

A *HSD11B1* gén polimorfizmusainak csont metabolizmusra gyakorolt hatása osteoporosisban és mellékvesekéreg adenomás nőbetegekben

Doktori értekezés

dr. Feldman-Kovács Karolina

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Patócs Attila egyetemi docens, PhD

Programvezető: Dr. Rácz Károly egyetemi tanár, az MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Beke Artúr egyetemi adjunktus, PhD

Dr. Kovács Gábor László főorvos, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Gerendai Ida† egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Garami Miklós egyetemi docens, PhD

Dr. Spisák Sándor tudományos munkatárs, PhD

Budapest
2013

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	1
2. Ábrák és táblázatok jegyzéke	3
3. Rövidítések jegyzéke	5
4. Bevezetés	8
5. Irodalmi áttekintés	10
5.1. Glükokortikoid hormonok és hatásaik	10
5.2. A 11- β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz (11 β -HSD) enzimek	11
5.2.1. Történeti áttekintés	11
5.2.2. A 2-es típusú 11 β -HSD (11 β -HSD2)	12
5.2.3. Az 1-es típusú 11 β -HSD (11 β -HSD1)	13
5.2.3.1. 11 β -HSD1 szerkezete, enzimológiai tulajdonságai	13
5.2.3.1.1. Szerkezet	13
5.2.3.1.2. Enzimológia	15
5.2.3.2. 11 β -HSD1 szervspecifikus hatása és szerepe klinikai kórképekben	16
5.2.3.2.1. Máj	17
5.2.3.2.2. Obesitas, diabetes mellitus és a metabolikus szindróma	18
5.2.3.2.3. Cardiovascularis rendszer	20
5.2.3.2.4. Osteoporosis	21
5.2.3.2.5. Daganatos betegségek	21
5.2.3.2.6. Állatmodellek	22
5.2.3.3. A <i>HSD11B1</i> gén	24
5.2.3.3.1. A <i>HSD11B1</i> gén polimorfizmusai	24
5.2.3.3.2. <i>HSD11B1</i> és <i>H6PD</i> gének mutációi	29
5.2.3.4. A 11 β -HSD1 gátlása, mint terápiás lehetőség	31
5.2.3.4.1. A 11 β -HSD1 gátlószereinek hatása in vitro rendszerekben és állatkísérletekben	32
5.2.3.4.2. Humán 11 β -HSD1 gátlószerek	33
5.2.3.4.2.1. Carbenoxolon (CBX)	33
5.2.3.4.2.2. Egyéb gátlószerek	34
5.2.3.4.2.2. Egyéb gátlószerek	34
5.3. Genetikai áttekintés	36
5.3.1. Polimorfizmusok hatása	36
5.3.2. Tagging SNP-k	37
5.3.3. Kandidáns gének	38
5.4. Osteoporosis	39
5.4.1. Az osteoporosis kialakulására hajlamosító kandidáns gének	39
5.4.2. Glükokortikoidok indukálta osteoporosis	39
5.5. Véletlenszerűen felfedezett mellékvese daganatok	41
5.5.1. Incidencia	41
5.5.2. Etiológia	41
5.5.3. Diagnózis	44
5.5.3.1. Klinikai tünetek	44
5.5.3.2. Hormonlaboratóriumi vizsgálatok	45
5.5.3.3. Képzővizsgálatok	47
5.5.3.4. Egyéb diagnosztikai lehetőségek	48
5.5.4. Kezelés	48

5.5.5. Szubklinikus Cushing-szindróma	49
6. Célkitűzések	51
7. Módszerek	52
7.1. Betegek és kontrollok	52
7.1.1. Kontroll csoport.....	52
7.1.2. Osteoporoticus betegcsoport.....	52
7.1.3. Hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás betegcsoport	53
7.2. Csontsűrűség mérés	54
7.3. In silico adatbázis-kutatás.....	54
7.4. Molekuláris biológiai módszerek.....	54
7.4.1. Genotipizálás	54
7.4.1.1. Valós idejű (Real Time) PCR.....	55
7.4.1.2. Direkt DNS szekvenálás	57
7.4.2. <i>In vitro</i> funkcionális vizsgálatok	59
7.4.2.1. Luciferáz riporter vektor konstrukció.....	59
7.4.2.2. Célsejtek	60
7.4.2.3. Tranziens transzfekció.....	61
7.4.2.4. Dual-luciferáz assay	61
7.5. Statisztikai módszerek	61
8. Eredmények	63
8.1. A HSD11B1 promoter polimorfizmusainak feltérképezése	63
8.2. A HSD11B1 gén polimorfizmusainak allélgyakorisága.....	66
8.3. A HSD11B1 gén polimorfizmusainak hatása a csontanyagcserére egészséges nőkben	66
8.4. A HSD11B1 polimorfizmusok és a csontanyagcsere kapcsolata idiopathiás osteoporosisban és mellékvese adenomás nőbetegekben.....	68
8.4.1. Az rs4844880-as polimorfizmus összefüggése a csontsűrűséggel postmenopausalis osteoporosisban és hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás nőbetegekben	68
8.4.1.1. Postmenopausalis osteoporosisban.....	68
8.4.1.2. Az rs4844880 és az rs12086634 SNP-k összefüggése a csontdenzitás és a csontanyagcsere szérum markereivel hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás nőkben	70
8.4.2. Az rs12086634-as polimorfizmus hatása a csontanyagcserére hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás nőbetegekben	72
8.5. Az rs4844880 funkcionális következményei.....	75
8.5.1. Luciferáz riporter vektor konstrukció.....	75
8.5.2. Az rs4844880 polimorfizmus hatása a <i>HSD11B1</i> gén promoter aktivitására	77
9. Megbeszélés.....	78
10. Következtetések.....	84
11. Összefoglalás	85
12. Summary.....	87
13. Irodalomjegyzék	89
14. Saját közlemények.....	122
14.1. A dolgozat témájában megjelent közlemények	122
14.2. A dolgozat témájától független publikációk.....	122
15. Köszönetnyilvánítás	123

2. Ábrák és táblázatok jegyzéke

Ábrák:

Nincs ábrajegyzék-bejegyzés.

Táblázatok:

Nincs ábrajegyzék-bejegyzés.

3. Rövidítések jegyzéke

11β-HSD	11-beta-hidroxiszteroid dehidrogenáz (11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase)
2DM	2-es típusú diabetes mellitus (diabetes mellitus type 2)
ACTH	adrenocorticotrop hormon (adrenocorticotropic hormone)
ACS	mellékvese eredetű Cushing szindróma (Adrenal Cushing's Syndrome)
Allo-THF	allo-tetrahidrokortizol (allo-tetrahydrocortisol)
ALP	alkalikus foszfatáz (alkaline phosphatase)
BMC	csont ásványi anyag tartalom (bone mineral content)
BMD	csontsűrűség (bone mineral density)
BMI	testtömegindex (body mass index)
BMPs	csont morfogenetikai fehérjék (bone morphogenetic proteins)
C/EBP	CAAT/enhancer binding protein
CBG	kortizol kötő globulin (cortisol binding globulin)
CBX	carbenoxolon (carbenoxolone)
CD	Cushing-kór (Cushing's disease)
CR	citosolicus karbonil reduktáz (cytosolic carbonyl reductase)
CRD	cortisone reductase deficiency
CRH	corticotrop releasing hormon (corticotropin-releasing hormone)
CT	computed tomography
DEXA	kettős röntgen foton-abszorpciometria (dual-energy x-ray absorptiometry)
DHEAS	dehidroepiandroszteron-szulfát (dehydroepiandrosterone sulfate)
DHT	dihidrotesztoszteron (dihydrotestosterone)
E	kortizon (cortisone)
ER	endoplazmás retikulum (endoplasmic reticulum)

ERE	ösztrogén-reszponzív elem (Estrogen Responsive Element)
ERα, ERβ	ösztrogén receptor α és β (estrogen receptor α and β)
F	kortizol (cortisol)
F24	éjfélkor mért kortizol szint (midnight serum cortisol)
F8	reggel, 08.00-kor mért kortizol szint (serum cortisol at 08:00 am)
GH	növekedési hormon (growth hormone)
GR	glükokortikoid receptor (glucocorticoid receptor)
H6PDH	hexóz-6-foszfát dehidrogenáz (hexose-6-phosphate-dehydrogenase)
HbA1c	hemoglobin-A1c (glycated hemoglobin)
HPA	hypothalamus - hypophysis - mellékvesekéreg (hypothalamic - pituitary - adrenal)
HSD11B1	11-beta-hidroxiszteroid dehidrogenázt kódoló gén
HU	Hounsfild Unit
IGF-1	inzulinszerű növekedési faktor 1 (insulin-like growth factor-1)
IL	interleukin
KO	génkiütött (knockout)
L1-L4	ágyéki (lumbaris) gerinc
LD	kapcsoltság (linkage disequilibrium)
MIBG	meta-jodo-benzil-guanidin (iodine-131-meta-iodobenzylguanidine)
MR	mineralokortikoid receptor (mineralocorticoid receptor)
MRI	mágneses rezonancia képalkotás (magnetic resonance imaging)
MS	metabolikus szindróma (metabolic syndrome)
NAD	nikotinsavamid-adenin-dinukleotid (nicotinamide adenine dinucleotide)
NADP	nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NF1	nukleáris faktor 1 (nuclear factor I)
NFAA	hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenoma (non-functioning adrenal incidentaloma)

NNK	4-metilnitróزامino-1-(3-piridil)-1-butanon (4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone)
OC	osteocalcin
OGTT	orális glükóz tolerancia teszt (oral glucose tolerance test)
PCOS	polycystás ovarium szindróma (polycystic ovary syndrome)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PET	pozitron emissziós tomográfia (positron emission tomography)
PRL	prolaktin (prolactin)
RA	rheumatoid arthritis
RANK	nukleáris-faktor- κ B receptor aktivátor molekula (receptor activator of nuclear factor kappa B)
RANKL	nukleáris-faktor- κ B receptor aktivátor molekula ligandja (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand)
Real Time (RT) PCR	valós idejű polimeráz láncreakció (real-time polymerase chain reaction)
SAGH	szubklinikus autonóm glükokortikoid túltermelés (Subclinical autonomous glucocorticoid hypersecretion)
SAP	shrimp alkalikus foszfatáz (shrimp alkaline phosphatase)
SDR	Short-Chain Dehidrogenáz/Reduktáz (short-chain dehydrogenase/reductase)
SNP	egyponos nukleotidvariáció (single nucleotide polymorphism)
βCTx	beta-crosslaps
TF	transzkripció faktor (transcription factor)
THE	tetrahydro-kortizon (tetrahydro cortisone)
THF	tetrahydro-kortizol (tetrahydro cortisol)
UFE	szabad vizelet kortizon (urinary free cortison)
UFF	szabad vizelet kortizol (urinary free cortisol)
VDR	D-vitamin receptor (vitamin D receptor)
VDRE	D-vitamin reaktív elem (vitamin D response element)

4. Bevezetés

A glükokortikoidok szabályozzák a szénhidrát, aminosav anyagcserét, fontos szerepük van a stresszre adott válaszreakciók kialakulásában és gátolják az immunrendszer működését. Jelentős élettani szerepük mellett kiemelkedő kórélettani jelentőséggel is bírnak, kulcsszereplők számos kórkép patogenezisében illetve terápiájában az endokrinológiai betegségektől kezdve, a csontanyagcsere-zavarokon át az allergiás folyamatokig. Túltermelődésük hozzájárulhat olyan népbetegségek kialakulásához, mint a hypertonia, a 2-es típusú diabetes mellitus (2DM), a hyperlipidaemia vagy az obesitas, melyek amellett, hogy önmagukban is károsak lehetnek, jelentős rizikófaktori különféle cardiovascularis kórképeknek, mint pl. a myocardialis infarctus vagy a stroke. A glükokortikoid túlsúly egyik gyakori, sok beteget érintő, ezért sokat vizsgált szövődménye az osteoporosis, mely egyaránt kialakulhat valamilyen endogén folyamat következményeként vagy glükokortikoid terápia mellékhatásaként is.

A glükokortikoidok szintje a szervezetben szigorúan szabályozott, és az ebben bekövetkező, akár apróbb zavarok a fenti betegségek és állapotok kialakulásához vezethetnek. A betegek mind eredményesebb kezelése és a megelőzés szempontjából különösen fontos e szabályozás részleteinek minél jobb megismerése, mely új utakat nyithat nem csak a kezelés, hanem a diagnosztika és megelőzés terén is.

A glükokortikoidok hatásainak és különösen az aktív glükokortikoid hormon, a kortizol (F) szövetekben való elérhetőségének a szabályozása kettős. Egyik eleme a hypothalamus–hypophysis–mellékvese tengely által történő, általánosságban is jobban ismert központi szabályozás, mely alapvetően az össz-szervezeti glükokortikoid kínálatot befolyásolja. Másrészt a szabályozásnak létezik egy általában kevésbé ismert, lokális, szöveti szintje is, mely az adott szövet sejtjeire nézve specifikusan képes az össz-szervezeti glükokortikoid kínálat finomhangolására, a ténylegesen elérhető kortizol szintjének beállítására. Ez a helyi finomhangolás által beállított aktív kortizol szint lesz az, amely közvetlenül a sejtekre hatva azok glükokortikoid-függő folyamatait vezérli. Ezért egyes betegségek illetve az élettani működések megértése szempontjából különösen fontos az össz-szervezeti, központi szabályozások mellett a helyi folyamatok vizsgálata is.

A glükokortikoidok szöveti szintű szabályozásának fontos szereplői a sejtek endoplazmatikus retikulumában elhelyezkedő 11- β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz (11 β -HSD) izoenzimek, melyek kulcsfontosságú szerepet töltenek be a glükokortikoid hormonok átalakításában. Az általam vizsgált 1-es izoforma (11 β -HSD1) az inaktív kortizonnak (E) az aktív hormonná, a kortizollá történő átalakítását végzi. Az enzimaktivitás iránya feltételezhetően az endoplazmatikus retikulum (ER) belsejében mérhető NADPH szinttől függ, ami a hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz (H6PDH) működésének eredményeként képződik. Az enzim elsősorban a májban, gonádokban, zsírszövetben illetve az agyban, csontban található meg nagyobb mennyiségben. Működése közvetve vagy közvetlenül befolyásolhatja ezeknek a szerveknek az állapotát, működését. A jelen dolgozatban bemutatott munka során az említett szövetek közül a csontban vizsgáltam a 11 β -HSD1 működését és különösen az enzim génjét érintő variánsok lehetséges szerepét. Az enzim működését pozitívan vagy negatívan befolyásoló genetikai változatok vizsgálata egyrészt újabb rizikófaktorok azonosításához vezethet, melyek a későbbiekben akár diagnosztikus erővel is bírhatnak.

5. Irodalmi áttekintés

5.1. Glükokortikoid hormonok és hatásaik

Az 1940-es években, amikor felismerték a neuroszekréció jelentőségét, megkezdődhetett az idegrendszer és a belső elválasztású mirigyek közötti bonyolult kapcsolat felderítése [1]. A hypothalamusban található nucleus paraventriculáris kissejtes neuronjai corticotropin-releasing hormont (CRH) termelnek, amely a hipofízis portális érrendszerén keresztül a hipofízis mellső lebenyében található adrenocorticotrop hormon (ACTH) termelő corticotrop sejtek működését szabályozza [2]. A mellékvesét egy külső kéreg és egy belső velőállomány alkotja. Az ACTH célszerve a mellékvesekéreg. A mellékvesekéreg három részre tagolódik: a zona glomerulosa (a kéreg külső rétege) az aldosteron, a zona fasciculata (a középső réteg) a kortizol, a zona reticuláris (belső réteg) pedig az androgének termelődéséért felelős. A mellékvesevelő catecholaminokat és peptid hormonokat termel [3].

A biológiailag aktív mellékvesekéreg hormonok előanyagukból, a koleszterinből képződnek. A kortizol szekrécióját az ACTH szabályozza, a hormon szintje követi az ACTH diurnális ritmusát: vérben mérhető koncentrációja ébredés után a legmagasabb (8-25 $\mu\text{g}/\text{dl}$), éjfél körül pedig a legalacsonyabb ($<2 \mu\text{g}/\text{dl}$). A kortizol gátolja a hypothalamus CRH és a hypophysis ACTH termelését ezzel pedig közvetve a saját termelődését gátló ún. negatív visszacsatolós (feedback) szabályozó kört hoz létre.

A plazma kortizol 75-80%-a a kortizolkötő fehérjéhez (transcortin, cortisol binding globulin, CBG) kötődik nagy affinitással, 10-15%-a albuminhoz. A hormon biológiai hatását a szabad kortizol fejt ki, ami, miután bejut a sejtekbe, az intracelluláris glükokortikoid receptorokhoz kapcsolódik, és végül transzkripciós faktorként egyes gének átírását serkenti, illetve gátolja [2].

A kortizol fontos a szénhidrát-, a fehérje- és zsírsavcsere szabályozásában, hatása elengedhetetlen a szervezet homeosztázisának fenntartásában [4]. Ez az egyik „inzulin-antagonista” hormonunk, emellett a zsírsavak és fehérjék lebontásában, illetve mobilizálásában van kiemelt szerepe. A glükokortikoidok hatékonyan gátolják az immunrendszer működését, a gyulladás kialakulását, melynek igen jelentős terápiás konzekvenciája is van [3].

A szekretált kortizol 50%-a a vizeletben tetrahidrokortizon (THE), allo-tetrahidrokortizol (allo-THF) és tetrahidrokortizol (THF) formájában található meg. A kortizol lebontása során 25%-ban cortol/cortolsav, 10%-ban C19 szteroid, illetve 10%-ban corton/cortonsav és szabad, nem konjugált szteroidok keletkeznek [5].

Az 1935-ös év folyamán Edward Kendallnak és Tadeus Reichsteinek sikerült elsőként a mellékvesekéregből kivonnia a kortizont, melyet valamivel később, 1948-ban a Mayo Klinikán használtak először a rheumatoid arthritis (RA) kezelésére [6]. Felfedezésükért Philip Hench-el megosztva 1950-ben orvosi Nobel-díjat kaptak.

5.2. A 11- β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz (11 β -HSD) enzimek

A glükokortikoidok szöveti szintű szabályozásának fontos szereplői a sejtek endoplazmatikus retikulumában elhelyezkedő 11 β HSD izoenzimek, melyek kulcsfontosságú szerepet töltenek be a glükokortikoid hormonok interkonverziójában. Az 1-es izoforma (11 β -HSD1) az inaktív kortizont alakítja át aktív kortizollá. A lokálisan termelő kortizolnak patológiai szerepe lehet az elhízás, cukorbetegség és egyéb, főleg az anyagcserét érintő betegségek patogenezisében. Az enzim működésének gátlása szintetikus vegyületekkel a gyógyszeripar egyik legintenzívebben kutatott területe. A szelektív 11 β -HSD1 gátlószerekkel végzett klinikai vizsgálatok kezdeti adatai alapján ezek a szerek biztatóak lehetnek a jövőben a metabolikus megbetegedések kezelésében. Az enzim szintetikus gátlása mellett az enzimet kódoló gén polimorfizmusainak fontos szerepe lehet számos betegségben. A klinikai eredmények összefoglalásából és azok részleges ellentmondásaiból azonban kitűnik, hogy a 11 β -HSD1-t kódoló gén a *HSD11B1* genetikai variánsainak hatása különböző populációkban eltérő lehet.

