

ACTH-stimulasjonstest av barn og ungdom med steroidogen enzymsvikt

Jens P. Berg¹

Hormonlaboratoriet, Endokrinologisk Senter, Aker Universitetssykehus HF og Fakultetsdivisjon Aker Universitetssykehus, Universitetet i Oslo, Oslo

Introduksjon

ACTH (1-24)-stimulasjonstest benyttes ved utredning av primær binyrebarksvikt. Ved å måle steroidhormonmetabolitter før og etter stimulering kan spørsmål om defekt i steroidogene enzymer avklares. Testen er nyttig i de tilfellene hvor basalverdiene av hormoner og metabolitter ikke gir et entydig svar på hvor defekten befinner seg. Vanligvis vil den ved spørsmålet om enzymssvikt bli brukt i utredningen av utviklingsforstyrrelser som opptrer etter fødselen som prematur adrenarke og pubertet, hirsutisme og oligomenore. Dette betegnes som non-klassisk svikt i motsetning til de klassiske som gir kliniske manifestasjoner fra fødselen av og er alvorligere. Ved å sammenligne nivåene av steroidhormoner og metabolitter forbundet med de ulike enzymene før og etter ACTH-stimulering, kan muligheten for at det foreligger en defekt styrkes eller svekkes. Dette kan igjen gjøre en eventuell genetisk undersøkelse mer målrettet og kan ha betydning for valg av behandling.

¹: Korrespondanse til:
Professor Jens P. Berg
Hormonlaboratoriet
Endokrinologisk Senter
Aker Universitetssykehus HF
Trondheimsveien 235
0514 Oslo
Tlf. 22894358
Fax. 22158796
E-post: j.p.berg@medisin.uio.no

Referansegrenser

Ved gjennomgang av litteraturen er det bare én stor studie som systematisk har forsøkt å etablere referansegrenser for ulike steroidhormonmetabolitter ved ACTH-stimulasjonstest av friske barn og ungdommer (1). Lashansky og medarbeidere rekrutterte 102 personer (43 jenter og 59 gutter) til studien hvor deltagerne ble delt inn etter kjønn og i grupper basert på alder og pubertetsutvikling. Hver gruppe inneholdt data fra 7-14 individer. Det ble gitt 0,25 mg ACTH (1-24) intravenøst mellom kl 8 og 10 om morgenen, og blodprøver ble tatt like før og 1 time etter injeksjonen. Serum fra prøvene ble brukt til å måle 17-hydroksyprogesteron (17-OH-Prog), 17-hydroksypregnenolon (17-OH-Preg), dehydroepiandrosteron (DHEA), 11-deoksykortisol (11-Deo), DHEA-sulfat, androstendion, 11-deoksykortikosteron, kortisol og testosteron. Til utredningen av enzymsvikt i binyrebarken regnes det i utgangspunktet å være tilstrekkelig å måle 17-OH-Prog, 17-OH-Preg, DHEA og 11-Deo sammen med kortisol.

Et referanseområde gis av verdiene for 2,5 og 97,5-persentilene for friske personer. Lashansky og medarbeidere oppga ikke persentiler, men gjennomsnitt og standarddeviasjoner (1). Ved et normalfordelt materiale, vil verdiene for gjennomsnitt \pm 2 SD omtrent tilsvare 2,5 og 97,5-persentilene. I tabell 1 er det angitt gjennomsnittsverdi og øvre grense (gjennomsnitt + 2 SD) for basale og

ACTH-stimulerte verdier for steroidhormonmetabolitter som vanligvis måles ved utredning av enzymsvikt basert på data fra Lashansky og medarbeidere (1). Tilnærmingen er ikke statistisk korrekt siden materialet ikke er normalfordelt.

