19.
- 70-Ng L, Libertino JM. Adrenocortical carcinoma: diagnosis, evaluation and treatment. *J Urol* 2003;169:5–11.
- 71-Allolio B, Fassnacht M. Clinical review: adrenocortical carcinoma: clinical update. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2027–37.
- 72- Manassero F, Pomara G, Rappa F, Cuttano MG, Crisci A, Selli C. Adrenal myelolipoma associated with adenoma. *Int J Urol* 2004;11:326-8
- 73- Tamidari H, Mishra AK, Gupta S, Agarwal A. Catecholamine secreting adrenal myelolipoma. *Indian J Med Sci* 2006;60: 331-3.
- 74-Jung SI, Kim SO, Kang TW, Kwon DD, Park K, Ryu SB. Bilateral adrenal myelolipoma associated with hyperaldosteronism: report of a case and review of the literature. *Urology* 2007;70:1223
- 75-Angeli A, Osella G, Ali A, Terzolo M. Adrenal incidentaloma: an overview of clinical and epidemiological data from the National Italian Study group. *Horm Res* 1997;47:279-83
- 76- Berland L, Silverman S, Gore R, Mayo-Smith Wet, Megibow AJ, Yee J et al. Managing Incidental Findings on Abdominal CT: White Paper of the ACR Incidental Findings Committee. *American College of Radiology* 2010; 7: 754–73.
- 77-Hamrahian AH, Ioachimescu AG, Remer EM, Motta-Ramirez G, Bogabathina H, Levin HS et al. Clinical utility of noncontrast computed tomography attenuation value (hounsfield units) to differentiate adrenal adenomas/hyperplasias from nonadenomas: cleveland clinic experience. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:871–7.
- 78-Park B, Kim B, Ko K, Jeong S & Kwon G. Adrenal masses falsely diagnosed as adenomas on unenhanced and delayed contrast-enhanced computed tomography: Pathological correlation. *European Radiology* 2006;26:642–7
- 79-Boland GW, Hahn PF, Pena C, Mueller PR. Adrenal masses: characterization with delayed contrast-enhanced CT. *Radiology* 1997;202:693–6
- 80-Caoili EM, Korobkin M, Francis IR, Cohan RH, Platt JF, Dunnick NR et al. Adrenal masses: characterization with combined unenhanced and delayed enhanced CT. *Radiology* 2002;222:629–33

- 81-Sahdev A, Reznek RH. Imaging evaluation of the non-functioning indeterminate adrenal mass. *Trends Endocrinol Metab* 2004;15:271–6
- 82-Outwater EK, Siegelman ES, Huang AB & Birnbaum BA. Adrenal masses: correlation between CT attenuation value and chemical shift ratio at MR imaging with in-phase and opposed-phase sequences. *Radiology* 1996;200: 749–52
- 83-Outwater EK, Siegelman ES, Radecki PD, Piccoli CW & Mitchell DG. Distinction between benign and malignant adrenal masses: value of T1-weighted chemical-shift MR imaging. *AJR Am J Roentgenol* 1995;165: 579–83
- 84-Lockhart ME, Smith JK, Kenney PJ. Imaging of adrenal masses. *Eur J Radiol* 2002;41:95–112
- 85-Hennings J, Hellman P, Ahlstrom H & Sundin A. Computed tomography, magnetic resonance imaging and 11C-metomidate positron emission tomography for evaluation of adrenal incidentalomas. *European Journal of Radiology* 2009; 69: 314–23
- 86-Jana S, Zhang T, Milstein D, Isasi C et al. FDG-PET and CT characterization of adrenal lesions in cancer patients. *Eur J Nucl Mol Imaging* 2006; 33: 29–35
- 87-Ansquer C, Scigliano S, Mirallié E, Taïeb BL, [Brunaud L](#), [Sebag F](#) et al. F-FDG PET/CT in the characterization and surgical decision concerning adrenal masses: a prospective multicentre evaluation. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2010; 37: 1669–78
- 88-Mackie GC, Shulkin BL, Ribeiro RC, Worden FP, Gauger PG, Mody RJ et al. Use of [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography in evaluating locally recurrent and metastatic adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2665–71
- 89-Groussin L, Bonardel G, Silvera S, Tissier F, Coste J, Abiven G et al. 18F-Fluorodeoxyglucose positron emission tomography for the diagnosis of adrenocortical tumors: a prospective study in 77 operated patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:1713–22
- 90- Friedrich-Rust M, Schneider G, Bohle R, Herrmann E, [Sarrazin C](#), [Zeuzem S](#), et al. Contrast-Enhanced Sonography of Adrenal Masses: Differentiation of Adenomas and Nonadenomatous Lesions. *AJR* 2008;191:1852–60
- 91- Kievit J, Haak HR. Diagnosis and treatment of adrenal incidentaloma. A cost-effectiveness analysis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000;29:69