5.2.1. Történeti áttekintés

Kendall írta le elsőként, hogy a kortizon igen erős gyulladásgátló hatással bír rheumatoid arthritises betegekben. Később ismerték fel, hogy az általa felfedezett vegyület tulajdonképpen egy inaktív hormon, a gyulladásgátló hatásokért annak „aktív formája”, a kortizol a felelős. A betegeknek a kezelés során orálisan adott kortizon ugyanis a májban 11 β -HSD-függő módon kortizollá alakul. Ezután több szövetről is bebizonyosodott, hogy kortizon–kortizol átalakulás mehet végbe bennük: így a vesében [7], a placentában [8] és a májban is [9]. Az említett szervekben azonban az átalakulás

iránya ellentétes volt, a placentában és a vesében elsősorban oxidatív, dehidrogenáz aktivitást tapasztaltak (kortizol \rightarrow kortizon = F \rightarrow E), míg a májban a reduktáz aktivitás (E \rightarrow F) dominált, melyet a vesevénákban illetve a v. portae-ban mért F/E hányados az artériás vérhez viszonyított jelentős eltérései igazoltak [10-13]. A látszólagos ellentmondást sokkal később sikerült feloldani a két különböző izoenzim azonosításával. A redukált nikotinamid adenzin dinukleotid foszfát-függő (NADPH) 11 β -HSD1 reduktázként működik, a kortizont kortizollá alakítja, ezért „máj” izoenzimnek nevezik, míg a kortizolt inaktíváló, kortizonná alakító „vese” izoenzim a NAD-függő dehidrogenáz, a 11 β -HSD2 [9].

5.2.2. A 2-es típusú 11 β -HSD (11 β -HSD2)

Bár ezt az izoenzimet írták le később, a funkciója mégis ennek vált hamarabb nyilvánvalóvá. Az enzim egy NAD-függő dehidrogenáz, mely nagy affinitással köti a kortizolt és azt gyorsan inaktív kortizonná alakítja [14, 15]. Felfedezése segítette megoldani az úgynevezett mineralokortikoid receptor paradoxont. A mineralokortikoid receptor ugyanis nem szelektív, az aldoszteron és a kortizol iránti affinitása közel azonos *in vitro*. *In vivo* ugyanakkor a vesében a magas kortizol szint nem okoz aldoszteron-szerű hatásokat. Az *in vitro* és *in vivo* megfigyelések között feszülő ellentmondás megoldását a 11 β -HSD2 felfedezése jelentette, ez az enzim ugyanis a vesében lebontja a kortizolt, ezáltal megvédi a mineralokortikoid receptort a kortizol által történő aktiválódástól [16, 17]. A vese vénákban ezért jelentősen kevesebb kortizol van, az F/E hányados jelentősen kisebb, mint az artériás vérben [13].

A 11 β -HSD2 embrionális korban a magzati szövetekben és a placentában fejlődik ki [18], ahol a fő feladata a magzat védelme az anyai glükokortikoidok hatásától azáltal, hogy azokat nagyon hatékonyan kortizonná alakítja, és így inaktíválja [19, 20].

Felnőttben elsősorban a klasszikus aldoszteron célszervekben található meg: a disztális nephronban, a verejték- és nyálmirigyekben és a vastagbél nyálkahártyájában [21, 22]. Emellett kisebb mennyiségben a tüdőben [23] és az endotheliumban [24, 25] is kimutatható.

Az enzim gyógyszeres gátlása [26], egerekben a gén kiütése [27] vagy emberben valamely genetikai hibából eredő alulműködése [28, 29] látszólagos mineralokortikoid-többlet szindrómához (apparent mineralocorticoid excess syndrome, AME) vezet. A

glükokortikoidok csökkent lebomlása miatt ilyenkor azok hatnak a mineralokortikoid receptorokra és az így létrejövő aldosteron-hatások felelősek a betegség tüneteierért: a nátrium retencióerért, hipokalémiáerért, illetve a magas vérnyomásérért. Magzati korban az enzim gátlása fejlődési zavarokhoz vezet [30, 31].

5.2.3. Az 1-es típusú 11 β -HSD (11 β -HSD1)

Annak ellenére, hogy ez volt az elsőként felfedezett izoenzim, a pontos funkciójára csak jóval a 11 β -HSD2 után derült fény.

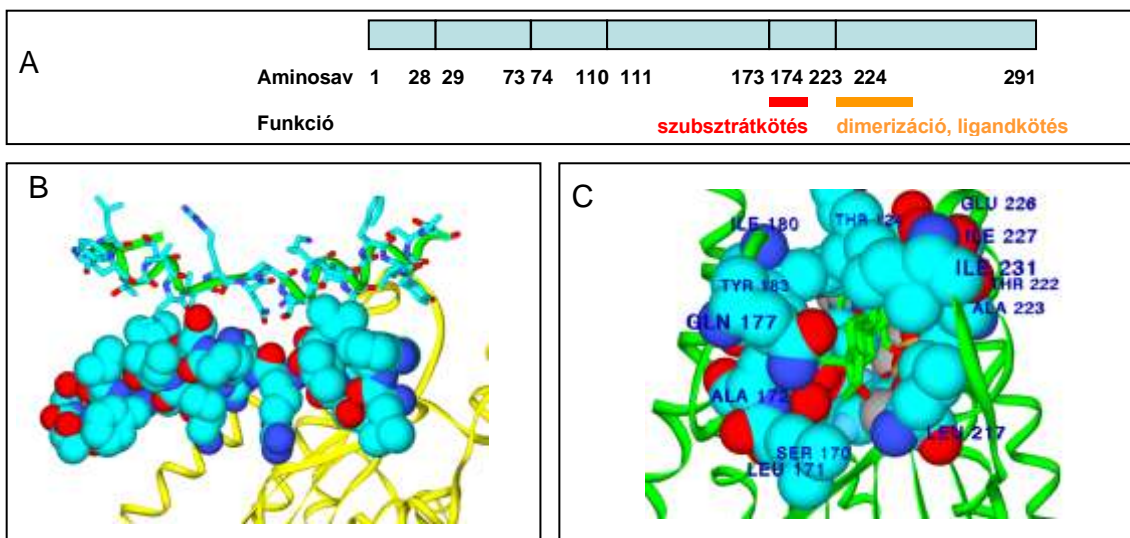
Amelung és munkatársai 1953-ban fedezték fel patkányban annak az enzimnek a létezését, amely a 11-hidroxi-glükokortikoidok (kortizol, kortikoszteron) és a 11-keto formái (kortizon, 11-dehidrokortikoszteron) közötti átalakítást végzi [32]. Kezdetben csupán úgy tekintettek erre az enzimre, mint a kortizol lebontásának egyik útjára [9].

Később, a mérési módszerek fejlődésével felismerték, hogy a szájon át adott kortizon csak nagyon kis mennyiségben jelenik meg a vérben, kortizon formájában. A bélben való felszívódás után ugyanis a májban döntően kortizollá alakul. Az ezért felelős enzimet Monder és kollégái 1988-ban patkány májából izolálták [33]. Később vált ismertté, hogy ez az enzim felelős a szervezetben több helyen is megtalálható 11-ketoredukcióerért, azaz a kortizon kortizollá történő reaktivációjáerért [9].

5.2.3.1. 11 β -HSD1 szerkezete, enzimológiai tulajdonságai

5.2.3.1.1. Szerkezet

A 11 β -HSD1 enzim az SDR (Short-Chain Dehydrogenases/Reductases) szupercsalád tagja [34]. Az enzimcsaládba eredetileg 250-300 aminosavból álló, az aminoterminálisan nukleotid-kofaktor kötőhelyet, a fehérje közepe táján pedig aktív centrumot tartalmazó enzimek tartoztak (klasszikus beosztás) [9]. Jelenleg kb. 3000 enzimet sorolunk ide, melyek között találunk 400 aminosavnál hosszabbakat is (kiterjesztett család) [9]. A család tagjait egyes konzervált doménjeik alapján sorolják ide, melyek között egyesek a kofaktor-kötőhelyben mások az aktív centrumban találhatóak.



1. ábra: A 11 β -HSD fehérje szerkezete és az enzimműködésben fontos szerepet játszó aminosavak (A), a dimer szerkezete (B), valamint a ligand-kötő zseb 3-dimenziós modellje (C).

A nukleotid-kofaktor kötőhely GXXXGXG szekvenciája jelentősen konzervált a család tagjai között, ez felelős a NADPH kofaktor-specifitásért [35]. A család epimeráz illetve dehidrogenáz enzimei azonban más nukleotid kofaktort használnak, ezért ebben a szekvenciában nem minden egyes aminosav teljes mértékben konzervált [36]. A kötőhely másodlagos szerkezetét α -hélixek és β -redőzetek meghatározott sorrendje alkotja, melyek úgynevezett Rossmann-zsebet hoznak létre [37]. Az SDR enzimek aktív része egy invariábilis tirozint és lizint tartalmaz (1. ábra C panel), illetve gyakran ezek mellett jól meghatározott helyen egy szerint is [38]. In silico szűrés segítségével a szubsztrátkötő-zseb szelektív, természetesen előforduló gátlószereit azonosították [39].

Az SDR család nagy részétől eltérően a 11 β -HSD enzimek transzmembrán fehérjék [40]. Aminoterminálisan egy rövid citoszolikus domént tartalmaznak, ezt követi egy transzmembrán domén, végül az enzim nagy része, így a kofaktor-kötőhely és az aktív centrum is az endoplazmás retikulum lumenében található [9]. A transzmembrán domén 2 pozitív töltésű lizint tartalmaz a citoplazma felőli oldalon, ezen kívül 2 negatív töltésű glutamátot, melyek valószínűleg az enzim megfelelő orientációjának meghatározásában fontosak. Mutáció analízis alapján az 5-ös pozícióban található lizin aminosav fehérjeláncon belüli elhelyezkedése és töltése elengedhetetlen az enzim megfelelő topo-

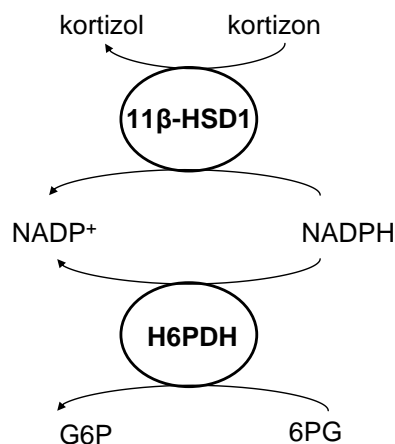
lógiajának kialakulásához [41]. A transzmembrán régió jelentőségét és funkcióját sokan vizsgálták, az eredmények azonban nem teljesen egyértelműek. Az aminoterminálisan trunkált fehérje heterológ expressziós rendszerekben talált alacsonyabb aktivitásáért elsődleges és másodlagos hatások egyaránt felelősek lehetnek [9].

A 11β -HSD1 aktív formája homodimer szerkezetű [40], ennek végleges kialakulásához elengedhetetlen szerepe van az enzim C-terminálisának: ehhez a régióhoz különböző módon fehérjéket kapcsolva (pl. fúziós fehérjék formájában) az enzim aktivitása jelentősen csökkenthető [42].

A humán 11β -HSD1 fehérjeszerkezetében 3 glikolizációs helyet azonosítottak, ezek valószínűleg az endoplazmatikus retikulum belsejében stabilizáló-, fehérjeaggregáció-gátló hatással bírnak, az enzim aktivitásához nem feltétlenül szükségesek [43], a glikolizációs helyek részleges gátlása mintegy felére csökkenti az enzim dehidrogenáz aktivitását, de ugyanakkor a reduktáz aktivitás kimutathatóan nem károsodik [44].

5.2.3.1.2. Enzimológia

Bár a 11β -HSD1 izoenzimet fedezték fel korábban, mégis ma ismert funkciójára csak jóval később derült fény, köszönhetően annak, hogy az enzim *in vitro* és *in vivo* működése meglehetősen eltér egymástól. *In vitro* sejthomogenizátumokban és mikroszóma preparátumokban affinitása nagyobb a kortizolhoz illetve a kortikoszteronhoz, így dehidrogenázként működik, a kortizolt kortizonná alakítja [40, 45]. Ebből kifolyólag sokáig a májban a kortizol inaktiválásáért és lebontásáért felelős egyik enzimként tartották nyilván [32]. Később heterológ expressziós rendszerekben illetve primer sejt kultúrában vizsgálva kiderült, hogy az enzim szinte valamennyi szövetben 11 -ketoreduktázként működik, azaz a korábbiakkal éppen ellenkező a hatása, az inaktív kortizont reaktiválja kortizollá [46-49].



2. ábra: A 11β-HSD1 és a H6PDH együttműködése a kortizon átalakítása során

Az enzimműködés irányát meghatározó tényezők azonban még nem teljesen ismertek. A fehérje egyes poszttranszlációs módosulásainál (pl. glikoziláció) fontosabbnak tűnik az intakt sejt endoplazmás retikulumában található redox állapot [50], illetve a 11β-HSD1-gyel kolokalizáló hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz (H6PDH) működése [34], amely valószínűleg a NADPH kofaktor-ellátást biztosítja [51] (2. ábra). Ezekon kívül rövidtávú szabályozó folyamatoknak, pl. a fehérje foszforilációjának is lehet szerepe, mely magyarázná azt a megfigyelést, hogy az *in vivo* domináns reduktáz aktivitás *in vitro* még nagy mennyiségű NADPH jelenlétében is instabil [32].

5.2.3.2. 11β-HSD1 szervspecifikus hatása és szerepe klinikai kórképekben

Az obesitas, különösen a visceralis obesitas és a glükokortikoidok kapcsolatára egyre egyértelműbb bizonyítékaink vannak. A glükokortikoid anyagcsere centrális, a hypothalamus-hypophysis-mellékvese kéreg tengelyének zavara következtében kialakuló obesitas jól ismert [52, 53], de elhízás alakul ki, azokban az esetekben is, amikor a glükokortikoid anyagcsere helyi zavara áll a háttérben [54]. Az elmúlt évtizedekben egyre nagyobb egészségügyi és társadalmi problémát okoz az elhízás és a talaján kialakuló szövödmények, és a társult állapotok, mint pl. az inzulin rezisztencia, a hypertonia és a dyslipidaemia, amelyek együttesen alkotják a metabolikus szindrómaként ismert állapotot, mely fokozott rizikót jelent atherosclerosis, cardiovascularis megbetegedések, 2-es típusú diabetes mellitus, thrombosis és gyulladások kialakulására [52, 55].

Hypertonia, csökkent glükóz tolerancia és metabolikus szindróma esetén kimutatható a szérum kortizolszintjének emelkedése [56-61], amely a centrális visszacsatoló szabályozó kör zavarára utalhat [52, 60, 62]. A szöveti glükokortikoid koncentrációk eltérései azonban kialakulhatnak a keringő kortizol szintjének megváltozása nélkül is, amennyiben azt a központi szabályozó mechanizmus a normális tartományban tartja [63]. Ezt az állapotot a „cseplecs Cushingjának” is nevezik [52]. A 11β -HSD1 fokozott aktivitása önmagában képes a májban és a zsírszövetben emelkedett kortizol szintet fenntartani, ezáltal pedig metabolikus szindrómát kiváltani az össz-szervezeti glükokortikoid szabályozás zavara nélkül [63, 64]. Ezért a 11β -HSD1-t specifikusan a zsírszövetben túlexpresszázó transzgenikus egerek a metabolikus szindróma kiváló állatmodelljei.

5.2.3.2.1. Máj

A májban ismerték fel először, hogy a 11β -HSD1 szerepe az intracelluláris kortizol-szint biztosítása és így a lokális glükokortikoidválasz kialakítása lehet. A glükokortikoidok májban kifejtett hatása elengedhetetlen az emberi szervezetben zajló anyagcserefolyamatok megfelelő működéséhez. Stressz vagy éhezés esetén a szervezet a májból tápanyagokat tud mozgósítani az optimális vércukorszint eléréséhez. Ezen válaszok létrejöttében fontos szerepe van a kortizolnak, amely a májban inzulin antagonistaként működik, hatására fokozódik a glükoneogenezis és a glikogén szintézis is. A glükoneogenezis fokozódásának hátterében a folyamat kulcsenzimeinek, a foszfoenolpiruvát-karboxikináznak (PEPCK) és a glükóz-6-foszfátnak (G6Pase) az expressziónövekedése áll. Túlzott glükokortikoid hatás ezen reakcióutakon keresztül a májban fokozza a glükoneogenezist, amely emeli a vércukorszintet, ezzel pedig hozzájárulhat globális inzulinrezisztencia és így akár diabetes mellitus kialakulásához [9].

Ösztrogén hatására hím és nőstény patkányokban is igen jelentősen csökken mind a 11β -HSD1 enzim expressziója [65], mind pedig a PEPCK szintje. Az ösztrogén ezen glükokortikoid-függő génre kifejtett csendesítő hatása azonban közvetett, hiszen adrenalectomizált állatokban az ösztrogén hatástalannak bizonyult, a PEPCK szintjét tovább már nem csökkentette. Az ösztrogén a PEPCK expresszióját feltételezhetően a 11β -HSD1 aktivitás vagy expressziójának csökkentésén keresztül csökkenti. Ezek alapján a 11β -HSD1 működése szükséges a májban egyes glükokortikoid célgének

megfelelő mértékű kifejeződéséhez, így biztosítva a glükoneogenezis megfelelő szabályozását [66]. A csökkent ösztrogénszint emberben is a 11β -HSD1-aktivitás emelkedésével jár, amely hozzájárulhat a postmenopausalis nőkben tapasztalt hypertóniához, dyslipidaemiához, elhízáshoz [67] és osteoporosis kialakulásához.

A krónikus májbetegségek zavart kortizol metabolizmussal járnak. Mind az alkoholos, mind pedig a nem-alkoholos krónikus májbetegség vizeletében jellegzetes emelkedést mutat az ürített tetrahydro-kortizol (THF) + allo-tetrahydro-kortizol (allo-THF) / tetrahydro-kortizon (THE) arány, ami vagy a renális 11β -HSD2-aktivitás csökkenését, vagy a máj 11β -HSD1 oxidoreduktáz aktivitásának emelkedését feltételezi [68]. Az alkohol jelentősen fokozza a máj *HSD11B1* expresszóját, amely hozzájárulhat az alkohol-indukált pseudo-Cushing szindróma kialakulásához. A hatásmechanizmus egyelőre ismeretlen, de kialakulásában szerepet játszhat az alkohol következtében megváltozó intracelluláris redox potenciál, illetve akár egy a máj gyulladása elleni védekező mechanizmus is lehet. Ezek alapján felmerül, hogy szelektív 11β -HSD1-gátlók jó eséllyel használhatóak lennének az alkoholos eredetű pseudo-Cushing kór gyógyításában [69].

5.2.3.2.2. *Obesitas, diabetes mellitus és a metabolikus szindróma*

Az elmúlt években bebizonyították, hogy a kortizol szérumszintje emelkedett értékeket mutat metabolikus szindrómában, csökkent glükóz toleranciában (Impaired Glucose Tolerance, IGT) és hypertóniában az egészséges populációban mért értékekhez képest.

A glükokortikoidok szerepe nélkülözhetetlen a zsírszövet eloszlásához, és a megfelelő funkció kialakulásához is. Ennek hátterében a proliferáció/differenciáció szabályozása áll: a kortizol gátolja a proliferációt és serkenti a differenciációt azáltal, hogy indukálja a sejtciklus megállítását a G1 fázisban [70, 71]. Alacsony helyi kortizol szint ezért a zsírszövet proliferációját, magas kortizolszint pedig a differenciálódását okozza. A helyi kortizol szint szabályozásának kulcsfontosságú eleme itt is a 11β -HSD1, mely a domináns izoenzim humán zsírszövetben, expressziója szignifikánsan magasabb, mint a 11β -HSD2-é [72-74]. Preadipocytákban döntően dehidrogenáz aktivitású (kortizol \rightarrow kortizon), csökkenti a kortizol mennyiségét, ezáltal facilitálja a proliferációt. A sejtek érése során eddig még részleteiben tisztázatlan mechanizmussal

megváltozik a 11 β -HSD1 aktivitásának iránya, elkezd ketoreduktázként viselkedni (kortizon \rightarrow kortizol), így emelkedik a helyi kortizol szint, amely fokozza és fenntartja a sejtek differenciálódását. Az enzimműködés irányának megváltozásában szereplő szabályozó folyamatok pontosan még nem ismertek, szerepe lehet a H6PDH szintjének, illetve valószínűleg annak is, hogy a 11 β -HSD1 aktivitás glükokortikoidok és proinflammatorikus citokinek által indukálható [75-80].

