

# Új laboratóriumi módszerek alkalmazása a hiperkortizolizmus diagnosztikájában

Tézisfüzet

**Dr. Mészáros Katalin**

Semmelweis Egyetem

Rácz Károly Konzervatív Orvostudományi Tagozat



Témavezető: Dr. Patócs Attila, az MTA doktora, egyetemi tanár  
Hivatalos bírálók: Dr. Mészáros Szilvia, PhD, egyetemi adjunktus  
Dr. Bhattoa Harjit Pal, Dsc, egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Igaz Péter, az MTA doktora, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Tőke Judit, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Antal-Szalmás Péter, Ph.D., egyetemi docens

Budapest  
2024

# 1. BEVEZETÉS

A Cushing-szindróma tüneteinek túlnyomó része nem specifikus, ezért a hiperkortizolizmus kezdeti szakaszában a tünetegyüttest néha nehéz elkülöníteni más, hasonló tünetekkel jelentkező kórképektől: magasvérnyomás-betegségtől, 2-es típusú diabétesz mellitustól, policisztás ovárium szindrómától, incidentálisan felfedezett melékvese-adenómáktól, oszteoporózistól, hipokalémiától. A tünetek nem specifikus volta miatt a tünetek megjelenésétől a diagnózis megszületéséig eltelt idő viszonylag hosszú, a legfrissebb kutatások szerint is átlagosan 34 hónap.

A korai diagnózis azért fontos, mert a hiperkortizolémia súlyos fokú életminőség-romláshoz, akár rokkantsághoz is vezethet, és a szövődményei a kiváltó okok megszüntetése után hosszú évekig is fennállhatnak.

## **Jelátviteli útvonalak a glükokortikoid-hatások közvetítésében**

A glükokortikoid (GC) -hatások közvetítése során különböző jelátviteli mechanizmusok teszik lehetővé az élettani folyamatok szabályozását a célszervek és -szövetek szintjén, a jelátviteli útvonalak prioritása azonban nem teljesen tisztázott még. A GC-hatások közvetítése kapcsán a leggyakrabban tanulmányozott jelátviteli útvonalak: a GH/IGF-1 tengely, a TGF $\beta$ -SMAD-útvonal, a PI3/Akt-jelátvitel, a MAPK-útvonal, a Wnt-útvonal, a BMP-útvonal és az NF- $\kappa$ B-útvonal.

## **miRNS-ek és GC-hatás**

A jelátviteli útvonalak működése elképzelhetetlen a miRNS-ek „finomhangolása” nélkül. A GC-hatás közvetítésével kapcsolatban is számos miRNS szabályozó szerepe ismert, amelyek befolyásolják:

- a szteroidogenezis során szerepet játszó enzimek működésének szabályozását: a miR-24 és a miR-10b jelenléte a CYP11B1, míg a miR-320a-3p a CYP11A1, illetve a CYP17A1 csökkent expressziójához vezet
- a GC-ok hozzáférhetőségét:
  - a kortizol és a kortizon közötti átalakulás szabályozását: a miR-579 és a miR-561 gátolják a 11 $\beta$ -HSD1 expresszióját
  - a GC-receptorok expressziójának a változását: megnövekedett miR-124-3p expresszió egerek agyában csökkent GR-expresszióval és depresszív viselkedéssel társult

- a GC-ok jelenlétére adott sejtválaszt: dexametazon hatására oszteoblasztokban mind a miR-320, mind a miR 199-5p megnövekedett expresszója volt tapasztalható, patkányok csontszövetében az elhúzódó GC-kezelés hatására a miR-29a expressziója csökkent

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során célul tűztem ki az alábbiakat:

### 1. Hiperkortizolizmus laboratóriumi diagnosztikájában alkalmazott új, szenzitív módszer beállítása és klinikai tesztelése

a.) új, érzékeny, nagynyomású folyadékkromatográfiához kapcsolt tömegspektrometriás módszerrel (LC-MS/MS) mérhető meghatározás kidolgozása és validálása kortizol és kortizon egyidejű mérésére; az új módszer összehasonlítása a már rutinszerűen használt immunoassay módszerrel

b.) az LC-MS/MS módszer alkalmazása és referenciatartomány meghatározása különböző betegcsoportok esetén