- 92- Quayle FJ, Spitler JA, Pierce RA, Lairmore TC, Moley JF, Brunt LM. Needle biopsy of incidentally discovered adrenal masses is rarely informative and potentially hazardous. *Surgery* 2007;142:497–502
- 93- Nieman LK, Biller BM, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, Montori VM. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1526–40
- 94- Findling JW, Raff H, Aron DC. The low-dose dexamethasone suppression test: a re-evaluation in patients with Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89: 1222-6
- 95- Reincke M. Subclinical Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000;29: 43-56
- 96- Newell-Price J, Trainer P, Besser M, Grossman A. 1998 The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states. *Endocr Rev* 1998;19:647-72
- 97- Tsagarakis S, Vassiliadi D, Thalassinou N. Endogenous subclinical hypercortisolism: diagnostic uncertainties and clinical implications. *J Endocrinol Invest* 2006;29:471-82
- 98- Katabami T, Obi R, Shirai N, Naito S, Saito N. Discrepancies in results of low-and high-dose dexamethasone suppression tests for diagnosing preclinical Cushing's syndrome. *Endocr J* 2005;52:463–9
- 99- Wood PJ, Barth JH, Freedman DB, Perry L, Sheridan B. Evidence of the low dose dexamethasone suppression test to screen for Cushing's syndrome recommendations for a protocol for biochemistry laboratories. *Ann Clin Biochem* 1997;34:222-9
- 100- Pecori Giraldi F, Ambrogio AG, De Martin M, Fatti LM, Scacchi M, Cavagnini F. Specificity of first-line tests for the diagnosis of Cushing's syndrome: assessment in a large series. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92: 4123-9
- 101- Yaneva M, Mosnier-Pudar H, Dugué MA, Grabar S, Fulla Y, Bertagna X. Midnight salivary cortisol for the initial diagnosis of Cushing's syndrome of various causes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89: 3345-51
- 102- Masserini B, Morelli V, Bergamaschi S, Ermetici F, Eller-Vainicher C, Barbieri AM, et al. The limited role of midnight salivary cortisol levels in the diagnosis of subclinical hypercortisolism in patients with adrenal incidentaloma. *Eur J Endocrinol* 2009;160:87–92

- 103- Invitti C, Pecori G, Iraldi F, de Martin M, Cavagnini F. Diagnosis and management of Cushing's syndrome: results of an Italian multicentre study. Study Group of the Italian Society of Endocrinology on the Pathophysiology of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:440-8
- 104- Sawka AM, Jaeschke R, Singh RJ, Young WF Jr. A comparison of biochemical tests for pheochromocytoma: measurement of fractionated plasma metanephrines compared with the combination of 24-hour urinary metanephrines and catecholamines. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:553-8.
- 105- Lenders JW, Pacak K, Walther MM, Linehan WM, Mannelli M, Friberg P, et al. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which test is best? *JAMA* 2002;287:1427-34
- 106- D'Herbomez M, Forzy G, Bauders C, Tierny C, Pigny P, Carnaille B, et al. An analysis of the biochemical diagnosis of 66 pheochromocytomas. *Eur J Endocrinol* 2007;156: 569-75
- 107- Peaston RT, Ball S. Biochemical detection of pheochromocytoma: why are we continuing to ignore the evidence? *Ann Clin Biochem* 2008;45:6-10.
- 108- Václavík J, Stejskal D, Lacnáč B, Lazarova M, Jedelsky L, Kadalova L, et al. Free plasma metanephrines as a screening test for pheochromocytoma in low-risk patients. *J Hypertens* 2007;25:1427-31
- 109- Gardet V, Gatta B, Simonnet G. Lessons from an unpleasant surprise: a biochemical strategy for the diagnosis of pheochromocytoma. *J Hypertens* 2001;19: 1029-35
- 110- Algeciras-Schimnich A, Preissner CM, Young WF Jr, Singh RJ, Grebe S K. Plasma chromogranin A or urine fractionated metanephrines follow-up testing improves the diagnostic accuracy of plasma fractionated metanephrines for pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 91-5
- 111- Bornstein S R, Stratakis CA, Chrousos G P. Adrenocortical tumors: recent advances in basic concepts and clinical management. *Ann Intern Med* 1999;130:759-71
- 112- Mulatero P, Milan A, Fallo F, Regolisti G, Pizzolo F, Fardella C, et al. Comparison of confirmatory tests for the diagnosis of primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2618-23.
- 113- Mulatero P, Dluhy RG, Giacchetti G, Boscaro M, Veglio F, Stewart PM. Diagnosis of primary aldosteronism: from screening to subtype differentiation. *Trends Endocrinol Metab* 2005;16:114-9.