Bár a visceralis zsírszövetben is kimutatható 11 β -HSD1 expresszió [81], a subcutan zsírban ez kifejezettebb [82]. Az enzim zsírszövetre kifejtett hatásának fontosságát hangsúlyozza, hogy elhízott emberekben a 11 β -HSD1 szintje szignifikánsan magasabb a nem elhízott egyénekhez képest. Ez az összefüggés IGT esetén is fennáll, sőt a *HSD11B1* mRNS szintje pozitívan korrelál az orális glukóz tolerancia teszt (OGTT) által kiváltott glukóz válasszal és fordítottan arányos a teljes test inzulinérzékenységgel [83-87]. Obesitásban az elhízás mértéke egyenesen arányos volt a 11 β -HSD1 reduktáz aktivitásával [86, 88, 89], de más esetekben éppen ellenkezőleg, a csökkent reduktáz aktivitás emelkedett testtömegindexszel (body mass index, BMI) járt együtt [85, 90].

Zsírszövet homogenizátumokban mért dehidrogenáz aktivitás szignifikáns korrelációt mutatott az obesitas gyakoriságának előfordulásával [84-86]. Subcutan zsírszöveti adipocyták *HSD11B1* mRNS expressziója in situ hibridizációs módszerrel egyenes arányosságban volt az elhízás mértékével [91]. Ezzel szemben mások RT-PCR vizsgálattal nem tudtak kimutatni ilyen összefüggést, illetve preadipocytá sejt kultúrákban a 11 β -HSD1 reduktáz aktivitás az obesitas mértékével arányosan csökkent [79]. Az eredmények nyilvánvaló ellentmondásait magyarázhatja, hogy mindegyik tanulmány meglehetősen kis elemszámmal dolgozott és alapvetően különböző technikákat alkalmaztak a 11 β -HSD1 expressziójának meghatározásához. A fenti tanulmányok egy részében a 11 β -HSD1 aktivitása jól korrelál az mRNS expresszióval, de nem sikerült kapcsolatot kimutatni a zsírszövet kortizol koncentrációjával [92].

Megfigyelték, hogy obesitasban a máj 11 β -HSD1 aktivitása eleve alacsony. Azt gondolják, hogy ez egy fontos protektív mechanizmus lehet az obesitas káros metabolikus hatásainak kivédésében [9]. Később ezt a megfigyelést kiegészítették azzal, hogy emberben az obesitas során amellet, hogy a 11 β -HSD1 kifejeződése csökken a májban,

az enzim aktivitása növekszik a zsírszövetben, ami a glükokortikoid receptorok aktiválásához vezethet [93].

A glükokortikoid hatás modulálása révén a 11 β -HSD1-nek szerepe lehet a cukorbetegség kialakulásában. A glükokortikoidok a glükokortikoid receptoron (GR) keresztül növelik a glükoneogenezist a májban, hatnak a glukóz-6-foszfát és a foszfoenolpiruvát karboxikináz jelátviteli útra [9]. Glükokortikoid receptort túltermelő transzgénikus egerekben csökken az inzulintermelés, amely azt sugallja, hogy a glükokortikoidok direkt módon gátolják a pankreász β sejtek működését [9]. 11 β -HSD1 a pankreász α sejtekben regulálja a glukagon szekréciót, a keletkezett kortizol pedig parakrin módon gátolhatja a szomszédos β sejtek inzulin szekrécióját így eredményezve csökkent inzulintermelést [94].

5.2.3.2.3. *Cardiovascularis rendszer*

A 11 β -HSD1 enzim és a cardiovascularis rendszer közvetlen kapcsolata még nem teljesen tisztázott. A metabolikus szindrómával való szoros kapcsolata miatt az enzim működése összefüggésbe hozható számos cardiovascularis kórkép kialakulásával, mely összefüggések nagy része valószínűleg indirekt.

Rágcsálókban a 11 β -HSD1 nagy mennyiségben van jelen a simaizmokban illetve az aorta endotheliális sejtjeiben, ahol az enzim oxidoreduktáz aktivitása dominál. Feltételezik, hogy a fehérje mennyisége változik a sejtek növekedése közben [24, 95-98]. Egyes elméletek szerint a 11 β -HSD1 érfalban való jelenléte felveti, hogy az enzimnek szerepe van az akut coronariagyulladás patogenezisében [99]. Az enzim a simaizomszövetben részt vesz a makrofág differenciációban, működése specifikus citokinek által szabályozott (pl. IL-4, IL-13). A glükokortikoidok befolyásolják az immunmoduláns jelátviteli utakat, és ezáltal szerepet játszhatnak az atherosclerosis kialakulásában [100].

A carbenoxolon (CBX) és egyéb 11 β -HSD1 inhibitorok a dehidrogenáz aktivitás gátlásával, a noradrenalin és angiotenzin II által kiváltott vasoconstrictiót potenciózzák [93, 101, 102], csökkentik az endothelium-függő relaxációt [103], és fokozzák az ér eredetű simaizom sejtekben a Na⁺/H⁺ cserét [104]. Ezen *in vitro* megfigyelt 11 β -HSD1 hatásokat azonban *in vivo* sem emberben sem pedig egérben nem sikerült kimutatni. Embereken *in vivo* végzett vizsgálatokban sem a 11 β -HSD1 gátlásával, sem pedig

anélkül nem növekedett az érelenállás kortizol infúzió hatására [105]. Emellett bár a 11 β -HSD2 genetikai hiányában a vasoconstrictió fokozódik és károsodik a relaxáció, a 11 β -HSD1-hiányos egerekben ezen hatások nem jönnek létre [106].

5.2.3.2.4. Osteoporosis

A glükokortikoidok fontos, de koncentrációtól függően gyakran akár ellentétes hatásokkal bírnak az emberi csontok működésére [9]. A lokális glükokortikoid-koncentráció szabályozása révén a 11 β -HSD1 gátlása a glükokortikoid-indukált osteoporosis kezelésben potenciális célpont lehet.

Az enzim jelenléte és aktivitása egyértelműen kimutatható mind csontszövetből, mind pedig primer osteoblast tenyészetből, illetve jelen van néhány (de nem az összes) osteoclastban is [107-109]. Primer osteoblast és MG-63 osteosarcoma tenyészetekben egyes proinflammatoricus citokinek, mint a TNF- α , és/vagy az IL-1 dóziszfüggő módon fokozzák a 11 β -HSD1 mRNS expresszióját és az enzim aktivitását [110]. A 11 β -HSD1 gátlása az enzim ismert gátlószerével, carbenoxolonnal nem volt hatással a csontképződési markerekre, de csökkentette a csontrezorpciós markerek (piridinolin, deoxipiridinolin) szintjét [108].

5.2.3.2.5. Daganatos betegségek

Humán daganatok közül elsősorban a hypophysis, mellékvese és tüdő tumorok esetében áll rendelkezésünkre valamilyen információ a 11 β -HSD1 enzim szerepéről.

A tüődaganatok kialakulásának jelentős részéért a dohányban található 4-metilnitrózamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) felelős. A 4-metilnitrózamino-1-(3-piridil)-1-butanol (NNAL) az NNK inaktív vegyülete, amely a 11 β -HSD illetve a citoszólikus karbonil reduktáz (cytosolic carbonyl reductase; CR) segítségével keletkezik. A tüődaganatok nagy részében a 11 β -HSD1 változó expressziót mutat, a daganatok viselkedésére az enzim expressziójából következtetni lehet [111].

Az enzim jelenlétét már a felfedezése után nem sokkal sikerült patkány agyból vett mintából hibridizációs és immunhisztokémiai vizsgálatok segítségével kimutatni [112, 113]. Egészséges, humán hypophysisben 11- β -HSD1 expressziót csak somatotrop, lactotrop és follicularis sejtekben találtak [114]. A kortizol metabolizmusának megváltozása hozzájárulhat hypophysis tumor kialakulásához, ezt bizonyítja az a tény, hogy a

neoplasticus hypophysis tumorokban az ép szövethez képest 30%-al csökkent 11 β -HSD1 és jelentősen magasabb 11 β -HSD2 mRNS szintet mértek [115].

A mellékvese adenomák erős 11 β -HSD2 indukciót mutatnak a 11 β -HSD1 expresszió csökkenése nélkül. *In vitro* tanulmányok alapján azt feltételezik, hogy ez a váltás az izoenzim expressziójában, a két enzim sejtproliferációra és differenciációra kifejtett ellentétes hatásain keresztül manifesztálódik [116]. A 11 β -HSD1 csökkenti a sejtproliferációt azáltal, hogy az antiproliferatív kortizol lokális szintjét növeli, míg a 11 β -HSD2 a kortizol inaktiválásával egy proproliferatív szignált biztosít [117].

5.2.3.2.6. Állatmodellek

A metabolikus szindróma modellezése érdekében létrehoztak egy olyan transz-gén egértörzset, amely a zsírszövetben a normálisnál 2-5-ször nagyobb mértékben expresszálja a 11 β -HSD1-t, hasonló mértékben, mint amekkora expressziónövekedés tapasztalható az emberi fehér zsírszövetben metabolikus szindróma kapcsán. Ehhez egy zsírszövet-specifikus promotert, az aP2 (fatty acid-binding protein) promoterét használták. Az így léterhozott aP2-HSD11B1 egerekben a kortizol koncentrációja csak a zsírban fokozott, a vérplazmában normális, amely a hypothalamus-hypophysis-mellékvese tengely megtartott szabályozó működésére utal. Az egereken megfigyelhető a metabolikus szindrómához társított valamennyi tünet és állapot: glükóz intolerancia, inzulinrezisztencia, dyslipidaemia, leptinrezisztencia, törzsi elhízás, valamint hypertonia, amely a renin-angiotenzin rendszer aktiválódásával hozható összefüggésbe. A 11 β -HSD1 expresszió szorosan összefügg az adipocyták méretével [64, 118-124]. Az enzim túltermelésének mértéke a subcutan és a visceralis zsírszövetben megegyezett, az elhízás mégis elsősorban a visceralis területen jelentkezett, melynek az lehet az oka, hogy ezen a területen fokozottabb a glükokortikoid receptor expressziója [63, 64, 118, 119, 122]. Tehát, a modell tanúsága szerint, ha a 11 β -HSD1 aktivitása a humán obesitasban is mérhető szintre emelkedik, akkor az önmagában is képes metabolikus szindróma létrehozására [52, 64, 119, 122, 123].

A 11 β -HSD1-t a májban szelektíven túltermelő apoE-HSD11B1 egér sokkal enyhébb fenotípussal rendelkezik. A vér kortikoszteron szintje ebben a modellben sem változik a normálishoz képest. Az egerekben enyhe inzulinresztenciát találunk glükóz intolerancia nélkül. A zsírszövet állapota nem változik, az egerek nem híznak, ugyanak-

kor a máj zsírtartalmának emelkedése megfigyelhető, amely főleg trigliceridek felhalmozásából ered, de ehhez hozzájárulhat a dyslipidaemia illetve a máj lipid clearance-ének károsodása is. A 11β -HSD1 túltermelés mértékétől függően hypertonia is kialakul, amely arányos a máj angiotenzinogén elválasztásával. Összességében ez az állat modellezheti azok állapotát, akikben a májra korlátozó elzsírosodás, illetve egyéb okok metabolikus szindrómát okoznak elhízás nélkül [52, 125].

Mivel a 11β -HSD1 aktivitásának növekedése önmagában is képes lehet a metabolikus szindróma kiváltására, ezért gátlása nagyon ígéretes lehet ezen betegség kezelése szempontjából. A gátlás hatására létrejövő változások modellezésére hozták létre a funkcionális *HSD11B1*-hiányos (*Hsd11b1*^{-/-}, knockout, KO) egeret. Ezek az állatok a periférián nem képesek a 11-dehidrokortikoszteron \rightarrow kortikoszteron átalakításra, ennek ellenére életképesek, fejlődésük és szaporodóképességük normális, hypertóniájuk nincs [126]. Az emelkedett inzulin-érzékenység hátterében a májsejtek csökkent intracelluláris glükokortikoid termelése és ezáltal a relatív intercelluláris kortizol-hiány állhat, mely így a glükokortikoid célgének, pl. a G6Páz és a PEPCK expressziójának csökkenéséhez vezet, annak ellenére, hogy ezekben az állatokban enyhén megnagyobbodott mellékvesét és jelzetten emelkedett szérumban kortikoszteront találunk. Ezáltal pedig elmarad a stressz vagy elhízás által kiváltott hiperglicemiás válasz. A kritikus oxidatív válaszreakciók azonban nem érintettek. Az inzulin-érzékenység fokozódásának további következménye, hogy a 11β -HSD1 hiányában táplálékfelvétel hatására gyorsabban bekövetkezik a lipolysis gátlása és a lipogenesis fokozódása. Ennek megfelelően a plazmában csökken a glükóz és nő a trigliceridek koncentrációja, (elsősorban HDL). Összességében tehát a 11β -HSD1 működésének hiányában jobb a lipidprofil, nő az inzulin érzékenység, és csökken az atherosclerosis-hajlam [126, 127].

Leptin hiányos (*ob/ob*) és leptin rezisztens egér obesitas modellekben a májban lévő 11β -HSD1 expressziójának a csökkenését észlelték, a leptin hiányos egerekben rekombináns leptin hatására az obesitas visszafordítható volt, míg a rezisztens törzsekben nem. Leptin hatására ezekben az állatokban megnő a 11β -HSD1 expressziója a májban, ezáltal csökken a hypophysis-hypothalamus tengely aktivációja, így a szérumban kortizol és a vércukorszint is. Ezen hatások pedig nagyban hozzájárulnak, hogy leptin hatására az obesitas ezekben az állatokban visszafordítható [128].

5.2.3.3. A *HSD11B1* gén

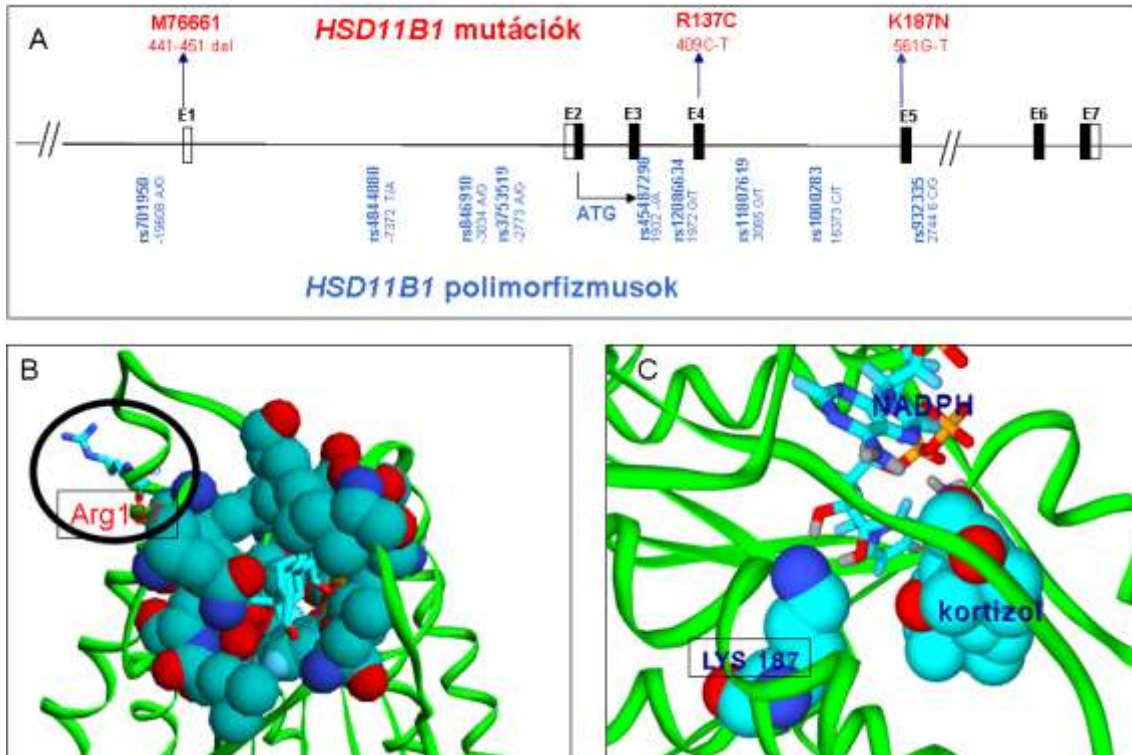
A humán 11 β -HSD1 fehérje génje, a *HSD11B1* az 1. kromoszómán helyezkedik el (1q32-q41); összesen 6 exon (rendre 182, 130, 11, 185, 143 és 617 bázispár hosszúságúak) és 5 intron (776, 767, 120, 25300 és 1700bp) alkotja [9] (**3. ábra A**). A gén azonosítása Tannin és munkatársai nevéhez fűződik [129].

Az enzim expressziójának szabályozásával kapcsolatban különféle szöveteken (elsősorban rágcsálókon) végzett vizsgálatok jelentős része nem tudott különbséget tenni a 11 β -HSD izoenzimek között. A számos, néhol akár egymásnak ellentmondó eredményt összegezve úgy tűnik, hogy a glükokortikoidok, a CAAT/enhancer binding protein (C/EBP), a peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) agonisták, és egyes proinflammatoricus citokinek (TNF α , IL-1 β) fokozzák a 11 β -HSD1 expresszióját, míg a növekedési hormon (IGF-1-en keresztül), és a máj X-receptor agonsiták gátolják azt. Egyéb faktorok, mint pl. a szexuálszteroidok, az inzulin vagy a pajzsmirigyhormonok hatása szövetenként eltérő lehet [9].

Patkány *Hsd11b1* promoterén végzett vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy azt elsősorban a C/EBP transzkripciós faktor család tagjai, legfőképpen a C/EBP α szabályozza, mely emellett a tápanyagok lebontásában közreműködő számos egyéb gén átíródását is vezérli [130], és mindeközben szövet specifikus glükokortikoid-hatás alatt áll [131]. A májban a magas bazális C/EBP α -szint fokozott 11 β -HSD1 transzkripcióval és következményes magas glükokortikoid koncentrációval jár [132].

5.2.3.3.1. A *HSD11B1* gén polimorfizmusai

Ismert tény, hogy a *HSD11B1* gén polimorfizmusai (elméleti összefoglalást l. 5.3 Genetikai áttekintés) befolyásolhatják a 11 β -HSD1 enzim működését, és ezáltal szerepet tulajdonítanak nekik egyes (kór)állapotokban, mint pl. az elhízás (magas BMI), az inzulinrezisztencia, a diabetes mellitus, a hipertonia, a polycystás ovarium szindróma (PCOS), vagy az Alzheimer-kór [133-137] (**1. táblázat**).



3. ábra: A HSD11B1 gén mutációk és polimorfizmusok elhelyezkedése (A). Két mutáns 11 β -HSD1 fehérje 3-dimenziós modellje: a 137-es pozícióban arginin (B); a 187-es pozícióban lizin (C).

A leggyakrabban tanulmányozott polimorfizmus a *HSD11B1* gén 3-as intronjában, a 83.557. pozícióban beékelődött adenin (83557insA). Ennek a polimorfizmusnak a jelenléte összefüggést mutatott a nagyobb testtömeg illetve az inzulinrezisztencia kialakulásával túlsúlyos gyermekekben [136], és az alacsonyabb szérumszinttel, ill. a HOMA-IR indexel (homeostasis model of assessment – insulin resistance) [138]. Mások nem találtak összefüggést a polimorfizmus előfordulása és a PCOS, illetve metabolikus szindróma fennállása, valamint a testtömeg összetétele között [139-141].