Det er små kjønnsforskjeller i basale og stimulerede verdier. Ved puberteten sees en kraftigere økning i basal og stimuleret 17-OH-Preg og DHEA hos jenter enn hos gutter. Dette er også den mest markante aldersrelaterte endringen både hos gutter og jenter. I aldersgruppen 2-12 mnd er det

som forventet hos begge kjønn høyere nivåer av 17-OH-Preg og DHEA enn senere i barnealderen. Dette gjelder spesielt for perioden 2-6 mnd hvor det er et gradvis fall av serumkonsentrasjonene. For denne aldersgruppen er trolig nivået noe høyere enn det som er angitt i Tabell 1. Aldersgruppen 2-12 mnd inkluderer barn fra 6-12 mnd som har verdier som er mer sammenlignbare med gruppen 1-5 år. Det er ingen kjønnsforskjeller for nivået av 17-OH-progesteron, men basalnivået stiger litt ved puberteten.

Tabell 1

Basale og ACTH-stimulerte (0,25 mg i.v., 0 og 60 min) serumkonsentrasjoner av steroidhormonmetabolitter hos friske barn og ungdommer angitt som gjennomsnitt og øvre referansegrense (gjennomsnitt + 2SD i parenteser) i nmol/l. Verdiene er fra Lashansky og medarbeidere (1).

Alder	17-OH-Prog	17-OH-Preg	DHEA	11-Deo	
Jenter					
2-12 mnd	Basal	1,0 (1,7)	9,0 (25,3)	4,6 (16,6)	1,2 (3,8)
	60 min	4,3 (7,3)	48,4 (96,5)	13,5 (36,0)	5,7 (10,8)
1-5 år	Basal	0,7 (2,3)	0,7 (1,4)	0,7 (1,2)	0,9 (2,6)
	60 min	5,6 (11,5)	8,5 (22,5)	2,0 (4,0)	6,0 (9,5)
6-12 år	Basal	0,8 (1,6)	1,8 (4,4)	3,4 (6,1)	1,1 (2,0)
	60 min	4,0 (7,2)	10,7 (21,9)	6,2 (13,6)	4,8 (6,9)
Tanner II-III	Basal	1,7 (5,0)	4,1 (10,9)	7,6 (20,3)	1,5 (3,4)
	60 min	6,1 (12,3)	16,8 (27,1)	12,5 (30,0)	4,8 (8,5)
Tanner IV-V	Basal	3,0 (6,8)	6,7 (15,9)	14,1 (26,9)	1,7 (3,5)
	60 min	5,0 (7,7)	28,6 (47,0)	27,0 (50,4)	4,2 (7,6)
Gutter					
2-12 mnd	Basal	1,8 (4,8)	8,5 (25,6)	3,0 (7,9)	2,0 (5,1)
	60 min	5,9 (11,1)	37,3 (82,7)	8,9 (34,3)	4,8 (7,0)
1-5 år	Basal	1,2 (3,3)	1,2 (2,9)	0,7 (1,3)	2,0 (5,1)
	60 min	4,4 (7,9)	6,2 (16,5)	2,0 (3,7)	6,8 (10,2)
6-12 år	Basal	1,0 (2,2)	2,5 (6,1)	1,9 (4,9)	1,5 (3,8)
	60 min	4,4 (6,3)	7,8 (15,7)	4,2 (9,8)	6,1 (10,1)
Tanner II-III	Basal	1,4 (3,9)	3,1 (10,0)	4,1 (9,7)	1,3 (3,8)
	60 min	4,8 (9,1)	12,0 (24,1)	7,0 (14,3)	5,2 (8,2)
Tanner IV-V	Basal	3,1 (5,4)	3,6 (9,1)	7,4 (13,4)	1,3 (2,9)
	60 min	4,7 (7,2)	15,5 (26,9)	12,1 (19,5)	4,2 (6,6)