### 2. Hiperkortizolizmus szövetspecifikus miRNS- mintázatának analízise

Tanulmányozni kívántam különböző sejtvonalak hiperkortizolizmus hatására bekövetkező elváltozásait: milyen eltérően expresszálódnak miRNS-ek jellemzik ezt az állapotot, illetve a miRNS-ek milyen jelátviteli útvonalak működésére utalnak? Mivel a Wnt/ $\beta$ -catenin útvonal az egyik legrégebben ismert és legalaposabban tanulmányozott jelátviteli útvonal, kiemelt figyelmet fordítottam a Wnt-útvonal változásainak tanulmányozására.

### 3. Génexpressziós profil meghatározása és génexpressziós újraelemzés

A szakirodalomban fellelhető adatok bioinformatikai elemzésével szerettem volna vizsgálni a GC-hatásnak kitett szervekben, szövetekben a globális génexpresszió-változást és az ehhez kapcsolódó Wnt-útvonal eltéréseket. *In silico* target-predikciós elemzéssel olyan, a Wnt-útvonalhoz tartozó géneket szerettem volna azonosítani, amelyeket a GC-túlsúly hatására eltérően expresszálódnak miRNS-ek szabályoznak.

### 4. Szövetspecifikus target-predikció GC-termelő mellékveseszövetekben

*In silico* target-predikciós elemzéssel olyan, a Wnt-útvonalhoz tartozó géneket szerettem volna azonosítani, amelyeket a GC-túlsúly hatására eltérően expresszálódnak miRNS-ek szabályoznak.

### 3. MÓDSZEREK

#### 1. Hiperkortizolizmus laboratóriumi diagnosztikájában alkalmazott új, szenzitív módszer beállítása és klinikai tesztelése

##### a.) LC-MS/MS módszer

Az LC-MS/MS módszer kidolgozásához, validálásához ismert koncentrációjú és nagy tisztaságú standardokat használtunk: kortizolt, kortizont, belső standardként pedig 9,11,12,12-D4-kortizolt. A méréseket Perkin Elmer Flexar FX 10 márkájú folyadékkromatográfias készülékhez kapcsolt Sciex 5500 QTRAP tömegspektrométeren végeztük. Az elválasztáshoz egy 50\*2,1 mm méretű Phenomenex Kinetex C18-as oszlopot használtunk. A tömegspektrométerrel MRM (multiple reaction monitoring) üzemmódban mértünk.

##### b.) Nyálminták

324 éjszakai nyálmintát elemeztünk, amelyek közül 272 minta a [Semmelweis Egyetem](#) II. sz. Belgyógyászati Klinikára 2014. októbertől 2017. februárig beutalt betegektől származott. A 272 minta betegeit a kórelőzményük, az aktív klinikai státuszuk, valamint egyéb laboratóriumi és képalkotó-vizsgálati eredményeik alapján különböző csoportokra osztottuk; kontrollként 52 darab, fiatal, egészséges önkéntestől származó minta szolgált.

A nyálkortizol-eredmények statisztikai vizsgálatát SPSS v19. szoftverrel végeztük, a különböző betegcsoportok eredményeinek összehasonlítása Student-féle páros t-próbával történt.

#### 2. Hiperkortizolizmus szövetspecifikus miRNS- mintázatának analízise

##### a.) Mellékvese eredetű szövetminták

Mellékveseszöveteken végzendő kísérletünkhöz 4 darab, aktív Cushing-szindrómás beteg mellékvese-adenómájából, sebészeti beavatkozás során nyert minta állt rendelkezésünkre. Kontrollként olyan betegek szövetmintái szolgáltak, akiknek a mellékveséjéből nemfunkcionáló adenómákat távolítottak el.

##### b.) HeLa és H295R sejtek

A sejtek MEM (Minimum Essential Medium) tápoldatban növekedtek, amelyhez 10%-os FBS-t (fetal bovine serumot), 1%-os nátrium-piruvátot és 1% antibiotikus-antimikotikus oldatot adtunk.