1. Táblázat: *HSD11B1*-variánsok klinikai összefüggései

Polimorfizmus	Esetszám	Vizsgált csoport	Hatás	Referencia
<i>83557insA</i> (<i>rs45487298</i>)	263	Kontroll, elhízott	Elhízottakban inzulinrezisztencia, nagyobb BMI	[9, 136]
	86	Kontroll, metabolikus szindróma	Kontroll csoportban csökkent éhomi inzulinszint, HOMA-IR, diasztolés vérnyomás	[138]
	217	Metabolikus szindróma	Nincs hatás	[139]
	192	Kontroll, PCOS	Nincs hatás	[140]
	6452	Kontroll, PCOS, cardiovascularis, neurológiai, szemészeti, endokrin betegek	Nincs hatás	[141]
	202	Kontroll, Cushing szindróma	Cushing szindrómában emelkedett osteocalcinszint	[142]
<i>rs12086634</i>	785	Kontroll, 2DM	2DM-es, metabolikus szindrómás betegekben ritkább	[143]
	839	Kontroll, 2DM	2DM, inzulinrezisztenciával függ össze	[137]
	600	Kontroll, PCOS	Vad allél összefüggése metabolikus szindrómával az <i>rs12086634</i> és <i>rs846910</i> polimorf allélek együttes hordozásakor, több zsírszöveti mRNS	[144]
	3551	Kontroll, PCOS és ACRD	Nincs hatás	[145]
	200	PCOS	Sovány PCOS: alacsony plazma kortizol és ACTH-ra adott fokozott kortizol válasz	[135]
	1018	Kontroll, PCOS	Nincs hatás	[146]

	1208	Kontroll, metabolikus szindróma	Nincs hatás	[147]
<i>rs932335</i>	1208	Kontroll, metabolikus szindróma	Nincs hatás	[147]
	1329	Postmenopausalis nők	Törési kockázat növekedés	[148]
<i>rs3753519</i>	534	Kontroll, elhízott	Elhízással összefüggés, csökkent kortizol szint	[149]
<i>rs11807619</i>	1307	Kontroll, emlőrák	<i>rs932335</i> polimorfizmussal együtt emlőrák	[150]
<i>rs1000283</i>	1329	Postmenopausalis nők	Törési kockázat növekedés	[148]
	918	Kontroll, 2DM	Emelkedett vérnyomás	[134]
<i>rs846910</i>	1425	Cardiovascularis betegek	Csökkent balkamra falvastagság	[151]
	600	Kontroll, PCOS	PCOS-ben metabolikus szindrómával összefüggés, <i>rs12086634</i> vad alléljával együtt, magasabb zsírszöveti mRNS szint	[144]
	86	Kontroll, metabolikus szindróma	alacsonyabb vérnyomásértékek és HOMA-IR, magasabb LDL-koleszterin	[138]
<i>rs701950</i>	1329	Postmenopausalis nők	Csökkent BMD	[148]
<i>rs4844880</i>	363	Kontroll, osteoporosis	Kedvezőbb csont paraméterek	[152]

HOMA-IR=homeostasis model of assessment - insulin resistance, BMD= csontsűrűség (bone mineral density), LDL=alacsony sűrűségű lipoprotein (low-density lipoprotein), PCOS= polycystas ovarium szindróma, ACRD= apparent cortisone reductase deficiency

A polimorfizmus 100%-ban kapcsolt egy másik genetikai variánssal az ún. *rs12086634* polimorfizmussal. Az *rs12086634* guanin-timin cserét okoz; a mutáns allél a guanin, mely az európai lakosság 25%-ában található meg. Funkcionális analízisek alapján ezek az allélok csökkentik a 11 β -HSD1 transzkripcióját, a klinikai vonzataik azonban nem egyértelműek. Az *rs12086634* allél gyakorisága szignifikánsan alacsonyabb volt olyan diabetes mellitusban szenvedő betegekben, akik metabolikus szindró-

mában is szenvedtek [143], azonban egy másik vizsgálatnak nem sikerült kapcsolatot kimutatnia Európai populációban a testtömeg, a glükóz anyagcsere és az InsA jelenléte között [139-141]. Pima indiánokban az rs12086634 polimorfizmus gyakrabban fordult elő 2-es típusú diabetes mellitusban szenvedő egyéneknél, mint egészségesekben [137]. A PCOS és az rs12086634 közötti lehetséges kapcsolatáról közölt adatok ellentmondóak. Sovány PCOS-s betegekben kapcsolatba hozták ezt a polimorfizmust az alacsony plazma kortizol szinttel és ACTH-ra adott fokozott kortizol válasz előfordulásával, még egy másik, nagy populáció vizsgálatán alapuló tanulmányban White nem talált kapcsolatot a polimorfizmus és kortizon reduktáz elégtelenség között, ill. a polimorfizmus hordozása e tanulmányban nem járt együtt PCOS-el [135, 145]. Nem sikerült különbséget kimutatni az rs12086634 előfordulási gyakoriságában 256 PCOS család, 213 sporadikus előfordulású PCOS-s beteg és 549 egészséges egyén között [146]. Az rs12086634 polimorfizmus 100%-os kapcsoltságban áll az rs932335 polimorfizmussal (+27447 G>C). Egy Japán tanulmányban nem sikerült szignifikáns összefüggést kimutatni e két polimorfizmus előfordulása és a metabolikus szindróma megjelenése között [147]. Az rs3753519 polimorfizmus elhízott gyerekekben összefüggést mutatott az elhízás mértékével és egyes társuló metabolikus jellemzőkkel, a hordozók körében ugyanakkor csökkent kortizol szintet igazoltak [149].

Munkacsoportunk endogén hiperkortizolizmusban szenvedő betegekben határozta meg az InsA allélgyakoriságát és kimutatta, hogy a polimorfizmust hordozó betegekben szignifikánsan magasabb a szérum osteocalcin szint [142]. Ez arra utal, hogy a glükokortikoid hatás szempontjából jelentős célszervben, a csontszövetben a polimorfizmus jelenlétével együttjáró csökkent 11β -HSD1 aktivitás szerepet játszhat a lokális glükokortikoid hatás modulálásában.

Az rs11807619 polimorfizmus egy guanin-timin csere. A mutáns allél a timin, mely az európai lakosság 16,7%-ában fordul elő. Ezt és a rs932335 polimorfizmust az emlőrák előfordulásával hozták kapcsolatba; a T allél jelenléte 40%-os kockázatnövekedést jelentett az emlőrák kialakulására. További vizsgálatok azonban azt mutatták, hogy az rs11807619 nem független kockázati faktor. Haplotípus modellezés szerint csak azok a haplotípusok hozhatók összefüggésbe az emlőrák kialakulásával, amelyek tartalmazzák az rs932335 C allélját is [150]. Ez a polimorfizmus a 4. intronban található és citozin-guanin cserével jár. A polimorfizmus ugyanakkor védőfaktornak bizonyult az

osteoporosissal szemben és csökkentette a csigolyatörés kockázatát postmenopausalis nőkben [148].

A csontsűrűség genetikai determináltsága jól ismert, és számos egyéb gén különböző polimorfizmusai mellett a *HSD11B1* gén polimorfizmusainak előfordulását is számos tanulmányban vizsgálták. A timin-citozin cserével járó rs1000283 polimorfizmus kedvező hatásúnak bizonyult a csont metabolizmusra postmenopausalis nőkben [148]. A *HSD11B1* promoterében guanin-adenin cserét okozó rs846908 polimorfizmus korrelációt mutatott a Sox5 transzkripció faktor mennyiségével, ami a porcképzésben játszhat szerepet [153]. Hwang és mtsai postmenopausalis osteoporosisban szenvedő nőket vizsgálva szignifikáns kapcsolatot találtak a disztális promoterben (rs701950) és az 5-ös intronban (rs1000283 és rs932335) található polimorfizmusok előfordulása és a gerinc törési kockázata, ill. egyes csontanyagcserére jellemző paraméterek között [148].

A szív-érrendszert érintő betegségek közül Pima indiánokban az rs846910 polimorfizmus egyértelmű összefüggést mutatott a hipertónia előfordulási gyakoriságával [134]. Heterozigóta gén-hordozókban szignifikánsan csökkent a bal kamra falvastagsága [151] és PCOS-ben szenvedő betegek körében a polimorf allél jelenléte metabolikus szindrómával járt együtt [144]. Dujic és mtsai alacsonyabb vérnyomásértékeket és HOMA-IR-t, valamint magasabb LDL-koleszterin szintet találtak polimorfizmust hordozókban [138].

5.2.3.3.2. *HSD11B1* és *H6PD* gének mutációi

A H6PDH és a 11β -HSD1 enzimek az endoplazmatikus retikulumban szorosan együttműködnek, biztosítva egymásnak a megfelelő kofaktorellátást (l. 0 p.14). A szimbiózis miatt felmerült, hogy egyes betegségek kialakulásában szerepe lehet olyan genetikai kombinációknak, amikor ezen enzimek egyes polimorfizmusai együttesen fordulnak elő. Az **1. Táblázat** mutatja be a jelenleg ismert *HSD11B1* gént érintő mutációkat, a leggyakrabban vizsgált polimorfizmusokat illetve a hozzájuk társított fenotípus jegyeket.

A *HSD11B1* korábban már említett 83557insA polimorfizmusának és a *H6PD* gén rs6688832 (R453Q)-as variánsának együttes előfordulását illetően, azonban az eredmények részben ellentmondóak. Önmagában mindegyik polimorfizmus képes csökkenteni *in vitro* a saját génjének expresszióját, együttes előfordulásukat pedig részben az endoplazmás retikulum csökkent NADPH-szintjén keresztül csökkent 11 β -HSD1-működéssel hozták kapcsolatba, és felvetették lehetséges kóros szerepét a kortizon redukáz elégtelenség (cortisone reductase deficiency, CRD) kialakulásában [51]. Ugyanakkor ezen két polimorfizmus együttes előfordulása nem minden esetben vezet CRD-hez, illetve nem találtak összefüggést az SNP-k együttes hordozása és a vizelettel ürített kortizon-kortizol származékok, a BMI, a hypertonia előfordulása, illetve a szérumban a glükóz és inzulin szintek között [140, 145].

Mindemellett mind a *HSD11B1*, mind a *H6PD* gén mutációi önmagukban is vezethetnek CRD-hez. Lavery és munkatársai 4 CRD-ben szenvedő beteg *HSD11B1* és *H6PD* génjeit megszekvenálva a *HSD11B1* esetében sem intronikus sem exonikus mutációkat nem találtak. Ezzel szemben 3 esetben homozigóta 1 esetben pedig heterozigóta mutációt találtak a *H6PD* génben. A mutációk *in vitro* csökkentették a transzkripciót és ennek megfelelően a mikroszómális preparátumokban a NADPH szintjét is. Ezeknél a betegeknél tehát valószínűleg az azonosított *H6PD* mutációk okozhatják a H6PDH enzim alulműködését, a 11 β -HSD1- azaz a kortizonreduktáz-funkció elégtelensége pedig ennek a következménye [154]. Egy újabb vizsgálatban két beteget elemeztek, akikben a vizelet szteroid profil mérések CRD gyanúját vetették fel. Mindkét betegben két-két mutációt igazoltak homozigóta formában. Az egyik betegben a 325. pozícióban található C nukleotid delécióját (c.325delC; R109AfsX3) és az újabban felfedezett P146L mutációt, míg a másik betegben csonkolt fehérjeláncot eredményező két mutációt (Q325X-t és Y446X) azonosítottak. *In vitro* heterológ expressziós vizsgálatok alapján mindkét párosítás a H6PDH enzim működésének jelentős csökkenésével járt együtt.

Lawson és munkatársai ugyanakkor olyan CRD-s gyermekeket vizsgáltak, akiknél a *H6PD* gén szekvenciájában nem találtak eltérést a normálhoz képest, míg a *HSD11B1* gén exonjaiban 2 mutációt is azonosítottak. A 4-es exonban található 409C-T (R137C) aminosav cserével járó és az 5-ös exonban lévő 561G-T (K187N) mutációról *in vivo* bebizonyították, hogy valószínűleg gátolják az enzim megfelelő működését,

ezáltal közvetlenül vezethetnek CRD-hez [155]. Molekulamodellezéssel igazolható, hogy a gátlás különböző úton valósulhat meg (**3. ábra**). Az 137. pozícióban lévő arginin molekula a sejtfelszínhez közel található és feltehetően a redoxpotenciált módosítja, míg a 187. pozícióban lévő lizin a szubsztrát kötésben vesz részt.

Ezeket a vizsgálatokat összegezve megállapítható, hogy a kortizon reduktáz hiány lehet egyrészt monogénes kórkép, melynek kialakulásához két különböző gén eltérései is vezethetnek, de elképzelhető az is, hogy a két génben együttesen előforduló genetikai variánsok közösen eredményezik a betegség manifesztációját. A közös funkció és a normális működés fenntartásához elengedhetetlen kooperáció mindkét lehetőséget alátámaszthatja.

Az abdominális elhízás kialakulását gyakran hozzák kapcsolatba a kortizol anyagcsere zavarával, különösen a 11β -HSD1 működésében bekövetkező változásokkal. Azok azonban nem minden esetben vezethetők vissza a *HSD11B1* kódoló régiójában, ill. az intron-exon határokon bekövetkező genetikai eltérésekre. Ugyanakkor Caramelli és mtsai 8 abdominális elhízásban szenvedő beteg vizsgálata során a gén nem kódoló régiójában azonosítottak egy mindezidáig „hatástalannak” tartott eltérést. Ez az 1-es exon 441-451-es pozíciójában (GenBank #M76661 exon 1) található 11 bp hosszú szakasz deléció valószínűleg egy tandem repeat szekvencia része, és sem a gén expressziójában sem pedig a splicing mechanizmusban nem okoz eltérést [156], így feltehetően nem játszik szerepet az elhízás kialakulásában.

5.2.3.4. A 11β -HSD1 gátlása, mint terápiás lehetőség

Számos élettani és patológias folyamatban játszott szerepe a 11β -HSD1 enzimet potenciális célponttá teszi e folyamatok farmakológiai kontrollja számára, ami megmagyarázza az utóbbi években fellendülő gátló hatású vegyületek fejlesztését célzó munkák nagy számát. A **2. Táblázat** vázolja ezekkel az inhibitorokkal kapcsolatos klinikai vizsgálatok eredményeit.

5.2.3.4.1. *A 11 β -HSD1 gátlószereinek hatása in vitro rendszerekben és állatkísérletekben*

A 11 β -HSD1 enzim 3D-s szerkezetének modellje ismert (**1. ábra C panel**), amely energetikailag és geometriailag megfelel az eredeti enzimszerkezetnek. Ezen modell segítségével 15 különböző feltételezett 11 β -HSD1 inhibitorot azonosítottak [39].

A szulfonamid szerkezetű vegyületek a 11 β -HSD1 szubsztrátjának kompetitív inhibitorai. A triazol szerkezetű vegyületek pedig nemcsak elfoglalják a katalitikus helyet, hanem módosítják is annak egy részét, illetve NADPH-t kötnek [39, 157]. Ezen inhibitorok közül a PF-00915275 a prednizolon generációs teszt és a vizelet metabolit reakciók alapján szelektív 11 β -HSD1 gátlószernek bizonyult, és alkalmazása az összes tesztelt dózisban biztonságos volt [158].

Az oleanan és az ursan az enzim szelektív gátlószerei mind a májban, mind pedig egyéb perifériás szövetekben, sőt a specificitásért felelős szerkezeti részt is sikerült azonosítani [159], de ezt klinikai vizsgálatokkal egyelőre nem bizonyították.

2-es típusú diabetes mellitusos transzgenikus, ún. KKAY egerek 10 napos, napi egyszeri 11 β -HSD1 inhibitor BVT116429 (3, 10, 30 mg/kg) vagy rosiglitazon (5 mg/kg) kontroll kezelésének hatására a rosiglitazonhoz képest a BVT116429 kezelés jelentősen csökkentette a vércukorszintet [160]. Egy másik 11 β -HSD1 inhibitor, a BVT2733, javítja a HbA1c-szintet, de nincs hatással az adiponectin szintjére [160]. Glükokortikoidok által indukált diabeteses KK transzgenikus egerek 28 napos 11 β -HSD1 antisens nukleotidokkal történő gátló kezelésének hatására a plazma glukóz szintje csökkent (szignifikáns csökkenést csak nagyobb gátlás hatására tapasztaltak). A 25. napon subcutan kortizont adtak az egereknek a diabeteses fenotípus kiváltása céljából. A vizsgálat során a vér kortizol szintje illetve a hepatikus 11 β -HSD1 mRNS mennyisége is csökkent [161].

Az arilszulfonamidotiazolinok a 11 β -HSD1 szelektív gátlásával a májban gátolják a glükoneogenezist, míg a 11 β -HSD2 izoenzim működésére nincs számottevő hatásuk [162].

HEK-293 sejtekben az adamantyl carboxamid új, potenciálisan szelektív 11 β -HSD1 enzim gátlószernek bizonyult [163].

5.2.3.4.2. Humán 11 β -HSD1 gátlók

5.2.3.4.2.1. Carbenoxolon (CBX)

A carbenoxolon a 11 β -HSD1 enzim gátlója, emberi szervezetben többet vizsgálták hatásmechanizmusát. Walker és munkatársai randomizált, keresztezett (crossover), dupla vak vizsgálatában 7 egészséges önkéntes vett részt, 7 napig 8 óránként 100mg CBX-t illetve placebót kaptak. CBX hatására kis mértékben, de szignifikánsan nőtt a placebohoz képest a teljes test inzulin érzékenysége. A vizsgálat során arra a következtetésre jutottak, hogy a gátló hatására csökken a máj kortizol szintje, megnő az inzulin érzékenysége és csökken a glükóz termelése [96].

Egy másik vizsgálat során 2-es típusú cukorbetegségben szenvedőket hasonlítottak össze egészséges kontrol egyénekkel egy randomizált, dupla vak, keresztezett gyógyszervizsgálat során. A cukorbetegségben szenvedők a diétán kívül más kezelésben nem részesültek, a CBX adagolása és dózisa megfelelt a Walker és mtsai által alkalmazottnak. A diabeteses betegekben CBX hatására csökkent a glükagon stimulált glükóz termelés és a glikogénolízis, míg egészségesekben ez a hatás nem volt megfigyelhető. Egészségesekben viszont csökkent a koleszterin szint, míg ez a hatás a beteg csoportban elmaradt [164].

Sandeep és munkatársai Andrewshoz hasonló gyógyszerkísérleti körülmények mellett 6 elhízott és 6 sovány férfit hasonlítottak össze egymással. Az obes egyének zsírszövetében a korábban tapasztaltaknak megfelelően ([84-86, 91, 92, 165, 166] és 5.2.3.2.2: p.17) jelentősen emelkedett a 11 β -HSD1 aktivitása, az össz-szervezeti kortizol azonban nem változott. Ezt jól magyarázhatja az a tény, hogy obesitasban csökken a máj 11 β -HSD1 aktivitása [85, 86, 90], és ez a két hatás összességében kompenzálja egymást. A korábbiakkal összhangban a CBX mind az obes mind a sovány egyéneknél hatékonyan csökkentette a vizeletben mért metabolitok alapján számolt, teljes testre vonatkoztatott kortizon-kortizol átalakulást, azaz a 11 β -HSD1 működést. Azonban lényegében hatástalan volt a zsírszövet 11 β -HSD1 aktivitására, és az inzulin-érzékenységre is. Korábban láttuk, hogy az inzulinérzékenységet a májban a carbenoxolon hatékonyan növeli egészséges és diabeteses betegekben [96] [164], obesitasban azonban ezek szerint hatástalan. Ennek oka valószínűleg, hogy obesitasban a májban csökken a 11 β -HSD1 aktivitása, és ezt a carbenoxolon hatékonyan tovább

csökkenteni már nem tudja. Ez alapvetően megerősíti azt az elméletet, hogy obesitasban a máj 11β -HSD1 aktivitásának csökkenése jótékony hatású, mely az inzulinrezisztencia kialakulása elleni védekezés eszköze lehet. Az obesitással szövődött diabetes mellitus kezeléséhez olyan gyógyszerre van szükség, amely a zsírszövetben is hatékonyan tudja gátolni a 11β -HSD1-t [167].