Forventede verdier ved enzymmutasjoner

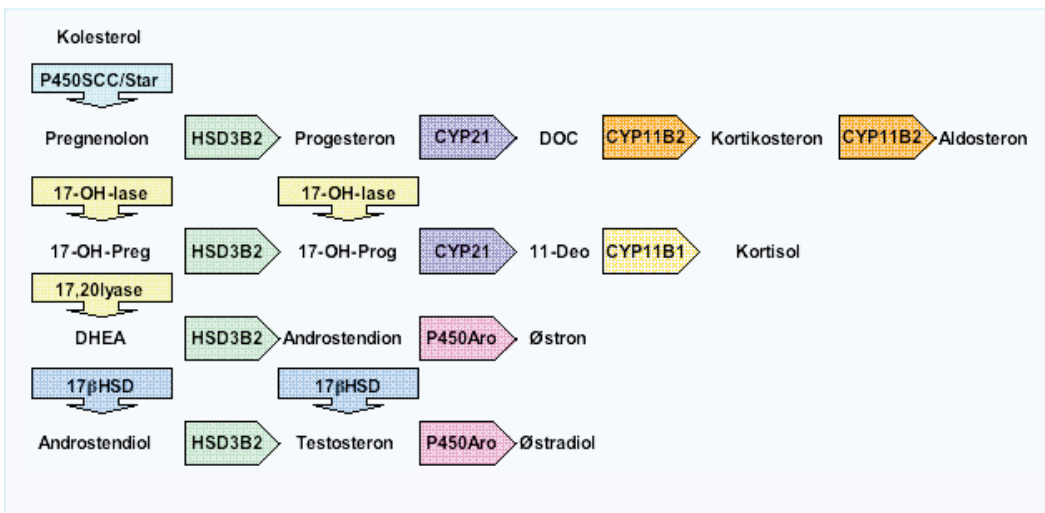
21-Hydroksylasesvikt

Enzymet 21-hydroksylase katalyserer hydroksyleringen av 17-OH-Prog til 11-Deo og progesteron til 11-deoksykortikosteron (DOC) (Fig. 1). I en artikkel fra 1983 beskriver New og medarbeidere (2) serumnivåene av 17-OH-Prog før og etter ACTH-stimulasjon. Det ble inkludert homozygote for klassisk og non-klassisk 21-hydroksylasesvikt, heterozygote og kontroller for mutasjoner i CYP21-genet. Barn og voksne av begge kjønn ble samlet til ett materiale siden forfatterne tidligere har vist at det ikke er noen alders- eller kjønnsforskjeller av betydning for tolkning av resultatene (3). Resultatene for ACTH-stimulert 17-OH-Prog (Tabell 2) indikerte at stimulasjonstesten kan skille mellom klassisk svikt og non-klassisk svikt. I tillegg har pasienter med non-klassisk svikt høyere respons på 17-OH-Prog enn gruppen av heterozygote og kontroller. Normal basalverdi for 17-OH-Prog utelukker derimot ikke at pasienten kan ha en non-klassisk 21-hydroksylasesvikt (4).

Heterozygote bærere av klassiske og non-klassiske mutasjoner hadde i gjennomsnitt høyere ACTH-respons for 17-OH-Prog enn kontrollene, men det var betydelig overlapping med normale kontroller (2). Måling av 17-OH-progesteron alene kan derfor ikke med sikkerhet identifisere bærere av CYP21-mutasjoner. Derimot kan ratio mellom responsene for 17-OH-Prog og DOC brukes for å skille mellom heterozygote og personer med normale alleler for CYP21 (5). Generelt vil det ved 21-hydroksylasesvikt være det allelet som har den minst alvorlige mutasjonen, som avgjør hvilken 17-OH-Prog-respons pasienten får.

11 β -hydroksylasesvikt

Enzymet 11 β -hydroksylase type 1 kodet av CYP11B1-genet omdanner 11-Deo til kortisol, mens type 2 (CYP11B2) katalyserer syntesen av aldosteron fra deoksykortikosteron via kortikosteron (Fig. 1). Homozygositet for CYP11B1-mutasjoner er den nest hyppigste årsaken til kongenitt adrenal hyperplasi, men kan også føre til non-klassisk svikt i form av prematur pubarke (6). Pasienter med mutasjoner i CYP11B1-genet som førte til non-klassisk svikt, hadde kraftig forhøyede serumnivåer av 11-Deo både