A H295R sejteket DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) tápoldatban neveltük, amelyhez 2,5%-os Nu-Serumot, 1%-os inzulin-transzferrin-szelén oldatot, valamint 1% antibiotikus-antimikotikus oldatot adtunk. A sejteket 37° C-os hőmérsékleten, 5%-os CO<sub>2</sub>-al dúsított, párasított inkubátorban neveltük és a glükokortikoid kezelés előtt hormonmentes FBS-ben növesztettük 48 órán keresztül. A glükokortikoid kezeléshez a sejteket 100 nM dexametazonnal, a kontrollként használt sejteket pedig 100 nM dimetil-szulfoxiddal kezeltük 24 órán keresztül.

A glükokortikoid-túlsúlynak kitett, illetve a kontrollminták közötti eltéréseket kétmintás t-próbával vagy Mann-Whitney U teszttel vizsgáltuk annak függvényében, hogy a Saphiro-Wilk teszt egyenletes eloszlásra utalt-e vagy sem. A statisztikai számításokat a Real Time StatMiner (Integromics) és a Statistica 13.4.0.14 (TIBCO) szoftverekkel végeztük.

### **3. Génexpressziós profil meghatározása és génexpressziós újraelemzés**

A glükokortikoid-termelő valamint a glükokortikoid-túlsúly által befolyásolt célszervek transzkripciós változásainak meghatározása érdekében az NCBI Gene Expression Omnibus webhelyről nagy áteresztőképességű mRNS profilozási adatokat töltöttünk le, összesen 11 vizsgálat adatait. Ezeket az adatokat újraelemztük ugyanazt a bioinformatikai eljárást alkalmazva: a GEO2R algoritmust és a Benjamini-Hochberg korrekciót alkalmaztuk.

### **4. Szövetspecifikus target-predikció GC-termelő mellékveseszövetekben**

Az eltérően expresszáldó miRNS-eket feltöltöttük a DIANA-mirPath v.2.0 programba. Az *in silico* target predikciót microT-CDS algoritmussal végeztük, majd ezt követték a többszörös miRNS-célgének dúsulási analízisei, összehasonlítva a miRNS-célcsoportok mindegyikét az összes ismert KEGG-útvonallal. Az eltérően kifejeződő génfunkciókat a ToppGene Suite segítségével elemeztük.

**Minden esetben a  $p < 0,05$  értéket tekintettük szignifikánsnak.**

## 4. EREDMÉNYEK

### 1. Hiperkortizolizmus laboratóriumi diagnosztikájában alkalmazott új, szenzitív módszer beállítása és klinikai tesztelése

Az általunk fejlesztett LC-MS/MS vizsgálat teljes körű validálását a Food and Drug Administration (FDA) ajánlásának megfelelően végeztük el, amelynek során minden kritériumot tekintően a biztonsággal alkalmazható laboratóriumi vizsgálatoknak megfelelő értékeket kaptunk. A kimutathatósági határ mindkét vizsgálat esetében 0,005 ng/ml, a számszerűsítési határ 0,05 ng/ml volt.

A két különböző mérési módszerrel kapott kortizol eredmények között erős és szignifikáns korrelációt tudunk kimutatni ( $r^2= 0,892$ ), de az LC-MS/MS módszerrel mért kortizol értékek minden vizsgált betegcsoportban alacsonyabbak voltak az immunoassay-vizsgálattal mért eredményeknél.

### Kortizol- és kortizoneredmények a különböző betegcsoportokban

Az összesen 324 személy csoportosítása az alábbiak szerint történt:

- 1. csoport:** egészséges önkéntesek, referencia-populáció (52 minta)
- 2. csoport:** „Cushing-szerű” tünetekkel rendelkező páciensek: hipertóniás, obez, hirsutizmusos betegek, vagy mellékvese-adenómával rendelkezők (185 minta)
- 3. csoport:** Cushing-szindrómás betegek, jelenleg tünetmentesek (27 minta)
- 4. csoport:** aktív Cushing-szindrómás betegek (60 minta)

A négy csoport eredményei közül természetesen az egészséges önkéntesek eredményei lettek a legalacsonyabbak és az aktív Cushing-szindrómás betegekéi a legmagasabbak. A Cushing-szerű tünetekkel rendelkező betegek és a mintavétel időpontjában tünetmentes Cushing-szindrómás betegek kortizol- és kortizoneredményei nem különböztek szignifikánsan egymástól, de ebben a két csoportban is magasabbak voltak az eredmények, mint az egészségesek csoportjában.