Ezzel egybevágó eredményre jutottak Tomlinson és munkatársai 7 egészséges önkéntesen végzett vizsgálatukban egyszeri 100mg illetve 72 órán keresztül 300 mg (napi 3x100 mg) carbanexolon adagolásával. A mintákat vérből illetve mikrodialíziskatóéter segítségével zsírszövetből gyűjtötték. Egyszeri 25 mg kortizon-acetát adását követően a CBX kezelés hatására a szérumban csak a 72 órás kezelés során, zsírszövetben az egyszeri CBX dózis hatására is csökkent a kortizol szint. A 11β -HSD1 gátlásán keresztül a CBX csökkenti a kortizol és a prednizolon képződését [168].

5.2.3.4.2.2. Egyéb gátlószerek

A szelektív 11β -HSD1 gátlószert PF-00915275 hatását vizsgálták egészséges önkénteseken, I. klinikai fázisú, dupla vak, placebo kontrollált, randomizált, többszörös dózis vizsgálat során. A gyógyszert 2 hétig adták a 62 egészséges férfinak és nőnek. A PF-00915275 biztonságos és tolerálható szelektív 11β -HSD1 gátlónak bizonyult, a hatást a vérben és a vizeletben található biomarkerek igazolták [158].

Rosentock és munkatársai az INCB13739 11β -HSD1 gátlószert hatásait vizsgálták 12 héten át 302 olyan 2-es típusú diabetes mellitusban szenvedő betegben, akik metformin terápiában részesültek. Szignifikánsan csökkent a placebót használókhöz képest az éhomi plazma glükóz és HbA_{1c} szint és a HOMA-IR. A hyperlipidaemiás betegekben szignifikánsan csökkent a teljes koleszterin, az LDL koleszterin és a triglicerid szint, illetve a betegek testsúlya. Ez a gyógyszer ígéretes lehet a 2-es típusú diabetes mellitusos betegek plazma glükóz kontrolljában, és hozzájárulhat a cardiovascularis rizikótényezők csökkentéséhez is [169].

Egy másik munkacsoport szintén 2-es típusú diabetes mellitusos betegekben vizsgálta egy másik 11β -HSD1 gátlószert, az MK-0916 hatását egy 12 hétig tartó, randomizált, placebo kontrollált, dupla vak kísérletben. Az éhomi plazma glükóz értékében nem volt szignifikáns különbség a gyógyszert szedők és a placebót szedők között.

A szérumban HbA1c, a hipertónia mértéke és a testsúly szignifikánsan csökkent a gyógyszeres kezelés során [170].

Shah és munkatársai az MK-0736 illetve az MK-0916 szelektív 11 β -HSD1 gátlók hatásait vizsgálták elhízott hipertóniás betegekben. Az MK-0736 hatására a placebohoz képest szignifikánsan csökkent az LDL és a HDL koleszterin illetve a testtömeg [171].

2. Táblázat: Humán 11 β -HSD1-gátlókkal végzett klinikai vizsgálatok

Gátlószer	Esetszám	Vizsgált csoport	Hatás	Referencia
<i>Carbenoxolon</i>	7	Kontroll	Csökkent máj kortizol termelés, csökkent glükóz képzés, megnövekedett inzulin érzékenység	[96]
	12	Kontroll, 2DM	2DM-ban csökkent glükóz képzés és glikogenolízis, egészségesekben csökkent koleszterin	[164]
	12	Kontroll, elhízott	Kontroll egyénekben máj 11 β -HSD1-gátlás	[167]
	7	Kontroll	Csökkent kortizolképzés (szérumban 72 órás kezelés során, zsírszövetben egyszeri dózis hatására)	[168]
<i>PF-00915275</i>	62	2DM	Szelektív 11 β -HSD1 gátlás	[158]
<i>INCB13739</i>	302	2DM	Csökkent HbA1C, éhomi glükóz és HOMA-IR. Hiperlipidémiás betegekben csökkent teljes és LDL-koleszterin, triglicerid, testsúly	[169]
<i>MK-0916</i>	154	2DM, metabolikus szindróma	Csökkent HbA1C, vérnyomás, testsúly	[170]
	108	Túlsúlyos, elhízott, hipertóniás	Csökkent vérnyomás	[171]
<i>MK-0736</i>	108	Túlsúlyos, elhízott, hipertóniás	Csökkent LDL, HDL, testtömeg	[171]

2DM=2-es típusú diabetes mellitus, HOMA-IR=homeostasis model of assessment – insulin resistance, LDL=alacsony sűrűségű lipoprotein (low-density lipoprotein), HbA1c=glikált-hemoglobin, HDL=magas sűrűségű lipoprotein (high-density lipoprotein)

5.3. Genetikai áttekintés

A polimorfizmus egy a különböző, gyakran összetéveszthetően elnevezett fogalmak közül, amelyekkel egy faj egyedeinek sokféleségét leírhatjuk. Polimorfizmusokról beszélhetünk mind a megjelenő tulajdonságot, a fenotípust illetően, mind pedig az azt meghatározó mögöttes genotípust, azaz a genetikai állomány változatainak kapcsán is. Ebben a dolgozatban elsősorban a második értelmében használom a fogalmat, mint genetikai- vagy génpolimorfizmus, a genetikai sokszínűség jellemzésére.

Egy génnek vagy génszakasznak azonos fajon belül több változata létezhet. Ezeket a változatokat a populációban való előfordulási gyakoriságuk alapján hívjuk mutációknak (allélgyakoriság <1%) vagy polimorfizmusnak (allélgyakoriság > 1%).

A polimorfizmus szót azonban a molekuláris biológiában gyakran ennél tágabb értelmében, a felsoroltak közül valamennyi genetikai változatra együttesen használják. Ebben az értelmében használva a polimorfizmus, mint kifejezés két nagy entitást takar. Az egyik csoportba sorolhatóak a hosszúságpolimorfizmusok (variable number of tandem repeats, VNTR), a másikba az általunk is vizsgált egy pontos nukleotidvariációk (single nucleotide polymorphism, SNP).

A genetikai eredetű betegségek többsége poligénes, tehát valószínűleg több génen egyszerre előforduló SNP-k vagy egy génen több SNP hatására alakulnak ki.

5.3.1. Polimorfizmusok hatása

Számos fehérje, így a dolgozatban tárgyalt 11 β -HSD1 funkciójának szabályozásában is kiemelt jelentőséggel bír jelen ismereteink szerint az enzim mennyisége és minősége, melyet elsősorban annak génje szabályoz. Nagyon fontosak tehát a végső enzimaktivitás szempontjából a gén különféle módosulásai, melyek akár pozitív, akár negatív irányban befolyásolják a keletkezett fehérjét. A polimorfizmusok génen belüli elhelyezkedése alapján megkülönböztetjük a kódoló illetve a nem kódoló szakaszokat érintő változásokat, amelyek igen eltérő módon hathatnak a gén működésére.

A nem kódoló szakaszok közül kiemelt jelentősége van a gén különféle szabályozó régióinak, így különösen a promotereknek. A promoterben található polimorfizmusok pl. módosíthatják a transzkripciós faktorok kapcsolódási pontjait, melyen keresztül felelősek lehetnek a gén fokozott vagy gátolt átírásáért.

A polimorfizmusok is lehetnek deléciók, inzerciók vagy nukleotidcserék. Amennyiben a kódoló szakaszban találhatóak a deléciók és inzerciók a nukleotidszekvencia hosszúságának megváltoztatásával eltolják a leolvasási keretet (frame shift), ezzel pedig új, általában korai stop kodont „hoznak létre” az mRNS-ben, ami a fehérjetermék rövidüléséhez, trunkációjához vezet.

A nukleotidcserék között megkülönböztetünk „silent”, synonymous SNP-eket, amelyek a genetikai kód „hibatűrésének” hála (egy-egy aminosavat több triplet kódol), aminosavcserével nem járnak, illetve ún. replacement polimorfizmusokat, amelyek aminosavcserével járnak. Az utóbbi kategórián belül a missense az eredeti helyett egy másik aminosav beépülését, a nonsense pedig az adott aminosav helyett stop kodon kialakulását jelenti.

A replacement polimorfizmusok hatása attól függ, hogy a fehérje mely részét érintik. Beleszólhatnak azokba a folyamatokba, amikor a fehérje aktív, vagy aktiválható konformációja kialakul, érintheti a fehérje sejten belüli lokalizációjáért felelős szakaszokat. Számos enzimnél kritikus a nem peptid oldalláncok kapcsolódása (pl. glikoziláció), illetve az homo- és hetero-dimerizáció. Nyilvánvalóan azok a polimorfizmusok, amelyek ezeket a régiókat érintik jelentősen befolyásolják az enzim aktivitását.

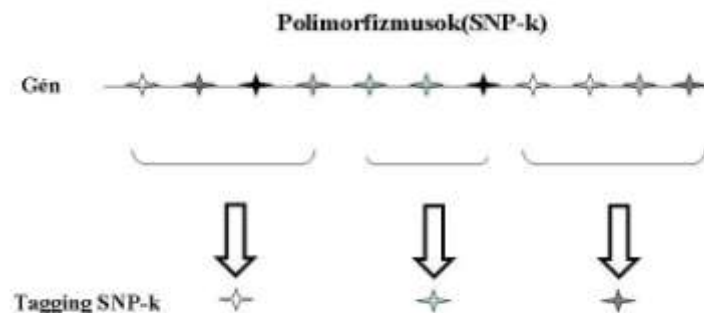
Az egyes polimorfizmusok hathatnak közvetlenül az enzimműködés szintjén is. Tipikusan az aktív centrumot illetve a szubsztrátkötő-helyet érintő mutációk tartoznak ide, melyek akár pozitívan, akár negatívan befolyásolják az enzim működését, pl. a szubsztrát-specifitást vagy -affinitást megváltoztatásával.

5.3.2. Tagging SNP-k

Egy adott génben egyszerre több SNP is előfordulhat, így azok kombinációi alapján az adott génnek számtalan különböző változata jöhet létre. Különösen, ha nem csak egy gént, hanem egy nagyobb szakaszt, vagy akár az egész genomot vesszük figyelembe. Így az egyes egyénekből található konkrét genetikai változatok jellemzése és még inkább azok összehasonlítása lehetetlenül összetett feladattá válik. A lehetséges SNP-kombinációknak azonban a valóságban csak töredéke létezik, egyes SNP-k jellemzően együtt fordulnak elő, kapcsolatosan öröklődnek. Ennek háttérében valószínűleg szelekciós mechanizmusok állhatnak, de az okok részleteiben nagyon kevésbé ismertek.

Az SNP-k kapcsolt öröklődésére, jellemző kombinációkban való előfordulására alapozva vezette be az International HapMap Project a haplotípus, illetve az azt jellemző tagging SNP fogalmát. Egy-egy haplotípusba az SNP-k egy-egy jellemző kombinációja, illetve az azt együttesen hordozó egyének tartoznak. A haplotípushoz tartozó SNP-k tehát mindig együttesen fordulnak elő, azaz bármelyik SNP adott allélje, jelenléte vagy hiánya egyértelműen meghatározza az adott haplotípusba tartozó valamennyi SNP genotípusát. Az egy-egy haplotípust meghatározó SNP-eket nevezzük tagging SNP-knek.

Ugyanakkor egy adott génszakasz a populációban létező eltérő genetikai változatainak jellemzéséhez a különböző kapcsoltan öröklődő „SNP csomagokból” elegendő egy-egy SNP-t megadni. Ezáltal nem csak a leírás, de a meghatározás is jelentősen egyszerűsíthető, hiszen nem kell minden egyes SNP-t ellenőrizni, elég csak haplotípusonként egyet-egyét. Ezen túl ez a megközelítés jelentősen megkönnyíti az egyes gének különböző változatainak funkcionális összehasonlítását is.



4. ábra: Tagging SNP-k sematikus ábrája

5.3.3. Kandidáns gének

A különféle genetikai változatok hatásának felderítésére egy gyakran használt eszköz, illetve vizsgálati megközelítés az úgynevezett kandidáns gének vizsgálata. A módszer lényege, hogy egy adott jelleggel vagy betegséggel kapcsolatba hozható genetikai változatokat csupán előre meghatározott génben vagy génekben (a kandidáns gén(ek)ben) keressük. Ezzel ellentétes a „genom-szintű asszociációkutatás” módszere,

amikor az egyes genetikai változatokat a teljes genomban keressük és értékeljük. A kandidáns géneket általában azok közül választjuk, amelyekről, korábbról már ismert, hogy az adott betegség vagy állapot kialakulásában valamiféle szerepük van [172, 173]. Ezen a megközelítés alkalmazásával általában eset-kontroll vizsgálatokban találkozhatunk, amikor olyan jellegű kérdésekre keressük a választ, hogy „gyakrabban fordul-e elő egy X kandidáns gén Y allélja Z betegségben, mint az egészségesek között?”.

Jelen dolgozatban tárgyalt vizsgálataim is lényegében ezt a megközelítést követték.

5.4. Osteoporosis

5.4.1. Az osteoporosis kialakulására hajlamosító kandidáns gének

Napjainkban a betegségek genetikai hátterének vizsgálatában, így az osteoporosis kutatásában is egyre gyakrabban alkalmazzák a kandidáns génekre fókuszáló genetikai asszociációs vizsgálatokat. A molekuláris genetikai módszerek fejlődésével párhuzamosan a tudásunk a csonttrikulás genetikájáról folyamatosan gyarapszik. HuGE Navigator (Version2) online elérhető adatbázis alapján jelenleg 931 kandidáns gén hozható összefüggésbe az osteoporosisal. A csontdenzitást befolyásoló genetikai variánsok közül a leggyakrabban vizsgált és jelenleg legfontosabbnak tartott kandidáns gének: a D-vitamin receptorát kódoló *VDR*, az I-es típusú kollagén α_1 láncát kódoló *COL1A1*, illetve az ösztrogén receptor α -t kódoló *ESR1* gének alkotják [174].

Az úgynevezett Rotterdam Study alapján a *VDR* gén promoterében és a disztális 3' végén található egy-egy polimorfizmus fokozott törési kockázattal járt [175], mert mindkét polimorfizmus a D-vitamin receptor expresszióját gátolta. A promoter SNP hatására csökken a *VDR* gén átíródása, a 3' végén található polimorfizmus pedig fokozza az átírt mRNS degradációját [174].

5.4.2. Glükokortikoidok indukálta osteoporosis

A glükokortikoidok csontállományra kifejtett hatása érvényesülhet direkt módon, a csontszöveten hatva, vagy indirekt módon, a különböző egyéb hormonok szintjének befolyásolásán keresztül [176, 177].

A glükokortikoidokat kiterjedten használják különböző gyulladássos és autoimmun megbetegedések kezelésére, vagy transzplantációt követően a kilökődés megakadályozására. A kezelés gyakori mellékhatása az osteoporosis. Olyannyira, hogy ez a leggyakoribb oka a gyógyszerek által okozott osteoporosisnak, sőt a csonttritkulás második leggyakoribb oka [178]. Nemrégiben egerekben sikerült igazolni, hogy az öregség hatására megnő a mellékvesekéreg glükokortikoid képzése, és fokozódik a csontban a 11β -HSD1 expressziója [179].

A glükokortikoidok a csontban több szinten hatnak, befolyásolják többek között az osteoblast- és osteoclastképzést, és hozzájárulnak az osteoblastok és osteocyták apoptózisához [180]. Ezt a csontban érvényesülő reguláló szerepet növekedési faktorok, citokinek, a kollagén- és alkalikusfoszfatáz-szintézis változásai, RANKL, RANKL-OPG, osteocalcin és osteopontin közvetíti [178].

A glükokortikoid kezelés állatmodellben gátolta az osteoblast proliferációt, és csökkentette a sejtek számát [181]. Ennek a hatásnak a hátterében *in vitro* osteosarcoma sejtvonalon a Ciklin-D3, ciklin-dependens kináz 4 (CDK4) és CDK6 csökkent, és a p21 és p27 ciklin-dependens-kináz inhibitorok fokozott expressziója áll [182]. *In vitro* a glükokortikoidok megkötik a β -katenint és gátolják a ciklin D1 hatását [183]. Gyorsan képesek gátolni az osteoblast proliferációt a mitogén-aktivált-protein-kináz foszfatáz 1 (MKP-1)/ extracelluláriszignál-regulált kináz (ERK) útvonalon keresztül [184]. Emellett hatással vannak az osteoblastok differenciációjára és működésükre is. A hatás létrejöttében többek között egyes transzkripciós faktorok, kinázok, mátrix-metalloproteinázok (MMP), a Wnt jelátviteli út, egyes csont morfogenetikai fehérjék (bone morphogenic proteins, BMPs), növekedési faktorok és azok kötő fehérjéi vesznek részt. Emellett a pro- és antiapoptoticus gének expressziójának módosításán keresztül befolyásolják az osteoblastok apoptózisát is [185, 186]. Összességében tehát elmondható, hogy jelenlegi ismereteink szerint egyszerre serkentik és egyben gátolják is az osteoblastok működését [182].

A glükokortikoidok hatása direkt és indirekt módon érvényesül az osteoclastokon is. A stroma sejtekben és az osteoblastokban csökkentik a proosteoclastikus citokinek: az IL-1 és az IL-6 termelődését. Fokozódik a RANKL/OPG arány (nő a RANKL és csökken az OPG), és ezáltal fokozódik a csontbontás [187].

5.5. Véletlenszerűen felfedezett mellékvese daganatok

A modern képalkotó vizsgálatok elterjedése óta drasztikusan megemelkedett a mellékvesét érintő térfoglaló folyamatokkal diagnosztizált esetek száma. Nagyon gyakran ezek az elváltozások hormontúltermeléssel nem járnak, így azokhoz a klasszikus hiperfunkciós klinikai tünetek sem társulnak. Jelenlétükre ezért általában egyéb okból végzett hasi vagy ritkábban mellkasi képalkotó vizsgálatok (UH, CT, MRI, stb.) során, mellékleteként derül fény. Definíció szerint ezeket véletlenszerűen felfedezett mellékvese térfoglaló folyamatoknak (daganatoknak), vagy incidentalomáknak nevezzük [188].

5.5.1. Incidencia

Előfordulási gyakoriságuk CT-vizsgálat alapján 0,35–4,36%, boncolási eredmények szerint 1,4-8,7%. Legmagasabb 70 éves életkor felett: 1,7–15,5% [189, 190]. Ritkán fordul elő 30 éves kor alatt, 50-70 éves kor között ennél valamivel gyakoribb. A nemek közötti megoszlás sem egyenletes, nők között gyakrabban fordul elő. Az elváltozás 11–16%-ban bilaterális [191, 192].

5.5.2. Etiológia

Szövettanilag az incidentalomák meglehetősen heterogén csoportot alkotnak (**3. Táblázat**). Az esetek mintegy 80%-ában benignus kéregadenoma áll a háttérben [193, 194]. A mellékvesekéreg adenomák kialakulásában szerepet játszó folyamatokat illetően a kép nem teljesen egységes. Kialakulásukat korábban főként lokális okokkal magyarázták, az úgynevezett „vascularis teória” szerint keringési zavar [195], illetve növekedési faktorok hatására hyperplasiás nodulusok alakulnak ki, amelyekből adenoma képződhet. Ezekben a betegekben a hipertonia, a 2-es típusú diabetes mellitus, a hyperlipidaemia és az obesitas előfordulása az átlag népességhez képest magasabb, melyeknek nem csak szövödményként, de provokáló tényezőként is szerepet tulajdonítanak. A teória szerint a mellékvesekéreg-adenomák azért találhatók meg nagyobb számban diabeteses és hypertóniás betegekben, mert a fent nevezett betegségek következtében kialakult vasculáris elváltozásoknak adenomát provokáló hatása lehet [79, 196-199].