- 114- Young WF. Primary aldosteronism: renaissance of a syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;66: 607-18.
- 115- Funder JW, Carey RM, Fardella C, Gomez-Sanches CE, Mantero F, Stowasser M, et al. Case Detection, Diagnosis, and Treatment of Patients with Primary Aldosteronism: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3266-81
- 116- Rossi GP, Sacchetto A, Chiesura-Corona M, De Toni R, Gallina M, Feltrin GP, et al. Identification of the etiology of primary aldosteronism with adrenal vein sampling in patients with equivocal computed tomography and magnetic resonance findings: results in 104 consecutive cases. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1083-90
- 117- Allolio B, Fassnacht M. Clinical review: Adrenocortical Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2027-37
- 118- Flecchia D, Mazza E, Carlini M, Blatto A, Olivieri F, Serra G, et al. Reduced serum levels of dehydroepiandrosterone sulphate in adrenal incidentalomas: a marker of adrenocortical tumour. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995;42:129-34
- 119- Osella G, Terzolo M, Borretta G, Magro G, Ali A, Piovesan A, et al. Endocrine evaluation of incidentally discovered adrenal masses (incidentalomas). *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1532-9
- 120- Luton JP, Martinez M, Coste J, Bertherat J. Outcome in patients with adrenal incidentaloma selected for surgery: an analysis of 88 cases investigated in a single clinical center. *Eur J Endocrinol* 2000;143:111-7
- 121- Kurtaran A, Traub T, Shapiro B. Development of overt Cushing's syndrome in patients with adrenal incidentaloma. *Eur J Radiol* 2002; 41: 123–30
- 122- Libe R, Dall'Asta C, Barbetta L, Baccarelli A, Beck-Peccoz P. Long-term follow-up study of patients with adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol* 2002; 147: 489–94.
- 123- Terzolo M, Reimondo G, Angeli A. Definition of an optimal strategy to evaluate and follow-up adrenal incidentalomas: time for further research. *Eur J Endocrinol* 2009;161: 529–32.
- 124- Vassilatou E, Vryonidou A, Michalopoulou S, Manolis J, Caratzas J, Phenekos C, et al. Hormonal activity of adrenal incidentalomas: results from a long-term follow-up study. *Clin Endocrinol* 2009;70:674–9.
- 125- Terzolo M, Bovio S, Reimondo G, Pia A, Osella G, Borretta G, et al. Subclinical Cushing's syndrome in adrenal incidentalomas. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. Endocrinol Metab Clin N Am* 2005;34:423–39.