Figur 1

Sjematisk fremstilling av syntesen av steroidhormoner. Steroidogene enzymer er markert med bokser. P450 oksidoreduktase er nødvendig for aktiviteten til 17-OH-lase/17,20-lyase, CYP21 og P450Aro. Forkortelser: P450SCC/Star: "Side chain cleavage" enzym/steroidogent akutt-regulatorisk protein; HSD3B2: 3 β -hydroksysteroid dehydrogenase type 2; CYP21: 21-hydroksylase; DOC: 11-deoksykortikosteron; CYP11B2: 11 β -hydroksylase type 2; 17-OH-lase: 17 α -hydroksylase, 17/20-lyase; 17-OH-Preg: 17-hydroksypregnenolon; 17-OH-Prog: 17-hydroksyprogesteron; 11-Deo: 11-deoksykortisol; CYP11B1: 11 β -hydroksylase type 1; DHEA: dehydroepiandrosteron; P450Aro: aromatase; 17 β HSD: 17 β -hydroksysteroid dehydrogenase.

før og etter ACTH-stimulering. Det er omdiskutert om bærere av mutasjoner i CYP11B1-genet har økt serumnivå av 11-Deo etter ACTH-stimulering .

Svikt i 3 β -hydroksysteroid dehydrogenase

Enzymet 3 β -hydroksysteroid dehydrogenase katalyserer 3 β -hydroksysteroid dehydrogeneringen og Δ 5 til Δ 4-isomeriseringen av pregnenolon, 17-OH-Preg, DHEA og androstendiol til de respektive Δ 5-ketosteroidene progesteron, 17-OH-Prog, androstendion og testosteron (Fig. 1). Det er identifisert to isoenzymer som betegnes type I og II. De er nesten identiske, men uttrykkes i forskjellige vev. Type II (HSD3B2) finnes hovedsakelig i binyrebarken, ovarier og testikler. Homozygositet for alvorlige mutasjoner i HSD3B2-genet gir klassisk kongenital adrenal hyperplasi med varierende grad av salttap og virilisering av genitalia. Mindre alvorlig svikt kan føre til prematur pubarke, hirsutisme og menstruasjonsforstyrrelser (10) . Hormonelle kriterier for å diagnostisere non-klassisk svikt i 3 β -hydroksysteroid dehydrogenase har vært forhøyede serumnivåer av 17-OH-Preg og DHEA etter ACTH-stimulering. Det sees relativt hyppig en mild 3 β -hydroksysteroid dehydrogenasesvikt sammenlignet med den svært lave forekomsten av klassisk svikt. Påvisning av mild funksjonell svikt har hittil ikke blitt støttet genetisk ved påvisning av mutasjoner i HSD3B2-genet. Årsaken til en tilsynelatende mild svikt i 3 β -hydroksysteroid dehydrogenase, uttrykt ved lett forhøyede verdier av 17-OH-Preg og DHEA, er ukjent. Lutfallah og medarbeidere (11) og Mermejo og medarbeidere (12) har vist at mutasjoner i HSD3B2 kan forårsake non-klassisk svikt og debutere som prematur pubarke. Dette er forbundet med kraftig forhøy-

ede serumnivåer av 17-OH-Preg både basalt (10-25 SD over gjennomsnitt for alder) og etter ACTH-stimulering (36-54 SD over gjennomsnitt for alder). Det tilsvarer basalverdier >29 nmol/l og ACTH-stimulerte verdier >201 nmol/l. DHEA-nivåene både basalt og stimulert var i mindre grad konsistent forhøyede blant pasienter med mutasjonene sammenlignet med 17-OH-Preg. Bærere av alvorlige HSD3B2-mutasjoner har normale basale og ACTH-stimulerte verdier for 17-OH-Preg, DHEA, 17-OH-Prog og kortisol og kan ikke identifiseres ved en stimulasjonstest (13) .