Újabban egyre inkább felvetődik a mellékvesekéregre érintő genetikai elváltozások kóroki szerepe is. Az eddigi vizsgálatok több genetikai eltérést is összefüggésbe hoztak a mellékvesekéreg daganatok kialakulásával, többek között a *CYP21*, *CYP11*, *IGF-II*, *MEN1*, *p53*, *Wnt*, *H19*, G-fehérje, ACTH-receptor, glükokortikoid receptor gének mutációit/polimorfizmusait, a tumorok keletkezésének mechanizmusa azonban továbbra sem egyértelműen tisztázott [200, 201]. Egyik népszerű teória a congenitalis adrenalis hyperplasiával (CAH) hozza összefüggésbe a kéreg adenomák kialakulását, elsősorban a 21-hidroxiáz defektus szerepét valószínűsítik [202]. Ennek az lehet a magyarázata, hogy az enzim elégtelen működése következtében hiányzik a kortizol negatív feedback hatása, megnő az ACTH-termelés, és a mellékvese kéregállománya megnagyobbodik, amelyből feltételezések szerint nagyobb valószínűséggel alakul ki adenoma [203], bár egyesek ezt kétségbe vonják [204]. Még ha ezt el is fogadjuk magyarázatként, ez a mechanizmus akkor is csak a kéreg adenomák egy részéért lehet felelős, hiszen a 21-hidroxiázra érintő genetikai eltérést, az enzim génjének, a *CYP21B*-nek a csírasejtes mutációját mindössze a vizsgált esetek 15-20%-ában sikerült kimutatni [205, 206].

Az incidentalomások esetek fennmaradó mintegy 15-20%-áért nem mellékvesekéreg eredetű benignus elváltozások, primer malignus daganatok és metastasisok, illetve daganatokat utánzó nem neoplasiás térfoglaló folyamatok felelősek [188]. Az esetek 1–9 %-ában mellékvesekéreg carcinomát találunk [207, 208]. A malignitás egyik legfontosabb klinikai jelzője a daganat mérete, a benignus kéregadenomák általában <4 cm, a malignusak >6 cm méretűek. A metastasisok közül a tüdő, az emlő- és a vese eredetű carcinomák a leggyakoribbak [52, 188]. A véletlenszerű felismerés ellenére meglepően gyakori a phaeochromocytoma is [194].

A benignus kéregadenomák többsége nem jár a hormonháztartás zavarával, azaz hormonálisan inaktív, de 5-47%-ban kortizolt, 1,6-3,3 %-ban mineralokortikoidokat, illetve ritkán ösztrogént vagy androgént termelnek.

A hormonálisan inaktív carcinoma prevalenciája 1/250000-ből, az adenomák prevalenciája 1/4000-ből. Az incidentalomák 70%-a az előzetes vizsgálati eredmények alapján hormonálisan inaktív [209]. A hormonálisan inaktív daganatok 25%-a 1 cm-nél

nagyobb. A malignitás kockázata 1/1000. A 3 cm-ert meghaladó méretű daganatok nagyobb valószínűséggel hormontermelők, mint az ennél kisebbek [191].

3. Táblázat: A mellékvese régióban véletlenszerűen felfedezett daganatok szövettani felosztása [188]

<i>Eredet</i>	Benignus	Malignus
<i>Mellékvesekéreg</i>	adenoma , nodalis hyperplasia	primer carcinoma , carcinosarcoma
<i>Mellékvesevelő</i>	pheochromocytoma , ganglioneuroma	malignus pheochromocytoma, ganglioneuroblastoma
<i>Egyéb</i>	<ul style="list-style-type: none"> • neurofibroma, schwannoma, haemangioma, leiomyoma, teratoma, hamartoma, xanthoma • cysta, amyloidosis, lipoma, haematoma, infekciók (tuberculosis, histoplasmosis, blastomycosis, cryptococcosis, echinococcosis, pyogen abscessus) 	<ul style="list-style-type: none"> • ganglioneuroblastoma, malignus neurofibroma, malignus schwannoma, angiosarcoma, leiomyosarcoma, teratocarcinoma, lymphoma • metastasis
<i>Környező szövetek mellékvesét érintő térfoglaló folyamatai</i>	<ul style="list-style-type: none"> • aneurysma, haemangioma, cysta • a vese, a máj, a gasztrointesztinális rendszer és a hasnyálmirigy jóindulatú daganatai 	<ul style="list-style-type: none"> • malignus érdaganatok • a vese, a máj, a gasztrointesztinális rendszer és a hasnyálmirigy jóindulatú daganatai

5.5.3. Diagnózis

A véletlenszerűen felfedezett mellékvese elváltozások felismerése képalkotó vizsgálatokhoz köthető. Az esetek nagy része nem jár a hormontermelés zavarával, így klinikai tünetekkel sem, ezeket a betegeket általában elég megfigyelni, és időről időre kontrollálni. Az esetek egy részében azonban a hormontermelés valamilyen zavara, illetve annak klinikai jelei is megfigyelhetők, ilyenkor feltétlenül szükséges a beteg alaposabb kivizsgálása és szoros kontrollja, valamint az esetleges kezelése is.

5.5.3.1. Klinikai tünetek

Az incidentalomák által okozott klinikai tünetek nagy hányadéért az esetlegesen fennálló hormonális eltérések felelősek, klinikai tünetek fennállása ezért a hormonháztartás valamilyen zavarára utalhat ezekben a betegeknél.

Fokozott glükokortikoid-képzésre utalhat a hipertonia és az elhízás előfordulása a betegek körében. Tünetzegény phaeochromocytoma gyanúja merülhet fel abban az esetben, ha paroxysmalis fejfájásra, palpitatióra és cardialis eltérésekre panaszodik a beteg. Malignitás gyanúját veheti fel, ha a mérete alapján a daganat hasi vagy hátfájdalmat, hasi dyscomfortérzést, lázat, fogyást vagy alsó végtagi vénás thrombosit okoz. A mellékvese bevérézhet trauma, műtét vagy anticoaguláns kezelés hatására. Ezekre az elváltozásokra fokozott figyelmet kell fordítani, és a klinikai tünetek alapján mérlegelni kell a betegek alaposabb kivizsgálását [188].

5.5.3.2. Hormonlaboratóriumi vizsgálatok

Az incidentalomák esetében a klasszikus hormontúltermelés tüneteinek hiánya ellenére a betegek egy részében fokozott a hormontermelés. A magas hormon szintek káros hatásai miatt műtét javasolt, ha kortizol-, mineralokortikoid-, androgén- vagy katecholamintúltermelés igazolódik. A hormonvizsgálatok ezért elengedhetetlenül szükségesek incidentalomák felismerése esetén.

Pheochromocytoma kizárása céljából 24 órás gyűjtött vizeletből mérjük a katecholaminok (adrenalin és noradrenalin), illetve azok lebontásakor keletkező végtermékek (metanephrin, normetanephrin, valin-mandulasav = VMA) koncentrációját. A plazma katecholaminszint meghatározásának diagnosztikai értéke az alacsony specificitása miatt erősen korlátozott. Normális katecholaminszint nem minden esetben zárja ki a phaeochromocytoma jelenlétét. Ezért helyettük metabolitjaik, a metanephrin és a normetanephrin szintjét határozzuk meg. A vizsgálatok specificitása és szenzitivitása a phaeochromocytoma diagnosztikájában eltérő, bár a plazma katecholamin-metabolitok diagnosztikai értéke majdnem 100 % [210, 211].

Incidentalomák esetén a különböző endokrin szindrómák közül 1-2%-ban Cushing-szindrómát, 1-5%-ban primer aldosteronismust, és elég ritkán androgén- vagy ösztrogéntermelő mellékvese daganat előfordulását tapasztalhatjuk. Az ACTH-kortizol tengely fokozott aktivitására több dolog is utalhat, többek között a biológiailag aktív kortizol szint növekedése a nyálban vagy a vizeletben, a kortizol napszaki ritmusának a hiánya, dexamethasonnal nem szupprimálható plazma kortizol szint, illetve az alacsony plazma-ACTH és dehidroepiandrosteron-koncentráció. A normális bazális kortizol szint ellenére a fentebb említett eltérések igazolják a glükokortikoidtúltermelést. Az

endogen hiperkortizolizmus igazolására az elsővonalbeli szűrővizsgálatok közé tartozik a kis dózisu dexamethason szupressziós teszt (1 mg). Ennek két változata van, az egyik a rövid, a másik a hosszú teszt. A rövid dexamethason teszt egyszerűen kivitelezhető, de hátránya, hogy kevésbé jó a specificitása. Éjfélkor 1 mg dexamethason adunk a betegnek, a másnap reggeli vérmintából pedig elvégezzük a kortizol meghatározását. A hosszú dexamethason teszt specificitása jobb, de a betegből nagyfokú együttműködést igényel. Két napon keresztül 6 óránként 0,5 mg dexamethason adunk, majd plazmakortizol-meghatározást végzünk. A teszt eredménye ritkán álpozitív is lehet, mert a dexamethason a májban lévő CYP3A4 enzim bontja le, bizonyos gyógyszerek pedig indukálják az enzim működését. A dexamethason és az induktor gyógyszerek együttes alkalmazása a dexamethason gyors metabolizálásához vezethet, emiatt elmarad a hatása. A napi vizelet kortizolürítés változatossága elfedheti a valódi Cushing-kórt, illetve álpozitív eredményt is adhat, ezért a referenciatartomány felső határának négyszeres értékét fogadjuk el valódi Cushing-betegségnek, és ennek 2-3 alkalommal való ismétlése ajánlott [3]. Az éjszakai nyál kortizolkoncentrációjának diagnosztikus értékéről egyre több tanulmány született az elmúlt időszakban. Nagy előnye a módszernek, hogy egyszerűen kivitelezhető, és nem szükséges az egészségügyi személyzet közreműködése a mintavételhez. A vizsgálat szenzitivitása és specificitása is 90% feletti [212] Cushing-szindróma diagnosztizálása esetén. Az osteoporosis és a sűrűmesteocalcin-szintjének csökkenése is fokozott glükokortikoidtermelést jelezhet.

Mineralokortikoidtútermelésre utalhat a hypertonia, hypokalaemia, alacsony plazma renin-szint és a plazma magasabb aldosteronkoncentrációja is.

Az esetek 5-40%-ban szubklinikus Cushing-szindrómát találhatunk [191, 209, 213]. Egyes feltételezések szerint idővel valódi Cushing-szindróma alakulhat ki belőle, de erre még egyértelmű bizonyítékokat nem találtak. Az esetleges műtétet illetően is megoszlanak a vélemények [188].

Az enyhe szteroidtútermelés jele lehet az alacsony plazma DHEAS szint. A tumor kortizoltútermelése a hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg tengely szupresszióján keresztül csökkenti a paranodularis mellékvese állomány adrenalis androgén (DHEA) szekrécióját. Az alacsony DHEA-szint jóval gyakoribb a hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás (NFAA) betegekben, mint a szubklinikus

Cushing-szindrómára jellemzőnek tartott kortizolszekréció szuppressziójának elmaradása a kisdózisú dexamethason teszt során [197].

Jellegzetes eltérés, hogy a normális bazális plazma-17-OH-progeszteron-szint ACTH stimuláció hatására a betegek 30-71%-ban hiperreaktív választ mutat, ez a daganatok csökkent 21-hidroxiláz-aktivitására utalhat [214] [215].

5.5.3.3. Képkalkotó vizsgálatok

Az incidentalomák diagnosztikájában ezért a képkalkotó vizsgálatoké a vezető szerep. A betegség felismerését követően azonban újra kell értékelni az esetlegesen fennálló klinikai tüneteket is, illetve feltétlenül szükséges a hormonháztartás zavarainak kizárása. A kivizsgálás menetét illetően általánosságban a 2002-es NIH konszenzus ajánlása az elfogadott [191], de egyesek ennek némi módosítását javasolják [216].

Incidentalomák CT-vizsgálattal való értékelésekor az elváltozás helye és mérete mellett a denzitása is hasznos információval szolgál a diagnózis tekintetében. A benignus kéregadenoma CT kép alapján történt diagnosztizálásának a specificitása és szenzitivitása 100% [191]. A benignus elváltozások általában 4 cm-nél kisebbek, míg a 6 cm feletti méret malignitásra utal. A nagy zsírtartalom miatt a benignus mellékvesekéreg adenomák átlagos denzitása 10 Hounsfield-egység (HU) alatt van, általában 2 HU körüli. Egyéb daganatoknál ez az érték átlagosan 30 HU [191]. Mellékvese-daganat malignitására utalhat a >6 cm daganat méret, echopeniás területek megjelenése, necrosis, vérzés, kalcifikáció, illetve az echogén szegély, a szabálytalan alak, az inhomogén szerkezet, valamint a csökkent zsírtartalom, melynek következtében denzitása a lágyrészekhez hasonlóvá válik [217]. Ilyen esetben alapos kivizsgálást követően, ha a daganat mérete 4 és 6 cm közötti, felmerül a műtét lehetősége. A kontrasztanyag-kimosásos módszerek, bár hasznosnak bizonyultak, mégsem terjedtek el, különösképpen bonyolult kivitelezésük miatt. A gadólińium kontrasztanyaggal végzett vizsgálatok sem bizonyultak megbízhatóbb módszernek a malignitás és a benignitás elkülönítésére.

A chemical shift MRI módszer, úgy tűnik, beváltja a hozzá fűzött reményeket. A mérés azon alapul, hogy a protonok a víz- és a zsírmolekulákban eltérő frekvenciájú rezgést folytatnak, amely által jól elkülöníthetőek. A vizsgálatok elvégzésével pontosabban tudunk különbséget tenni a jó és a rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatok között. A malignus daganat kontrasztanyag beadása után inhomogénné válik, és intenzi-

tásnövekedést tapasztalunk. T1 súlyozott felvételen a májhoz képest hipointenzív vagy izointenzív, T2 súlyozás esetén hiperintenzív lesz a malignus elváltozás. A benignus mellékvesekéreg adenoma ezzel szemben T1 súlyozott MR felvételen a májhoz viszonyítva hipointenzív, T2 súlyozott felvételen izointenzív [218-223].

A szcintigráfia mint a képalkotó vizsgálatok funkcionális kiegészítő módszere alkalmazható a diagnosztikában. A mellékvesekéreg sejtjei az izotóppal jelzett koleszterint szteroidtermelő aktivitásukkal arányosan veszik fel. Nem hiperfunkciós benignus mellékvesekéreg adenomák esetében a daganattal megegyező oldalon izotópdúsulás mutatható ki, míg a másik oldalon csökkent az izotópfelvétel. Az octreotid szcintigráfiával végzett vizsgálatok tapasztalatai szerint mellékvesekéreg-carcinomában konkordáns izotópdúsulás mutatható ki, míg benignus mellékvesekéreg-daganatokban ez elmarad. Emiatt ez a módszer is alkalmazható a végleges diagnózis felállításakor. A pontosabb diagnózis érdekében jó lenne, ha bizonyos módszerek jobban elterjednének a klinikai gyakorlatban. Például a PET használata, a tumor markerek biopsziával történő meghatározása, a plazma szabad metanephrin szintjének a meghatározása mind hozzájárulna a végleges diagnózis pontosabb meghatározásához [191].

A 18-F-fluoro-dezoxi-glükózzal végzett PET vizsgálat az onkológiai diagnosztikában már bizonyította pontosságát [217], de tapasztalat híján még nem terjedt el széleskörű alkalmazásban az incidentalomák kivizsgálása kapcsán.

Az adrenocorticalis elváltozások elkülönítő diagnosztizálására javasolják a radionukleotid szcintigráfia alkalmazását. Phaeochromocytoma kizárására pedig az MIBG-szcintigráfia (meta-jodo-benzil-guanidin) és a PET alkalmazható.

5.5.3.4. Egyéb diagnosztikai lehetőségek

Percutan aspirációs vékonytű-biopszia nem bizonyult kellően megbízhatónak a benignus és malignus mellékvesekéreg-daganatok elkülönítésében, emiatt ritkán kerülnek alkalmazásra. Csak kellőképpen indokolt esetben merül fel, mint diagnosztikai módszer. Ellenjavallt a biopszia, ha phaeochromocytoma gyanúja merül fel [224].

5.5.4. Kezelés

Kutatási eredmények szerint, ha az elváltozás malignitásra nem gyanús és a hormontúltermelés klinikai és biokémiai tünetei hiányoznak, elegendő a betegek rend-

szeres kontrollvizsgálata. Az ellenőrzés úgy a leghatékonyabb, ha az adenoma felfedezése után 6, 12 majd 24 hónappal ultrahang vagy szükség esetén CT vizsgálat történik. Ugyanilyen rendszerességgel a klinikai tüneteket és az alapvető biokémiai értékeket is ellenőrizni kell.

Az incidentalomák elsőként választandó terápiája az adrenalectomia. Amennyiben ez valamilyen okból mégsem járható út, a hormontúltermelést gátló gyógyszeres kezelés alkalmazandó.

Adrenalectomia mindenképpen indokolt, ha a daganat mérete nagyobb, mint 6 cm, ha növekedést tapasztalunk, ha képalkotó vizsgálat alapján felmerül, hogy az elváltozás nem adenoma, illetve ha hormontúltermelés egyértelmű jeleit fedezzük fel [191]. A „néma” phaeochromocytomák és a képalkotó vizsgálatokkal egyértelműen malignusnak ítélt elváltozások esetében műtét javasolt [188].

Látszólag nem hiperfunkciós mellékvesekéreg adenoma eltávolítása után hypadreniás krízis jelentkezhet a nem daganatos mellékvesekéreg atrophijája miatt. Ha a mellékveseműtét előtt elvégzett koleszterin-szcintigráfia csak a daganatos oldalon mutat aktivitást, a betegek perioperatív szteroidszubsztitúciós kezelést igényelnek. Munkacsoportunk adatai szerint az adrenalectomia hosszú távon nem csökkenti a cardiovascularis megbetegedések kockázatát [225].

Általánosságban elmondható, hogy a kezdetben hormontúltermeléssel nem járó incidentalomákból viszonylag ritkán fejlődik ki manifeszt Cushing-szindróma [226-228], ugyanakkor gyakran tapasztalunk enyhe hormonális eltéréseket; többek között alacsony az DHEAS-szint, emelkedett 17-hidroxi-progeszteron és az ACTH-ra adott megnövekedett 17-hidroxi-progeszteron-válasz gyakori ezekben a betegekben [214, 229]. A tumor mérete követéses vizsgálatok során úgy tűnik hosszútávon nem változik [230, 231]. Azoknál a betegeknél akiknél mégis növekedett a daganat átmérője nagyon ritka jelenség a malignizálódás [227, 228, 232, 233].

5.5.5. Szubklinikus Cushing-szindróma

A korábban tárgyalt hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomák a klasszikus hormontúlprodukciós kórképeket (Conn-szindróma, Cushing-szindróma) nem okozó elváltozások. Hormonlaboratóriumi mérések segítségével irodalmi adatok szerint

az esetek 5-40%-ában azonban igazolható egy úgynevezett szubklinikus autonóm glükokortikoidtúlermelés (subclinical autonomous glucocorticoid hypersecretion, SAGH), más néven szubklinikus Cushing-szindróma [191, 209]. Prevalenciája nagymértékben függ a definíciótól, a diagnosztikus módszerektől és a kritériumok felállításától.

Diagnosztikus értékű lehet az alacsony ACTH-szint [197, 198, 209, 213], a kortizol cirkadián ritmus amplitúdójának mérséklődése vagy eltűnése, miközben a reggeli kortizolszint a normál tartományban marad [198, 209, 213]. A dexamethason szuppressziós teszt szintén alkalmas a betegség diagnosztizálására [234, 235]. Az éjszakai vizelet illetve szérumban mért kortizol mérésekkel kapcsolatosan ellentmondásosak az eredmények [199, 236, 237].