- 126- Bernini G, Moretti A, Oriandini C, Bardini M, Taurino C, Salvetti A. Long-term morphological and hormonal follow-up in a single unit on 115 patients with adrenal incidentalomas. *British Journal of Cancer* 2005;92:1104–9
- 127- Barzon L, Fall F, Sonino N & Boscaro M. Development of overt Cushing's syndrome in patients with adrenal incidentaloma. *Eur J Endocrinol* 2002;146: 61–6
- 128- Linos DA, 2000 Adrenal incidentaloma (Adrenaloma). *Hormones (Athens)* 2: 12-21
- 129- Latronico AC, Chrousos GP. Extensive personal experience: adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1317-24
- 130- Ng L, Libertino JM. Adrenocortical carcinoma: diagnosis, evaluation and treatment. *J Urol* 2003;169: 5-11.
- 131- Izaki H, Fukumori T, Takahashi M, Taue R, Kishimoto T, Tanimoto S, et al. Indications for laparoscopic adrenalectomy for non-functional adrenal tumor with hypertension: usefulness of adrenocortical scintigraphy. *Int J Urol* 2006;13:677-81
- 132- Thompson GB, Grant CS, van Heerden JA, Schlinkert RT, Young WF Jr, Farley DR, et al. Laparoscopic versus open posterior adrenalectomy: a case-control study of 100 patients. *Surgery* 1997;6:1132-6
- 133- Winfield HN, Hamilton BD, Bravo EL, Novick AC. Laparoscopic adrenalectomy: the preferred choice? A comparison to open adrenalectomy. *J Urol* 1988;160:325-9.
- 134- Brunt LM, Doherty GM, Norton JA, Soper NJ, Quasebarth MA, Moley JF. Laparoscopic adrenalectomy compared to open adrenalectomy for benign adrenal neoplasms. *J Am Coll Surg* 1996;183:1-10
- 135- Figueiredo BC, Cavalli LR, Pianovski MAD, Lalli E, Sandrini R, Ribeiro RC, et al. Amplification of the Steroidogenic Factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:615–9
- 136- Jamieson CH, Gotlib J, Drocher JA, Chao MP, Mariappan MR, Lay M, et al. The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:6224-9
- 137- Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, Larbret F, Lecluse Y, Debili N, et al. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin dependent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp Hematol.* 2004;32: 179-187

- 138- Tefferi A, Sirhan S, Lasho TL, Schwager SM, Li CY, Dingli D et al. Concomitant neutrophil JAK2 mutation screening and PRV-1 expression analysis in myeloproliferative disorders and secondary polycythaemia. *Br J Haematol* 2005; 131: 166–71
- 139- Tefferi A. JAK2 mutations in myeloproliferative disorders. molecular mechanisms and clinical applications. *N Engl J Med* 2007; 356: 444–5
- 140- Karkucak M, Yakut T, Ozkocaman V, Ozkalemkas F, Ali R, Bayram M, et al. Evaluation of the JAK2-V617F gene mutation in Turkish patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Mol Biol Rep.* 2012;39:8663-7
- 141- Tefferi A. Essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis: Current management and the prospect of targeted therapy. *Am J Hematol.* 2008;83:491-7
- 142- Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM, McClure RF, Wadleigh M, Lee SJ et al. JAK2 mutation in essential thrombocythaemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. *Br J Haematol* 2005; 131: 208–13
- 143- Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005; 366:1945–53.
- 144- Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V. JAK2 mutation 1849G-T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia-chromosome negative CML and megakaryocytic leukemia. *Blood.* 2005;106:3370-3.
- 145- Campbell PJ, GriesshP, Mfer M, Dohner H, Kusec R, Hasselbalch HC, et al. V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2006; 107: 2098–100
- 146- Harper DR. *Molecular Virology: A Medical Perspectives Book*, 1st. Ed. UK: BIOS Scientific Publishers Limited, 1994;112
- 147- Martinez-Delgado B, Robledo M, Arranz E, Osorio A, Garcia MJ, Echezarreta G, et al. Hypermethylation of p15/ink4b/MTS2 gene is differentially implicated among non-Hodgkin's lymphomas. *Nature*, 1998;12:937-41.
- 148- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Book 2, 2nd. Ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989;1453-7
- 149- Temizkan G, Arda N. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. 1. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapları, 1999;19-68.