### 1. táblázat: LC-MS/MS és ECLIA módszerrel mért éjszakai nyál kortizol és LC-MS/MS módszerrel mért éjszakai nyál kortizon, valamint a kortizol/kortizon arányok értékeinek

**összehasonlítása a négy különböző betegcsoportban (A koncentrációk nmol/l-ben vannak megadva).**

Betegcsoport	kortizol LC-MS/MS		kortizol immunoassay		kortizon LC-MS/MS		kortizol/ kortizon	
	átlag	SD	átlag	SD	átlag	SD	átlag	SD
1.	1.43	0.83	2.10	1.13	7.77	5.35	0.212	0.080
2.	2.12	1.96	3.01	2.95	9.29	8.57	0.275	0.131
3.	2.57	1.24	3.50	2.54	12.48	6.88	0.225	0.064
4.	21.63	27.42	48.01	140.9	76.26	62.16	0.251	0.084

### **ROC-görbe analízis és referenciatartomány-meghatározás**

A ROC-görbe analízis arra mutatott rá, hogy mind az LC-MS/MS módszerrel mért kortizol-és kortizonszint, mind pedig az immunoassay vizsgálattal mért kortizol-meghatározás egyformán hasznos eszköz a hiperkortizolizmus diagnózisának a felállításában.

A legjobb diagnosztikus teljesítményhez tartozó határértékek az alábbiak voltak:

- LC-MS/MS kortizol meghatározás esetén: 1,84 ng/ml (5,1 nmol/l)- szenzitivitás 95%, specificitás 94,4%
- LC-MS/MS kortizon mérése esetén: 10,1 ng/ml (28 nmol/l), ekkor a szenzitivitás 91,7%, a specificitás 96,6%. Ehhez a vizsgálathoz tartozóan egy másik, ugyanilyen diagnosztikus értékkel rendelkező határérték is van: 12,35 ng/ml (34,3 nmol/l), ennél a határértéknél a szenzitivitás alacsonyabb, 90%, de a specificitás kiemelkedően magas, 98,3%.
- immunoassay (ECLIA) kortizol meghatározás esetén: 2,64 ng/ml (7,28 nmol/l)- knél a szenzitivitás 96,7%, specificitás 92,3%

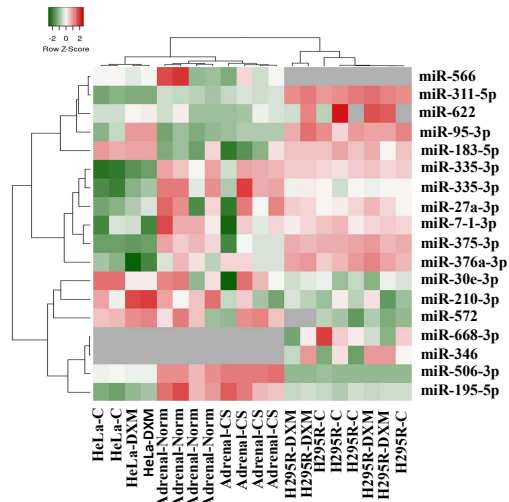
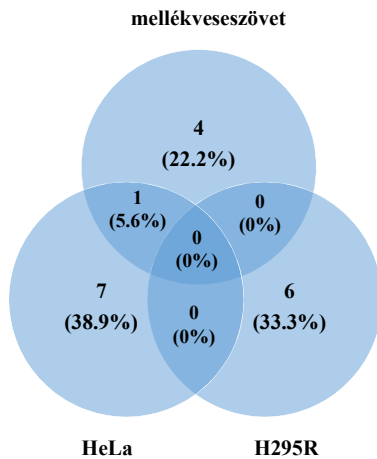
### **2. Hiperkortizolizmus szövetspecifikus miRNS- mintázatának analízise**

Mindhárom kísérleti modellben 265 miRNS expresszióját vizsgáltuk. A három kísérletben összesen 19 eltérően expresszálódó miRNS-t azonosítottunk, ezek közül csak egy közös volt: a miR-95-3p, amely a Cushing-szindrómás betegek mellékveséjében és a HeLa sejtekben is felülexpresszálódott a megfelelő kontrollokhöz képest.