P450-oksidoreduktasesvikt

Enzymet P450-oksidoreduktase (POR) er elektronbærer og nødvendig for normal funksjon av cytokrom P450-enzymet. Mutasjoner som fører til svikt av POR gir et sammensatt bilde med kombinert partiell svikt i flere steroidogene enzymer som 17 α -hydroksylase/17,20-lyase, 21-hydroksylase og aromatase (Fig. 1). Hos de fleste pasienter som har fått påvist POR-svikt, er det i tillegg misdannelser i skjelettet av typen Antley-Bixler-syndrom som kjennetegnes ved kraniosynostose, hypoplasi av midtre delen av ansiktsskjelettet, radioulnar synostose, araknodaktyli og bøyde lårbein (14) . POR-svikt kan også sees uten skjelettanomalier. Imidlertid er Antley-Bixler-syndrom uten steroidhormonsyntesedefekt forårsaket av mutasjoner i genet for fibroblast vekstfaktorreseptor type 2 (FGFR2). Enzymsvikten fører til nedsatt androgensyntese på grunn av nedsatt 17,20-lyase-aktivitet og undervirilisering av gutter. Imidlertid kan defekten også føre til virilisering av jenter og av mødre som har et foster med POR-defekt. Dette tror man kan være forårsaket av økt dihydrotestosteronsyntese ved hjelp av en

Tabell 2

ACTH-stimulert (0,25 mg i.v.; 60 min) 17-OH-progesteron i serum hos pasienter med ulike former for homozygot 21-hydroksylasesvikt, heterozygote og kontroller. Verdiene er hentet fra New og medarbeidere (2) og er angitt i nmol/l som gjennomsnitt med minimum- og maksimumsverdier i parenteser.

Tilstand	17-OH-Prog
Klassisk 21-hydroksylasesvikt	1255 (517 - 1600)
Non-klassisk 21-hydroksylasesvikt	234 (69 - 510)
Alle heterozygote	20,3 (6,7 - 51)
Kontroller	11,2 (3,8 - 29)

”alternativ” reaksjonsvei som omdanner 17-OH-Prog direkte til dihydrotestosteron uten å gå via androstendion og testosteron.

Non-klassisk POR-defekt er beskrevet hos en 23 år gammel kvinne med primær amenore (15). Pasienten hadde forhøyede serumnivåer av både progesteron og 17-OH-Prog både basalt og etter ACTH-stimulering. Progesteronkonsentrasjonen var høyere enn 17-OH-Prog, og på denne måten kan POR-svikt skilles fra 21-hydroksylasesvikt hvor forholdet er omvendt. ACTH-stimulering førte til svært beskjeden økning i kortisol. ACTH-test som gir et blandingsbilde og indikerer svikt i flere enzymssystemer sammen med økt progesteron, bør gi mistanke om POR-svikt. Forekomsten av dette i den norske befolkningen er ennå ukjent.

Oppsummering

ACTH-stimulasjonstest med 0,25 mg ACTH (1-24) i.v. kan være nyttig for å bekrefte en mistanke om steroidogen enzymsvikt i de tilfellene hvor basalverdiene ikke gir en entydig diagnose. Det er viktig å standardisere testen slik at den utføres om morgenen (kl 8-10) på grunn av døgnvariasjonen for kortisol og DHEA. Etter menarke må den utføres i follikkelfase (3-5. dag av menstruasjonssyklus) for å ha lavest mulig basalverdi for 17-OH-Prog. Testen bør i utgangspunktet inkludere basale og 60-minuttersverdier i serum for 17-OH-Prog, 17-OH-Preg og 11-Deo. Kortisol bør også måles for å få informasjon om graden av en eventuell binyrebarksvikt ved enzymdefekt. Laboratoriene som utfører disse analysene tar ofte vare på prøvene i flere uker etter at svaret er sendt slik at det er mulig å etterkvirere supplerende analyser hvis det tas nok serum. Imidlertid krever analyser av steroidhormonmetabolitter ofte store mengder prøvemateriale på grunn av omfattende prosedyrer med ekstraksjon og kromatografi (se Hormonlaboratoriets analysebok). Resultatene må tolkes med forsiktighet siden det bare er én studie som systematisk har forsøkt å lage referanseverdier for friske barn og ungdommer (1). Den viste at spesielt 17-OH-Preg og DHEA må vurderes i forhold til pubertetsutvikling.