- 150- Taylor G.R. Polymerase chain reaction: basic principles and automation. In: McPherson M.J, Quirke P, Taylor G.R. PCR Volume 1: A Practical Approach, 1st. Ed., New York: Oxford University Press, 1991;1–14
- 151- Dong ZW, Shao P, Diao LT, Zhou H, Yu CH, Qu LH. RTL-P: a sensitive approach for detecting sites of 2'-O-methylation in RNA molecules. *Nucleic Acids Res.* 2012 Jul 24. [Epub ahead of print]
- 152- Biswal M, Ratho RK, Mishra B. Role of reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of human rabies. *Indian J Med Res.* 2012;135:837-42
- 153- Comlekci A, Yener S, Ertlav S, Secil M, Akinci B, Demir T, Kebapcilar L, Bayraktar F, Yesil S, Eraslan S. Adrenal incidentaloma, clinical, metabolic, follow-up aspects: single centre experience. *Endocrine.* 2010;37:40-6
- 154- Yano T, Linehan M, Anglard P, Lerman M, Daniel L, Stein C, et al. Genetic changes in human adrenocortical carcinomas, *J Natl. Cancer Inst.* 1989;81,518-23
- 155- Henry I, Grandjouan S, Couillin P, Barichard F, Huerre-Jeanpierre C, Glaser T, et al. Tumor-specific loss of 11p15.5 alleles in del11p13 Wilms tumor and in familial adrenocortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:3247-51
- 156- Sameshima Y, Tsunematsu Y, Watanabe S, Tsukamoto T, Kawa-ha K, Hirata Y, et al. Detection of novel germ-line p53 mutations in diverse-cancer-prone families identified by selecting patients with childhood adrenocortical carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1992;84:703-7.
- 157- Herrman LJ, Heinze B, Fassnacht M, Willenberg HS, Quinkler M, Reisch N, et al. TP53 germline mutations in adult patients with adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:E476-85
- 158- Limon J, Dal Cin P, Gaeta J, Sandberg AA. Translocation t(4;11)(q35;p13) in an adrenocortical carcinoma, *Cancer Genet Cytogenet.* 1987;28:343-8
- 159- Riberio RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:9330–5
- 160- Doghman M, Karpova T, Rodrigues GA, Arhatte M, DeMoura J, Cavalli LR, et al. Increased Steroidogenic Factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. *Mol Endocrinol* 2007;21:2968–87
- 161- Longui CA, Lemos-Marini SH, Figueiredo B, Mendonca BB, Castro M, Liberatore R Jr, et al. Inhibin α -subunit (INHA) gene and locus changes in paediatric adre-

nocortical tumors from TP53 R337H mutation heterozygote carriers. *J Med Genet* 2004;41:354–9

- 162- Gicqueli C, Raffin-Sanson ML, Gaston V, Bertagna X, Plouin PF, Schlumberger M, et al. Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2559–65
- 163- Caiola S, Stigliano A, Maroccia E, Toscano V. Molecular analysis of the gene of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in adrenal incidentaloma. *Ann Ist Super Sanita* 2000;36:111-5
- 164- Shields JM, Pruitt K, McFall A, Shaub A, Der CJ. Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over', *Trends Cell Biol.* 2000;10:147-54
- 165- Gibbs JB, Sigal IS, Colnick EM. Biochemical properties of normal and oncogenic ras p21. *Trends Biochem Sci* 1985;10:350-3
- 166- Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49:4682
- 167- Lin SR, Tsai JH, Yang YC, Lee SC. Mutations of K-ras oncogene in human adrenal tumours in Taiwan. *Br J Cancer* 1998;77:1060-6.
- 168- Yashiro T, Hara H, Fulton NC, Obara T, Kaplan EL. Point mutations of ras genes in human adrenal cortical tumors: absence in adrenocortical hyperplasia. *World J Surg* 1994;18:455-60.
- 169- Kotoula V, Sozopoulos E, Litsiou H, Fanourakis G, Koletsa T, Voutsinas G, et al. Mutational analysis of the BRAF, RAS and EGFR genes in human adrenocortical carcinomas. *Endocr Relat Cancer* 2009;16:565-72.
- 170- Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science* 1997;277:1630–5.
- 171- Yu H, Jove R, The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 2004;4:97–105.
- 172- Schindler C, Darnell JE Jr. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 1995;64:621–51.
- 173- Johnston JA, Kawamura M, Kirken RA, Chen YQ, Blake TB, Shibuya K, et al. Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2. *Nature* 1994;370:151–3
- 174- Haura EB, Zheng Z, Song L, Cantor A, Bepler G. Activated epidermal growth factor receptor-Stat-3 signaling promotes tumor survival in vivo in nonsmall cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:8288–94

- 175- Hedvat M, Huszar D, Herrmann A, Gozgit JM, Schroeder A, Sheehy A., et al.
The JAK2 inhibitor AZD1480 potently blocks Stat3 signaling and oncogenesis in solid tumors. *Cancer Cell* 2009;8;16:487-97