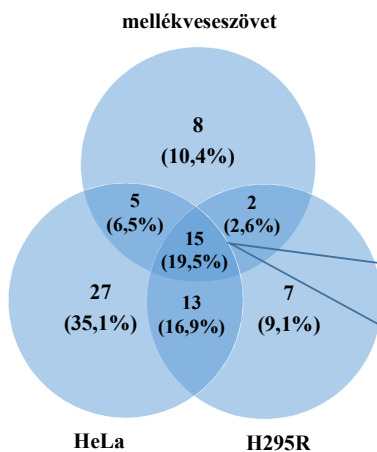


A megváltozott expressziójú miRNS-ekhez kapcsolódóan, útvonal-elemző szoftver segítségével meghatároztuk az általuk érintett jelátviteli útvonalakat. Az eltérést mutató jelátviteli útvonalak száma és milyensége a három kísérletben jelentős különbségeket mutatott, mindazonáltal a jelátviteli útvonalak közül 15 volt közös mindhárom kísérletben; ez az összes, eltérést mutató útvonalak 19,5%-át teszi ki (1. ábra).

### A Eltérően kifejeződő miRNS-ek



### B Eltérően kifejeződő miRNS-ek által befolyásolt jelátviteli útvonalak



- Wnt signaling pathway**
- MAPK signaling pathway
- TGF-beta signaling pathway
- Biotin metabolism
- Insulin signaling pathway
- Gap junction
- Chronic myeloid leukemia
- Glutamergic synapse
- Gastric acid secretion
- Neurotrophin signaling pathway
- ErbB signaling pathway
- Pathways in cancer
- Regulation of actin cytoskeleton
- mTOR signaling pathway
- Focal adhesion

**1. ábra: A három különböző kísérletben az eltérően expresszálódó miRNS-ek száma és az általuk befolyásolt jelátviteli útvonalak**

### 3. Génexpressziós profil meghatározása és génexpressziós újraelemzés

A GC-termelő és GC-túlsúly által befolyásolt célszervek, illetve szövettípusok teljes transzkriptóma-változásaira vonatkozó adatok (82 kontrollminta és 57 GC-túlsúlynak kitett minta) újraelemzése során a megváltozott gének számát (vizsgált szövettípustól függően) 1125 és 6809 közöttinek találtuk. A glukokortikoidoknak viszonylag kevés hatása volt a GC-termelő mellékveseszövetre (a gének mindössze 4-8%-ának expressziója változott meg), ezzel szemben a célszervekben a hatás sokkal erőteljesebbnek mutatkozott (a gének 10-20%-ában szignifikáns eltérés igazolódott). A GC-hatásra eltérően expresszálandó gének kapcsán génkészlet-dúsulási vizsgálatokat végeztünk, ezek során a Wnt-út vonal szignifikáns eltéréseit tapasztaltuk minden szövettípus esetén (2. táblázat).

**2. táblázat: A glukokortikoid-túlsúly hatására a Wnt-útvonalon eltérően expresszálandó gének aránya és az ehhez kapcsolódó érintett biológiai folyamatok száma.** \*: a Wnt-útvonal eltérően expresszálandó génjei/ a Wnt-útvonal összes tagja (151 gén), a KEGG génkészlet szerint (hsa04310); \*\*: a szignifikáns gének számát illetően ebben a csoportban megengedtük a  $p=0.05$  vágóértéket annak érdekében, hogy növeljük a génszámot, mivel a génkészletdúsulási elemzéshez a  $p<0.05$  esetében a 7 gén kevésnek bizonyult), K/D: kontroll, illetve dexametazonnal kezelt