Den hyppigste enzymdefekten i binyrebarken er 21-hydroksylasesvikt. Det er sammenheng mellom 17-OH-Prog-økningen ved ACTH-sti-

mulasjon og graden av enzymsvikt. Pasienter med mutasjoner i genene for HSD3B2 og CYP11B1 har som regel kraftig forhøyede verdier for henholdsvis 17-OH-Preg inkludert DHEA og 11-Deo. Nyttet av en ACTH-test blir derfor kanskje mest en vurdering av kapasiteten til å syntetisere kortisol enn diagnostikk av enzymsvikt. Lett til moderat forhøyede verdier av 17-OH-Preg og DHEA kan gi mistanke om svikt i 3 β -hydroksysteroid dehydrogenase, men dette har ikke blitt bekreftet med mutasjoner i genet for HSD3B2. ACTH-test med verdier som indikerer en sammensatt form for steroidogen enzymsvikt, bør gi mistanke om mutasjon i genet for P450 oksidoreduktase.

Referanser

1. Lashansky G, Saenger P, Fishman K, Gautier T, Mayes D, Berg G, et al. Normative data for adrenal steroidogenesis in a healthy pediatric population: age- and sex-related changes after adrenocorticotropin stimulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991;73:674-86.
2. New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, Kohn B, Oberfield SE, Pollack MS, et al. Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983;57:320-6.
3. Lorenzen F, Pang S, New MI, Dupont B, Pollack M, Chow DM, Levine LS. Hormonal phenotype and HLA-genotype in families of patients with congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). *Pediatr Res.* 1979;13:1356-60.
4. Rumsby G, Avey CJ, Conway GS, Honour JW. Genotype-phenotype analysis in late onset 21-hydroxylase deficiency in comparison to the classical forms. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1998;48:707-11.
5. Peter M, Sippell WG, Lorenzen F, Willig RP, Westphal E, Grosse-Wilde H. Improved test to identify heterozygotes for congenital adrenal hyperplasia without index case examination. *Lancet.* 1990;335:1296-9.
6. Joehrer K, Geley S, Strasser-Wozak EM, Azziz R, Wollmann HA, Schmitt K, et al. CYP11B1 mutations causing non-classic adrenal hyperplasia due to 11 beta-hydroxylase deficiency. *Hum Mol Genet.* 1997;6:1829-34.

7. Pang S, Levine LS, Lorenzen F, Chow D, Pollack M, Dupont B, et al. Hormonal studies in obligate heterozygotes and siblings of patients with 11 beta-hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980;50:586-9.
8. Peter M, Sippell WG. Evidence for endocrinological abnormalities in heterozygotes for adrenal 11 beta-hydroxylase deficiency of a family with the R448H mutation in the CYP11B1 gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:3506-8.
9. Rosler A, Cohen H. Absence of steroid biosynthetic defects in heterozygote individuals for classic 11 beta-hydroxylase deficiency due to a R448H mutation in the CYP11B1 gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80:3771-3.
10. Marui S, Castro M, Latronico AC, Elias LL, Arnhold IJ, Moreira AC, Mendonca BB. Mutations in the type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD3B2) gene can cause premature pubarche in girls. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2000;52:67-75.
11. Lutfallah C, Wang W, Mason JI, Chang YT, Haider A, Rich B, et al. Newly proposed hormonal criteria via genotypic proof for type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:2611-22.
12. Mermejo LM, Elias LL, Marui S, Moreira AC, Mendonca BB, de Castro M. Refining hormonal diagnosis of type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency in patients with premature pubarche and hirsutism based on HSD3B2 genotyping. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:1287-93.
13. Pang S, Carbanaru G, Haider A, Copeland KC, Chang YT, Lutfallah C, Mason JI. Carriers for type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD3B2) deficiency can only be identified by HSD3B2 genotype study and not by hormone test. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003;58:323-31.
14. Flück CE, Miller WL. P450 oxidoreductase deficiency: a new form of congenital adrenal hyperplasia. *Curr Opin Pediatr.* 2006;18:435-41.
15. Flück CE, Tajima T, Pandey AV, Arlt W, Okuhara K, Verge CF, et al. Mutant P450 oxidoreductase causes disordered steroidogenesis with and without Antley-Bixler syndrome. *Nat Genet.* 2004;36:228-30.