Az NIH legfrissebb, 2002-es ajánlása szerint a szubklinikus Cushing-szindróma diagnosztikus kritériumai [191]:

1. hiányoznak a hormontúlermelés jelei
2. 1 mg dexamethasonnal a kortizoltermelés nem gátlható
3. egyéb eltérések találhatóak a hypothalamus–hypophysis–mellékvese tengely működésében (reggeli szérumban mért kortizol, vizelet szabad kortizol, ACTH)
4. CT felvételen mellékvese adenoma diagnosztizálható

A glükokortikoid-túlermelés anyagcsere hatásainak következménye lehet a hypertonia, a 2-es típusú diabetes mellitus, a hyperlipidaemia és az obesitas, amelyek gyakran fordulnak elő hormonálisan inaktív kéregadenomás betegekben [79, 196-199]. Ezek az anyagcsere betegségek a cardiovascularis rizikót növelő hatásúak, vagyis fokozott az akut myocardialis infarctus, az angina pectoris, a stroke és a perifériás érbetegség, valamint a hirtelen halál bekövetkezésének veszélye.

Szubklinikus Cushing-szindrómában irodalmi adatok szerint mindenképpen javasolt a műtét elvégzése [213]. Habár az adenoma műtéti eltávolításának hatására a betegek biokémiai abnormalitásai egyes vizsgálatok szerint rendeződtek [238], a hosszú távú hatásokat illetve a betegek életminőségének változását illetően kevés adat áll rendelkezésre, és azok is ellentmondásosak [225, 239].

6. Célkitűzések

A 11 β -HSD1 enzim alul- vagy túlműködése számos betegség kórlefolyásában játszhat kulcsszerepet, vagy azokat akár jelentős mértékben módosíthatja. Jelenlegi ismereteink alapján úgy tűnik, hogy aktivitása szabályozásának egyik legfontosabb eleme a megfelelő kofaktorellátáson túl a rendelkezésre álló enzim mennyisége és annak endogén aktivitása. Ez pedig elsősorban az enzim génjének, azaz a *HSD11B1*-nek a működésétől, szerkezetétől függ.

PhD munkám során célul tűztem ki, hogy a *HSD11B1* gén korábban már azonosított, de funkcióval még nem, vagy csak részben társított genetikai változatait feltérképezzem, a jelentős genotípus-fenotípus összefüggést mutató variánsok funkcióját tisztázzam. Munkám célkitűzései az alábbiak voltak:

1. *In silico* módszerekkel online adatbázisok segítségével (NCBI, Hapmap) a *HSD11B1* gén promoterében található genetikai variánsok feltérképezése.
2. Az így azonosított SNP-k allélgyakoriságának meghatározása egészséges nőkből álló hazai populációban.
3. A polimorfizmusok egészséges nők csontanyagcseréjére gyakorolt hatásának elemzése.
4. Annak vizsgálata, hogy ezek a hatások megjelennek-e:
 - a. postmenopausalis osteoporosisban szenvedőkben, illetve
 - b. a hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás nőkben.
5. A klinikai paraméterekkel összefüggést mutató egyik génváltozat funkcionális hatásának tisztázása *in vitro* rendszerben.

7. Módszerek

7.1. Betegek és kontrollok

Mind a betegek, mind az egészséges kontrollok a kaukázusi populációból származnak. A kutatás elvégzését a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága engedélyezte. A tájékozott beleegyezésen alapuló hozzájárulást a kutatás összes résztvevőjétől megkaptuk.

7.1.1. Kontroll csoport

A polimorfizmusok vizsgálatához 209, független mintaválasztásból származó egészséges nő DNS-ét gyűjtöttük össze. A kontroll csoportba tartozó hazai egészséges személyek átlagéletkora: 47.3 ± 15.3 (20-83 év).

A kontroll csoportból való kizáró kritériumok:

ismert endokrin betegség

metabolikus csontbetegség

a csont ásványi anyag tartalmát befolyásoló gyógyszeres kezelés

7.1.2. Osteoporoticus betegcsoport

A Semmelweis Egyetem II. Sz. Belgyógyászati Klinikáján postmenopausalis osteoporosisal diagnosztizált 154 nőbeteget vizsgáltam. Átlagéletkoruk: 69.2 ± 8.7 (44-86 év). A felhasznált minták és klinikai adatok a diagnózis felállításakor készültek.

A csoportból való kizáró kritériumok:

- a diagnózis felállítása előtt:
 - hormonterápia
 - anti-osteoporoticus terápia
 - antikoaguláns kezelés
- ismert endokrin betegség az anamnézisben: hypercortisolismus, pajzsmirigy-, mellékpajzsmirigy-, hypophysis- vagy mellékvese rendellenesség

7.1.3. Hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás betegcsoport

Munkám során a Semmelweis Egyetem II. Sz. Belgyógyászati Klinikáján diagnosztizált és kezelt 71 hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás nőbetegen végeztem vizsgálataimat. A diagnózis időpontjában a vizsgált betegek életkora átlagosan 59,17 év ($\pm 11,08$) volt.

A mellékvesekéreg adenoma diagnosztizálása CT vizsgálat alapján történt, az alkalmazott diagnosztikus kritériumok az NIH ajánlásának megfelelően a 4 cm-nél kisebb méret, a homogenitás, a szabályos és jól elkülöníthető határok illetve a 10 HU-nál kisebb denzitás.

A vizsgálatba bevont valamennyi beteg részletes hormonális kivizsgáláson is átesett, melyeknél az irányadó szintén a 2002-es NIH konszenzus ajánlása volt. Mértük a reggeli (8 és 9 óra között), éjféleli illetve alacsony dózisú dexamethason szupressziós tesztet követő szérumban a kortizolszinteket, valamint az egyes csontanyagcsere-markereket, az osteocalcint és a humán I-es típusú kollagén C-terminális kereszteződéseit (β -crosslaps, CTX). A méréseket elektrokemilumineszcens immunoassay-vel végeztük (Elecsys, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland) a gyártó előírásainak megfelelően. A szérumban a kortizonszint meghatározásához saját fejlesztésű radioimmunoassay-t alkalmaztunk [240]. Vizelet és plazma metanephrin szint meghatározása mellett a hypertóniás betegeknél szérumban a nátrium, kálium és aldosteron/renin mérés is történt. Ezen kívül minden betegnél meghatároztuk a dehidroepiandroszteron, a 17-hidroxiprogesteron, a tesztoszteron és plazma ACTH-szintet.

Azokon a betegeken, akiknél korábban diabetes mellitus nem volt ismert, orális glükóztolerancia tesztet végeztünk (75g glükóz 250ml vízben oldva), melynek értékelésekor az 1999-es WHO kritériumoknak megfelelően definiáltuk a csökkent glükóztoleranciát illetve a diabetest. Hypertóniásnak tekintettük azokat a betegeket, akik a kivizsgálás idején antihypertensív kezelésben részesültek vagy vérnyomásuk több alkalommal is 140/90 Hgmm felett volt. Túlsúlyosnak tekintettük azokat a betegeket, akik testtömegindexe 25 és 30 kg/m² között volt, elhízottnak, obesnek azokat, akiké 30 kg/m² fölött.

A vizsgálatba bevont betegek nem részesültek anti-osteoporoticus-, glükokortikoid-, antikoaguláns vagy egyéb hormonpótló kezelésben a diagnózis felállítása előtt.

A vizsgálatot a Semmelweis Egyetem helyi Etikai Bizottsága engedélyzte, a betegeket tájékozott beleegyezés birtokában vontuk be.

7.2. Csontsűrűség mérés

A csontsűrűség mérés kettős röntgen foton-abszorpciometria (DEXA) segítségével történt az ágyéki csigolyák (L1-L4) és a teljes femur, valamint femur-nyak, trochanterikus és intertrochanterikus régiókon Hologic 4500 denzitóméter (QDR 4500C, Hologic Inc., Waltham, MA, USA; Software version 9.03) segítségével. A mérés során meghatároztuk a vizsgált csont ásványi anyag tartalmát (BMC= bone mineral content, gramm) és felületi sűrűségét (BMD=bone mineral density, g/cm^2). A mért csontsűrűség-értéket (BMD) összehasonlítottuk az azonos nemű fiatal egyének csúcs-csontsűrűségével, és az attól való eltérést szórásegységben (standard deviation, SD) adtuk meg, ezáltal a mért régiók T-score értékeit határoztuk meg. A másik használatos viszonyszám a Z-score: ez a nemben és korban illesztett egészséges populáció átlagától való eltérést mutatja, szintén SD-ben kifejezve. A mérésekhez a gyártó által megadott referencia értékeket használtuk. Minden általunk mért napon a műszert a gyártó által készített gerinc-fantommal kalibráltuk. A femorális csontsűrűség mérésekhez a NHANES III. normálértékeket használtuk referencia adatbázisként [241].

7.3. *In silico* adatbázis-kutatás

A *HSD11B1* promóter polimorfizmusainak feltérképezése *in silico* kutatással történt online elérhető adatbázisok (NCBI dbSNP; Hapmap: www.hapmap.org, release no. 27) segítségével.

7.4. Molekuláris biológiai módszerek

7.4.1. Genotipizálás

A polimorfizmusok kimutatásához a kontroll személyek és betegek vérmintáiból DNS-t izoláltunk kereskedelmi forgalomban kapható reagensek segítségével (Qiamp

DNA Blood Kit, Qiagen, USA; DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Boehringer Mannheim, Németország).

A vizsgált egyéneket a *HSD11B1* polimorfizmusaira nézve genotipizáltam allélspecifikus Real Time PCR-rel illetve egyes esetekben további megerősítésként direkt DNS szekvenálással is.

7.4.1.1. Valós idejű (Real Time) PCR

Az általam vizsgált polimorfizmusok (rs4393158, rs11576775, rs17389016, rs760951, rs4844880, rs3753519, rs12086634, rs11807619, rs2884090, rs4844488) genotipizálása Taqman SNPAssay-vel történt (c_29224629_20, c_348288_10, c_33738645_10, c_2502436_10, c_2502442_10, c_27474627_10, c_22275467_10, c_2502454_10, c_2502457_10, c_32356811_10, Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, California, USA). A Real-Time PCR-t a gyártó javaslatának megfelelően végeztem 7500 Fast Real-Time PCR System gépen (Applied Biosystems).

4. Táblázat: HSD11B1 polimorfizmusok genotipizálásához használt probe-ok

<i>Polimorfizmusok</i>	Allélek	FAM-al jelölt probe-ok 5'-3' szekvenciája	VIC-el jelölt probe-ok 5'-3' szekvenciája
<i>rs4393158</i>	A/G	TCTCATACACATC ACTCAGTAATG	AGTTCTTATAGGCCGTACAG CCTGA
<i>rs11576775</i>	A/G	TTTATGAGGCTAGA GCAGTGATTGT	TTAATAAATACTTGATTGTT TAATC
<i>rs17389016</i>	C/T	ACTTTTGCTTGCTA TATTAATAAAA	GTTTATTCCCCTCCTACTCTC TGTT
<i>rs760951</i>	A/G	AGTTGCCTCCAAAA TGCCATGCTTT	CTTGCTCTAGCCATTCAGGC TACCT
<i>rs4844880</i>	T/A	TAGTACCTGACCAA CAGTAAATACC	GAGCATTTCAATGGTGT TATTC
<i>rs3753519</i>	A/G	TTTTTAAACTTTGT TGACAACCCC	GTTGTATTTTCAATTTGTCTTT ATTA
<i>rs12086634</i>	G/T	GATTTCTTAATATA GCCATCTCTTG	GAATGGGAAAGGTATCAAC CCCAGA
<i>rs11807619</i>	G/T	AGGAAATGTGTCCA GAGAAATGGTC	CAATTTAAACAACCAGCTG GGTAGG
<i>rs2884090</i>	C/T	AAAAGACTCAGTTG CTTTAAATATT	TATTTTGAAGTGAAACTGGA CATCA
<i>rs4844488</i>	A/G	AAAGGAGAATATA AATGTGCCCAA	CACAAATAGAAAAGTAGGT CTTAAG

Az allél diszkrimináción alapuló Real-Time PCR lényege, hogy a 2 eltérő allélt egy reakcióban ki tudjuk mutatni, mivel a két allélt egy-egy különböző fluoreszcens festékkel jelölt specifikus probe ismeri fel (FAM illetve VIC), így a reakció során annak az allélnak megfelelően keletkezik jel, amelyet a vizsgált személy hordoz. Ha mindkét allélnak megfelelően keletkezik jel, akkor a vizsgált személy heterozigóta arra az SNP-re.

5. Táblázat: Genotipizáláshoz használt Real Time PCR protokoll

1.	50°C	2 perc	
2.	95°C	10 perc	
3.	95°C	15 másodperc	40 ciklus
	60°C	1 perc	

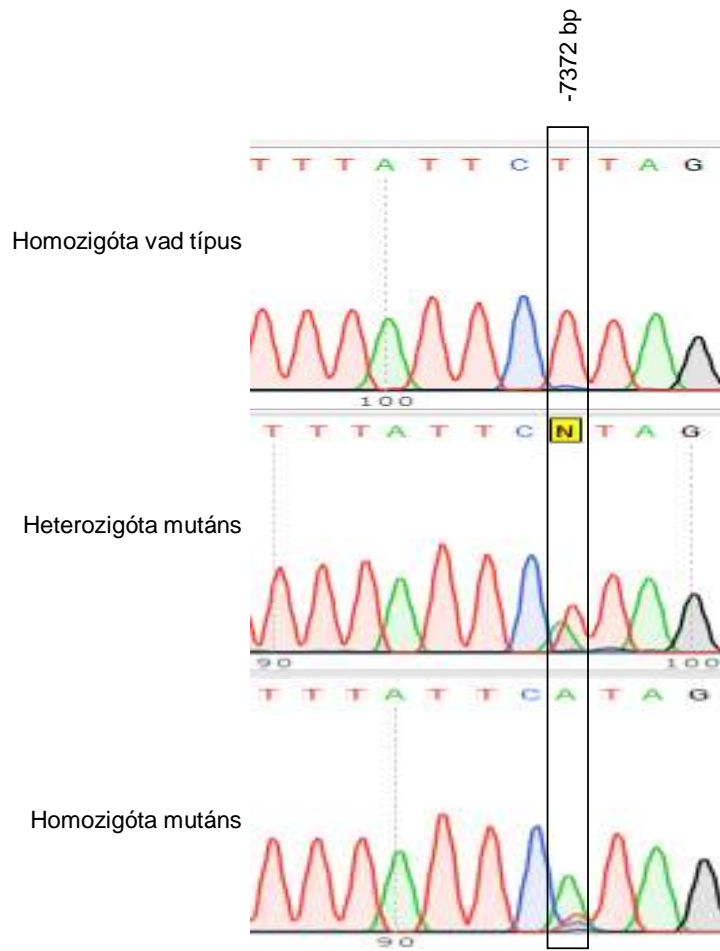
7.4.1.2. Direkt DNS szekvenálás

Az rs4844880-as polimorfizmus jelenlétét direkt DNS szekvenálással erősítettem meg. Először PCR reakcióval felszorzoztam a kérdéses génszakaszt, melyhez a PCR primereket a Primer 3 (<http://simgene.com/Primer3>) szoftverrel terveztem. Ezek felhasználásával a megadott protokollnak megfelelően PCR reakciót végeztem (**6. Táblázat**). A primerek koncentrációja 12,5 pM volt.

6. Táblázat: PCR protokoll: rs4844880 szekvenáláshoz

<i>A reakció összetétele:</i>			Primerek 5'-3' szekvenciája
1.	2,5 µl	forward primer	5'-CTCCCTTCATTATGCCCCTA-3'
2.	2,5 µl	reverse primer	5'-TAGAAGTGGCAGTGGGCTTT-3'
3.	5 µl	desztillált víz	
4.	12,5 µl	Hot Start enzim	
5.	50 ng	DNS minta	
<i>PCR reakció futási paraméterek:</i>			
1.	95°C	7 perc	
2.	95°C	45 másodperc	37 ciklus
	57°C	45 másodperc	
	72°C	45 másodperc	
3.	72°C	10 perc	
4.	4°C	-	

Az amplifikált PCR terméket 1 %-os agaróz gélen megfuttattam, majd enzimatikusan tisztítottam (Shrimp Alkaline Phosphatase, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Végül az így nyert terméket Big Dye Terminator Cycle-Sequencing kittel 310 Genetic Analyser készüléken (mindkettő Applied Biosystems) szekvenáltam (**5. ábra**).



5. ábra: DNS szekvenálás eredménye és kiértékelése

7.4.2. *In vitro* funkcionális vizsgálatok

7.4.2.1. Luciferáz riporter vektor konstrukció

In vitro funkcionális méréseimhez a *HSD11B1* promoter megfelelő szakaszait PCR segítségével nyertem ki (7. és 8. Táblázat), melyhez a szükséges primereket magam terveztem (Primer 3, simgene.com). Az így felamplifikált DNS szekvenciá(ka)t szükség esetén egymáshoz ligáltam DNA Ligase-zal (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA). Majd XmaI, KpnI és/vagy NcoI (New England BioLabs) restriktív enzimemésztést követően 5'→3' irányban pGL3 basic vektorba (Promega, Madison, Wisconsin, USA) klónoztam Pfu hóálló stabil polimeráz (Easy-A High-Fidelity PCR Cloning Enzyme, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) segítségével. A primerek koncentrációja 20pM volt.

7. Táblázat: PCR protokoll: *HSD11B1*-kontroll szekvencia

<i>A reakció összetétele:</i>			Primerek 5'-3' szekvenciája
1.	1,25 µl	forward primer	5'-ATCCCGGGTCCTTCATAGACCTCGAGCTCTG-3'
2.	1,25 µl	reverse primer	5'-TACCATGGCAGGGAGCTGGCCTGAAG-3'
3.	9 µl	desztillált víz	
4.	12,5 µl	Hot Start enzim	
5.	50 ng	DNS minta	
<i>PCR reakció futási paraméterek:</i>			
1.	95°C	5 perc	
2.	95°C	30 másodperc	30 ciklus
	62,5°C	40 másodperc	
	72°C	90 másodperc	
3.	72°C	10 perc	
4.	4°C	-	

8. Táblázat: PCR protokoll: rs4844880 körüli szekvencia

<i>A reakció összetétele:</i>			Primerek 5'-3' szekvenciája
1.	1,25 µl	forward primer	5'-ATGGTACCGTGCCTCTGCTTGCCTCTCC-3'
2.	1,25 µl	reverse primer	5'-ATCCCGGGGAGGATCACTTGTGGCTAGGAG-3'
3.	9 µl	desztillált víz	
4.	12,5 µl	Hot Start enzim	
5.	50 ng	DNS minta	
<i>PCR reakció futási paraméterek:</i>			
1.	95°C	5 perc	
2.	95°C	30 másodperc	30 ciklus
	62,5°C	40 másodperc	
	72°C	90 másodperc	
3.	72°C	10 perc	
4.	4°C	-	

Az elkészült konstruktok direkt DNS szekvenálással történő ellenőrzéséhez azokból Endo Free Plasmid Maxi kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével DNS-t preparáltam. A plazmidok DNS koncentrációját és minőségét 1%-os agaróz gélelektroforézis illetve spektrofotométer (GeneQuant II. RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech, GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) segítségével ellenőriztem.

7.4.2.2. Célsejtek

Kísérleteimhez humán epitheloid cervix carcinoma (HeLa) sejteket használtam. A sejteket 37°C-on 5% CO₂ mellett tenyésztettem MEM-ben, 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco by Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA), 1% nátrium-piruvát és 1% antibiotikum-antimikotikum oldat (penicillin, streptomycin,

amphotericin B, Antibiotic Antimycotic Solution, Sigma-Aldrich, Budapest) jelenlétében.