A GC-célszövet típusa	Eltérően expresszálandó gének száma	Wnt-útvonalon eltérően expresszálandó génjei*	Érintett biológiai folyamatok száma	A Wnt-útvonalhoz köthető, érintett biológiai folyamatok száma
csontszövet biopszia CS betegektől műtét előtt, illetve 3 hónappal műtét után	1258	14/151	312	4
humán oszteoblaszt sejtek K/D	5343	52/151	1573	11
humán oszteoblaszt-szerű sejtek csont explantátumból K/D	6809	53/151	1164	6
humán szinoviális fibroblasztok K/D	10**	8/151	880	41

humán abdominális szubkután zsírsejtek K/D	4276	37/151	2644	16
humán abdominális omentális zsírsejtek K/D	3787	32/151	2422	6
humán epidermális keratinociták K/D	1125	13/151	1753	7
7 hetes, fajtisza German Landrace malac hippokampusz szövete K/D	2403	34/151	1913	10
7 hetes, fajtisza German Landrace malac hipotalamusz szövete K/D	2661	33/151	1850	11

#### 4. Szövetspecifikus target-predikció GC-termelő mellékveseszövetekben

A kortizol-termelő mellékveseszövetekben szövetspecifikus target-predikciós elemzést végeztünk. Kiválasztottuk a Wnt-út vonal azon elemeit, amelyek megfeleltek az alábbi feltételeknek:

- expressziójuk negatívan korrelált a target miRNS-ekkel
- a target predikciós algoritmusok során is kiválasztásra kerültek

Ezzel a megközelítéssel négy olyan gént azonosítottunk, amelyeket nagy valószínűséggel a GC-túlsúly hatására eltérően expresszálódnak (3. táblázat).

#### 3. táblázat: A glukokortikoid-túlsúly hatására kórosan kifejeződő miRNS-ek által szabályozott gének

miRNS	Gén jele	Gén neve	logFC	p-érték	GSE14922 Probe ID
miR-375	SFRP4	Secreted frizzled related protein 4	1.3979	0.0077694	A_23_P215328
miR-576	APC	Adenomatous polyposis coli	-2.1794	0.0278861	A_23_P70213
miR-576	NFAT5	Nuclear factor of activated T-cells 5	-1.0592	0.0343637	A_23_P359647
miR-375	CTBP2	C-terminal binding protein 2	0.9465	0.037437	A_23_P63897

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Az általunk fejlesztett LC-MS/MS módszerrel kis mennyiségű kortizol és kortizon egyidejűleg kimutatható gyakorlatilag bármilyen biológiai folyadékból.
2. Nagyszámú biológiai mintán történt összehasonlító mérések azt bizonyították, hogy a rutin eljárásban használt immunoassay (megfelelő döntési határértékek megválasztása mellett) ugyanolyan magas hatékonyságú (éjszakai nyálminták mérése esetén) a Cushing-szindróma diagnózisában, mint az LC-MS/MS módszer.
3. Kortizol-túlsúlynak kitett mellékvesekéreg-szöveten, valamint két különböző sejtvonalon (HeLa és H295R) végzett kísérleteink során 19 eltérően expresszálandó miRNS-t azonosítottunk.
4. Mindössze egy olyan miRNS volt, a hsa-miR-95-3p, amely két kísérletben közös volt (a mellékvesekéreg-szövetekben és a HeLa sejtekben). Ennek ellenére, a miRNS-ek által befolyásolt jelátviteli útvonalak 19,5%-a (15 útvonal) közös volt. A közös útvonalak közül az egyik legjelentősebb mértékben befolyásolt a Wnt/ $\beta$ -catenin útvonal volt.
5. A szakirodalomban fellelhető, a GC-túlsúly hatására különböző szövetekben történő génexpressziós változások (egységes kritériumok szerinti) újraelemzése arra mutatott rá, hogy mind a GC-termelő, mind pedig a GC-hatásnak kitett szövetekben történnek génexpressziós változások, de ezek mértéke eltérő: a GC-termelő szövetekben a gének 4-8%-a, míg a célszövetekben 10-20%-a mutatott eltérő expressziót.
6. A GC-hatásnak kitett célszövetek génkészlet-dúsulási elemzése a Wnt-útvonal jelentős változásait igazolták minden egyes vizsgált szövettípusban.
7. Target-predikciós elemzések során négy olyan, a Wnt-útvonalhoz tartozó gént azonosítottunk, amelyet nagy valószínűséggel a GC-túlsúly hatására a mellékvesekéreg-szövetben eltérően expresszálandó miRNS-ek szabályoznak: SFRP4 és CTBP2 (a miR-375 szabályozása alatt) és az APC és NFAT5 (a miR-576 szabályozása alatt).

## 6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### 1.) AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. **Mészáros K**, Karvaly G, Márta Z, Magda B, Tőke J, Szücs N, Tóth M, Rác K, Patócs A. Diagnostic performance of a newly developed salivary cortisol and cortisone measurement using an LC-MS/MS method with simple and rapid sample preparation. *J Endocrinol Invest.* 2018 Mar;41(3):315-323.

2. **Meszaros K**, Patocs A. Glucocorticoids Influencing Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway; Multiple Sites, Heterogeneous Effects. *Molecules.* 2020 Mar 25;25(7):1489.

3. Butz H, **Mészáros K**, Likó I, Patocs A. Wnt-Signaling Regulated by Glucocorticoid-Induced miRNAs. *Int J Mol Sci.* 2021 Oct 29;22(21):11778. (megosztott elsőszerezős közlemény)

### 2.) AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ SZOROSAN NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. Vásárhelyi B, **Mészáros K**, Karvaly G, Patócs A. [Focusing on tissue biomarkers. Estrogens as key players in the immune response and autoimmunity]. *Orv Hetil.* 2015 Dec 20;156(51):2070-6.

2. Márta Z, Bobály B, Fekete J, Magda B, Imre T, **Mészáros KV**, Szabó PT. Pushing quantitation limits in micro UHPLC-MS/MS analysis of steroid hormones by sample dilution using high volume injection. *J Pharm Biomed Anal.* 2016 Sep 10;129:135-141.

3. Grolmusz VK, Karászi K, Micsik T, Tóth EA, **Mészáros K**, Karvaly G, Barna G, Szabó PM, Baghy K, Matkó J, Kovalszky I, Tóth M, Rác K, Igaz P, Patócs A. Cell cycle dependent RRM2 may serve as proliferation marker and pharmaceutical target in adrenocortical cancer. *Am J Cancer Res.* 2016 Sep 1;6(9):2041-2053.

4. Karvaly G, **Mészáros K**, Kovács K, Patócs A, Sipák Z, Vásárhelyi B. Looking beyond linear regression and Bland-Altman plots: a comparison of the clinical performance of 25-hydroxyvitamin D tests. *Clin Chem Lab Med.* 2017 Mar 1;55(3):385-393.

5. Kovács K, Vásárhelyi B, **Mészáros K**, Patócs A, Karvaly G. [The biological and clinical relevance of estrogen metabolome]. *Orv Hetil.* 2017 Jun;158(24):929-937.
6. Magda B, Dobi Z, **Mészáros K**, Szabó É, Márta Z, Imre T, Szabó PT. Charged derivatization and on-line solid phase extraction to measure extremely low cortisol and cortisone levels in human saliva with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2017 Jun 5;140:223-231.
7. Karvaly G, Molnár-Világos G, Kovács K, **Mészáros K**, Patócs A, Vásárhelyi B. Evaluation of the Analytical and Clinical Concordance of 25-Hydroxyvitamin D Levels in Dried Blood Spots, Dried Serum Spots, and Serum as Potential Biorepository Specimens. *Biopreserv Biobank.* 2017 Aug;15(4):285-292.
8. Szappanos Á, **Mészáros K**, Nagy Z, Kövesdi A, Likó I, Kiss E, Tóth M, Patócs A. [Extraadrenal glucocorticoid synthesis]. *Orv Hetil.* 2018 Feb;159(7):260-268.
9. Doleschall M, Török D, **Mészáros K**, Luczay A, Halász Z, Németh K, Szücs N, Kiss R, Tőke J, Sólyom J, Fekete G, Patócs A, Igaz P, Tóth M. [Steroid 21-hydroxylase deficiency, the most frequent cause of congenital adrenal hyperplasia]. *Orv Hetil.* 2018 Feb;159(7):269-277.
10. Márta Z, Bobály B, Fekete J, Magda B, Imre T, **Mészáros KV**, Bálint M, Szabó PT. Simultaneous determination of thirteen different steroid hormones using micro UHPLC-MS/MS with on-line SPE system. *J Pharm Biomed Anal.* 2018 Feb 20;150:258-267.
11. Karvaly G, Kovács K, **Mészáros K**, Kocsis I, Patócs A, Vásárhelyi B. The comprehensive characterization of adrenocortical steroidogenesis using two-dimensional ultra-performance liquid chromatography - electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2018 May 10;153:274-283.
12. Hujber Z, Horváth G, Petővári G, Krencz I, Dankó T, **Mészáros K**, Rajnai H, Szoboszlai N, Leenders WPJ, Jeney A, Tretter L, Sebestyén A. GABA, glutamine, glutamate oxidation and succinic semialdehyde dehydrogenase expression in human gliomas. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018 Nov 7;37(1):271.
13. Petővári G, Hujber Z, Krencz I, Dankó T, Nagy N, Tóth F, Raffay R, **Mészáros K**, Rajnai H, Vetlényi E, Takács-Vellai K, Jeney A, Sebestyén A. Targeting cellular metabolism using

rapamycin and/or doxycycline enhances anti-tumour effects in human glioma cells. *Cancer Cell Int.* 2018 Dec 19;18:211.

**14.** Sarkadi B, **Mészáros K**, Krencz I, Canu L, Krokker L, Zakarias S, Barna G, Sebestyén A, Papay J, Hujber Z, Butz H, Darvasi O, Igaz P, Doczi J, Luconi M, Chinopoulos C, Patocs A. Glutaminases as a Novel Target for SDHB-Associated Pheochromocytomas/Paragangliomas. *Cancers (Basel)*. 2020 Mar 5;12(3):599.

**15.** Csibi N, Brubel R, Dobó N, Mészáros KV, Molvarec A, Lukovich P, Rigó J, Bokor AZ. Gamma-Synuclein Levels Are Elevated in Peritoneal Fluid of Patients with Endometriosis. *Med Sci Monit.* 2020 May 12;26:e922137.

**16.** Szabó B, Németh K, **Mészáros K**, Szücs N, Czirják S, Reiniger L, Rajnai H, Krencz I, Karászi K, Krokker L, Patócs A, Butz H. Demethylation Status of Somatic DNA Extracted From Pituitary Neuroendocrine Tumors Indicates Proliferative Behavior. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020 Jun 1;105(6):dgaa156.

**17.** Saskői É, Hujber Z, Nyíró G, Likó I, Mátyási B, Petővári G, **Mészáros K**, Kovács AL, Patthy L, Supekar S, Fan H, Sváb G, Tretter L, Sarkar A, Nazir A, Sebestyén A, Patócs A, Mehta A, Takács-Vellai K. The SDHB Arg230His mutation causing familial paraganglioma alters glycolysis in a new *Caenorhabditis elegans* model. *Dis Model Mech.* 2020 Oct 15;13(10):dmm044925.

**18.** Krokker L, Szabó B, Németh K, Tóháti R, Sarkadi B, **Mészáros K**, Patócs A, Butz H. Three Dimensional Cell Culturing for Modeling Adrenal and Pituitary Tumors. *Pathol Oncol Res.* 2021 Apr 21;27:640676.

**19.** Németh K, **Mészáros K**, Szabó B, Butz H, Arányi T, Szabó PT. A relative quantitation method for measuring DNA methylation and hydroxymethylation using guanine as an internal standard. *Anal Methods.* 2021 Oct 14;13(39):4614-4622.

**20.** Szabó B, Németh K, **Mészáros K**, Krokker L, Likó I, Saskői É, Németh K, Szabó PT, Szücs N, Czirják S, Szalóki G, Patócs A, Butz H. Aspirin Mediates Its Antitumoral Effect Through Inhibiting PTTG1 in Pituitary Adenoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2022 Nov 23;107(11):3066-3079.

**21.** Krencz I, Vetlényi E, Dankó T, Petővári G, Moldvai D, Sztankovics D, Raffay R, **Mészáros K**, Sebestyén E, Végső G, Pápay J, Sebestyén A. Metabolic Adaptation as

Potential Target in Papillary Renal Cell Carcinomas Based on Their In Situ Metabolic Characteristics. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 13;23(18):10587.