7.4.2.3. Tranziens transzfekció

A tranziens transzfekciót 10^4 /well HeLa sejten, 96 well-es plate-en végeztem, antibiotikum-mentes médiumban. A sejteket a következő napon transzfektáltam 150 ng koncentrációjú „firefly vektort” tartalmazó plazmidokkal illetve transzfekciós kontrollként 150 ng renilla luciferáz vektorral (pRL-TK, Promega, Madison, Wisconsin, USA). A transzfekcióhoz Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) reagenst alkalmaztam a gyártó protokolljának előírásai szerint. A kísérletek során negatív kontrollként pGL3-basic (Promega) vektorral transzfektált sejteket alkalmaztam. Négy órával később a médiumot antibiotikum-mentes 10% FBS-t és 1% Na-piruvátot tartalmazó MEM tápra cseréltem.

7.4.2.4. Dual-luciferáz assay

A luciferáz assay-t a transzfekció után 24 órával Dual-Glo Luciferase Assay Systemmel (Promega) végeztem a gyártó utasításainak megfelelően. Minden kísérletet legalább 5 alkalommal megismételtem, mérésenként 6 párhuzamossal. A kapott eredményeket kísérletenként a transzfekciós kontrollként használt renilla luciferáz tartalmazó mintákra normalizáltam.

7.5. Statisztikai módszerek

Az összes polimorfizmus esetében ellenőriztem a Hardy-Weinberg egyensúlyt. A polimorfizmusok kapcsoltságát (LD blocks) és az r^2 értékeket HaploView (release 4.1, Dr. Mark Daly's lab, MIT/Harvard Broad Institute, Cambridge, Massachusetts, USA) program segítségével határoztam meg.

A normalitás ellenőrzéséhez Shapiro-Wilk's W-tesztet alkalmaztunk. Normális eloszlású változóknál a Student-féle t-tesztet, a nem normális eloszlásúaknál pedig a Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztam az átlagok összehasonlítására.

Luciferáz assay-vel mért adatok kiértékeléséhez az SPSS statisztika program (IBM SPSS Statistics version 19.0, IBM Corp., Armonk, New York, USA) segítségével

egy utas ANOVA-t majd Bonferroni posthoc tesztet alkalmaztam. Az allélgyakoriságok csoportok közötti összehasonlításához Chi négyzet vagy Fischer tesztet használtam.

Az eredmények értékelése során a $p < 0,05$ értékeket tekintettem szignifikánsnak.

8. Eredmények

8.1. A *HSD11B1* promoter polimorfizmusainak feltérképezése

In silico módszerekkel azonosítottam a *HSD11B1* promoterében található polimorfizmusokat. A keresést a *HSD11B1* gén start kodonjától 5' irányban található kb. 28 kilobázis méretű területen végeztem el. Az online elérhető adatbázisokban ezen a szakaszon 64 darab polimorfizmus található (**9. Táblázat**). Ez a szám azonban túlságosan nagy volt a további elemzésekhez, a részletes genotipizáláshoz, ezért a következőkben több lépésben szűkítettem a potenciálisan funkcionális aktivitással rendelkező polimorfizmusok beazonosítását.

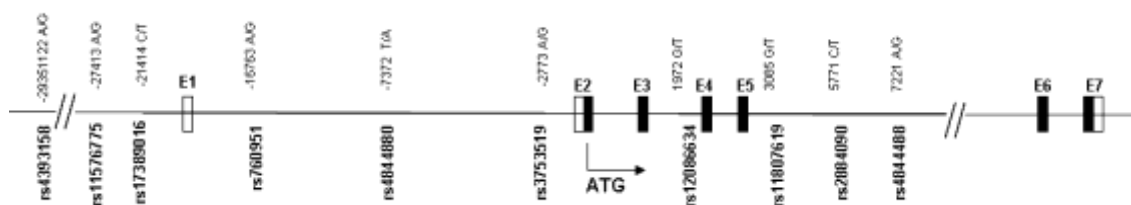
9. Táblázat: *HSD11B1* promoterében található polimorfizmusok

	rs ID	Allélok (vad típus / polimorf allél)	Pozíció (Távolság a start kodontól, bp)
1	rs13306421	A/G	-2
2	rs45446000	A/G	-606
3	rs13306420	C/T	-620
4	rs28365144	G/T	-630
5	rs45463794	C/G	-706
6	rs36212444	C/T	-775
7	rs45617539	A/G	-810
8	rs13306419	A/G	-849
9	rs11590066	A/C	-1237
10	rs36212447	C/T	-1413
11	rs12047442	C/G	-1503
12	rs846911	A/C	-2037
13	rs72188955	-/AGGGTTGA	-2408
14	rs35479221	-/C	-2431
15	rs846910	A/G	-3034
16	rs2357075	A/G	-5574
17	rs72468060	C/T	-5682
18	rs10863782	A/G	-5698
19	rs10863782	A/G	-5698

20	rs11805981	A/G	-5840
21	rs11804533	A/G	-5921
22	rs846909	A/G	-5938
23	rs861762	A/G	-6431
24	rs72362387	-/ATAGATAGATAG	-6748
25	rs3059689	-/ATAG	-6748
26	rs71685160	-/AGAT	-6749
27	rs71684038	-/TAGA	-6774
28	rs71923470	-/AGATAGATAGATTAGAT	-6787
29	rs34533406	-/C	-6952
30	rs12143228	C/T	-7171
31	rs73089418	A/G	-7218
32	rs4844880	A/T	-7372
33	rs60132042	G/T	-7937
34	rs12757955	C/T	-9716
35	rs12734051	C/T	-9717
36	rs12757955	C/T	-9719
37	rs73089412	G/T	-10573
38	rs11119326	G/T	-12260
39	rs71777347	-/TGGGGG	-12329
40	rs11119326	G/T	-12330
41	rs60737212	-/GG	-12324
42	rs10863780	A/T	-12491
43	rs35096215	-/A	-12576
44	rs76262683	A/C	-12865
45	rs1883442	C/T	-12928
46	rs12030418	A/C	-13393
47	rs12039840	C/T	-14464
48	rs6656906	C/T	-14519
49	rs114347302	C/T	-15468
50	rs76067112	A/G	-17193
51	rs12565406	G/T	-17202
52	rs34580232	-/C	-17523

53	rs56740489	-/T	-17748
54	rs57218199	A/G	-18523
55	rs45444995	C/T	-18777
56	rs45509093	G/T	-19172
57	rs45498403	A/T	-19184
58	rs45521040	A/G	-19602
59	rs701950	A/G	-19609
60	rs45441700	C/T	-19966
61	rs11119325	A/T	-20119
62	rs45594439	C/T	-20143
63	rs 17389016	C/T	-21414
64	rs11576775	A/G	-27413

A gén ténylegesen előforduló változatait a különféle haplotípusok adják. Egy egyén haplotípusa pedig tagging SNP-vel lényegében ugyanolyan pontosan leírható, mint valamennyi különálló polimorfizmus genotipizálásával. Ezért a továbbiakban a fentiek közül csupán a tagging SNP-ekkel foglalkoztam (**6. ábra**).



6. ábra: Tagging SNP-k a *HSD11B1* proximális szakaszán

Mivel az egyes haplotípusokat jellemző tagging SNP-k némelyike nem a szorosan vett promóter régióban található, hanem vannak közöttük intronikus elhelyezkedésűek is, vizsgálataimat kiterjesztettem ezekre is. (Természetesen lehetnek exonikus tagging SNP-k is, de azok allélgyakorisága nagyon kicsi volt ezért jelen vizsgálatainkból ezeket kizártuk.) Az így kapott halmazt tovább szűkítettük a populációban 5%-nál gyakrabban előforduló változatokra. Így a kritériumok finomhangolása után további

vizsgálatainkat a *HSD11B1* gén proximális 38 kilobázisnyi szakaszának haplotípusain, illetve az azokat jellemző tagging SNP-ivel végeztem.

8.2. *A HSD11B1 gén polimorfizmusainak allélgyakorisága*

Az általam vizsgált tagging polimorfizmusok allélgyakorisága az egészséges populációban megegyezett a HapMap adatbázisban található kaukázusi populációra vonatkozó nemzetközi adatokkal (**10. Táblázat**). Az összes általam vizsgált SNP Hardy–Weinberg egyensúlyban volt.

10. Táblázat: *HSD11B1* tagging SNP-k allélgyakorisága hazai és nemzetközi populációkban

SNP	n=	Allélfrekvencia	
		Egészséges kontrollok	Kaukázusi populáció (HapMap release 27)
<i>rs4393158</i>	89	0,04	0,06
<i>rs11576775</i>	160	0,178	0,241
<i>rs17389016</i>	160	0,122	0,119
<i>rs760951</i>	155	0,17	0,112
<i>rs4844880</i>	209	0,16	0,161
<i>rs3753519</i>	156	0,12	0,097
<i>rs12086634</i>	161	0,175	0,25
<i>rs11807619</i>	161	0,141	0,153
<i>rs2884090</i>	160	0,19	0,25
<i>rs4844488</i>	88	0,023	0,075

8.3. *A HSD11B1 gén polimorfizmusainak hatása a csontanyagcserére egészséges nőkben*

Célkitűzéseimnek megfelelően vizsgálni akartam az egyes polimorfizmusok csont metabolizmusra és –funkcióra gyakorolt hatását. A csontok működésének megítéléséhez klinikai méréseket alkalmaztam (l. 7.2.).

Elsőként arra a kérdésre kerestem a választ, hogy egészséges egyéneknél van-e bármilyen korreláció az egyes *HSD11B1* promoter haplotípusok és a csontok metabo-

lizmusa között. A vizsgált egyének általános metabolikus státuszának durva közelítéssel való becsléséhez a testtömeg-indexet használtam, mely többek között a glükokortikoid-hatásokkal is jelentősen összefügg. Nem függ viszont az egyes *HSD11B1* promoter haplotípusoktól eredményeink szerint (**11. Táblázat**).

A csont anyagcserét jellemző, anabolikus/katabolikus egyensúlyra utaló hormonértékek (osteocalcin, β -crosslaps) szintén függetlenek a *HSD11B1* promoter genetikai változatától (**11. Táblázat**).

A csontok ásványianyag-tartalmának jellemzésére a BMD, T- és Z-score értéket alkalmaztam. Két *HSD11B1* SNP mutatott szignifikáns összefüggést a vizsgált csontsűrűség-értékekkel: az rs4844880 a lumbális csigolyák csontsűrűségével (L1-4 BMD), az rs3753519 a femurnyak BMD-vel (**11. Táblázat**). A csontanyagcsere és a *HSD11B1* promoter haplotípusok összefüggése statisztikailag a legerősebbnek az rs4844880-as SNP esetében bizonyult, ezért a továbbiakban erre a polimorfizmusra fókuszáltam.

11. Táblázat: A csontanyagcsere jellemzésére használt csontsűrűség illetve a vérben mérhető biokémiai markerek és az egyes *HSD11B1* tagging SNP-k közötti kapcsolat statisztikai eredményének p értékei

SNP	BMI	Szérum		L1-4 csigolya			Femurnyak		
		osteocalcin	β -crosslaps	BMD	T-score	Z-score	BMD	T-score	Z-score
rs4393158	0,242	0,463	0,375	0,768	0,607	0,9	0,338	0,086	0,64
rs11576775	0,632	0,945	0,301	0,632	0,836	0,938	0,578	0,765	0,780
rs17389016	0,906	0,661	0,898	0,942	0,936	0,998	0,746	0,711	0,311
rs760951	0,201	0,724	0,210	0,574	0,929	0,815	0,807	0,713	0,837
rs4844880	0,894	0,945	0,194	0,022*	0,155	0,174	0,677	0,780	0,531
rs3753519	0,457	0,787	0,190	0,056	0,213	0,419	0,029*	0,948	0,641
rs12086634	0,953	0,725	0,728	0,555	0,620	0,491	0,311	0,474	0,423
rs11807619	0,828	0,740	0,779	0,377	0,429	0,316	0,310	0,411	0,321
rs2884090	0,982	0,508	0,648	0,647	0,688	0,521	0,255	0,310	0,200
rs4844488	0,491	0,183	0,346	0,503	0,369	0,511	0,572	0,669	0,097

* p<0,05 (ANOVA)

8.4. A HSD11B1 polimorfizmusok és a csontanyagcsere kapcsolata idiopathiás osteoporosisban és mellékvese adenómás nőbetegekben

A következő vizsgálataim arra irányultak, hogy az egészséges egyénekből tapasztalt összefüggések vajon megtalálhatóak-e postmenopausalis osteoporosisban, illetve a hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenómás nőbetegekben is. Az utóbbi betegcsoportban feltételezhető a glükokortikoid-anyagcsere károsodása, ezért a polimorfizmus és a csontsűrűség között igazolt összefüggések eltűnhetnek.

8.4.1. Az rs4844880-as polimorfizmus összefüggése a csontsűrűséggel postmenopausalis osteoporosisban és hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenómás nőbetegekben

8.4.1.1. Postmenopausalis osteoporosisban

Az rs4844880-as polimorfizmus postmenopausás osteoporosis esetén kialakuló hatásainak vizsgálatához kontrollként az egészséges egyének csoportját a postmenopausalis nőkre szűkítettem. Ezekben az egészséges postmenopausalis nőkben az rs4844880-t hordozók körében szignifikánsabb jobbak a lumbális csigolyák állapotát jellemző L1-L4 BMD, Z-score és T-score (**12. Táblázat**) értékek, amely a szivacsos csontokon megfigyelhető kedvező hatásra utal. A szignifikancia a korra és a BMI-re való illesztés (adjusztálás) után is megmaradt 92% és 100% erősség (power) mellett (100% BMD, 96% Z-score és 92% T-score).

A polimorfizmusnak a csontsűrűsége kifejtett hatását 154 csontritkulásban szenvedő nőben is vizsgáltam. Az egészséges és az osteoporoticus nők között az SNP allélgyakorisága azonos volt (0,128 illetve 0,136).

12. Táblázat: Az rs4844880-as polimorfizmus és a csontanyagcsere összefüggése egészséges postmenopausalis nőkben

<i>Paraméterek</i>		rs4844880-t hordozók (n=26)	rs4844880-t nem hordozók (n=75)	p érték
<i>Átlagéletkor ,év</i>		60,2 ± 7,3	62,2 ± 7,7	0,72
<i>BMI, kg/m²</i>		29,8 ± 5,9	27,7 ± 5,1	0,12
<i>Szérum</i>	<i>osteocalcin, ng/ml</i>	26,2 ± 8,6	27,3 ± 11,8	0,77
	<i>β-crosslaps, ng/ml</i>	0,49 ± 0,15	0,43 ± 0,21	0,33
<i>L1-4</i>	<i>BMD, g/cm²</i>	1,12 ± 0,24	1 ± 0,14	0,007*
	<i>T-score</i>	-0,09 ± 1,04	-0,61 ± 0,93	0,04*
	<i>Z-score</i>	0,5 ± 1,14	-0,04 ± 0,93	0,039*
<i>Femurnyak</i>	<i>BMD, g/cm²</i>	0,79 ± 0,12	0,74 ± 0,17	0,44
	<i>T-score</i>	-0,79 ± 1,11	-0,81 ± 1,24	0,96
	<i>Z-score</i>	0,46 ± 0,94	0,31 ± 0,98	0,057

Átlag±SD; * p < 0.05 Student féle T-próba vagy Mann-Whitney U-teszt.

A csonttrikulásban szenvedő nőkben (**13. Táblázat**) az rs4844880-t hordozókban jobbak voltak a femurnyak BMD, T-score és Z-score értékek (100%-os erősséggel). Ennek háttérében a csont felépítő és –lebontó folyamataiban bekövetkezett változás állhat, melyre a szignifikánsan nagyobb osteocalcin és alacsonyabb β-crosslaps szintek utalnak (93 és 99%-os erősséggel).

13. Táblázat: Az rs4844880-as polimorfizmus és a csontanyagcsere összefüggése postmenopausalis osteoporoticus nőkben

<i>Paraméterek</i>		rs4844880-t hordozók (n=37)	rs4844880-t nem hordozók (n=117)	p érték
<i>Átlagéletkor, év</i>		68,9 ± 7,6	69,2 ± 8,4	0
<i>BMI, kg/m²</i>		24,3 ± 8,4	22,9 ± 9,3	0,67
<i>Szérum</i>	<i>osteocalcin, ng/ml</i>	36,9 ± 8,9	32,6 ± 14,5	0,018*
	<i>β-crosslaps, ng/ml</i>	0,37 ± 0,56	0,57 ± 0,25	0,013*
<i>L1-4</i>	<i>BMD, g/cm²</i>	0,78 ± 0,12	0,77 ± 0,17	0,96
	<i>T-score</i>	-2,48 ± 1,11	-2,32 ± 1,17	0,77
	<i>Z-score</i>	-0,57 ± 1,13	-0,67 ± 1,08	0,88
<i>Femurnyak</i>	<i>BMD, g/cm²</i>	0,63 ± 0,15	0,6 ± 0,13	0,05
	<i>T-score</i>	-1,82 ± 1,08	-2,37 ± 0,9	0,004*
	<i>Z-score</i>	-0,04 ± 0,99	-0,58 ± 0,77	0,001*

Átlag±SD; * p < 0.05 Student féle T-próba vagy Mann-Whitney U-teszt.

8.4.1.2. Az rs4844880 és az rs12086634 SNP-k összefüggése a csontdenzitás és a csontanyagcsere szérum markereivel hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás nőkben

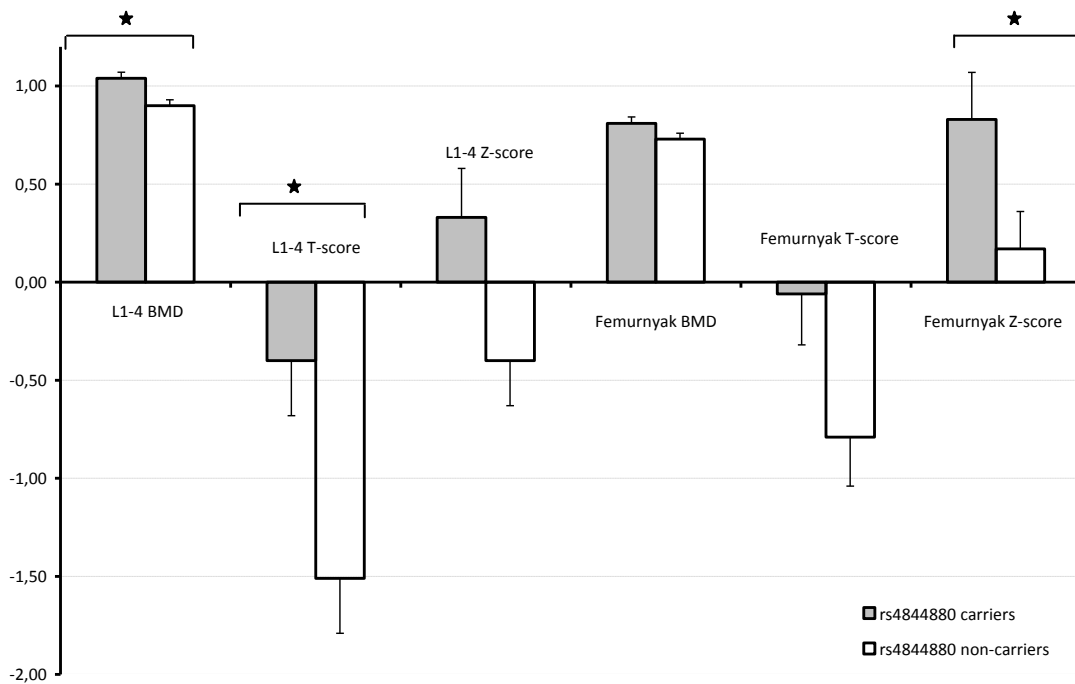
Az általam vizsgált hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás nőkben az rs4844880-as SNP allélfrekvenciája nem tért el lényegesen az irodalomban fellelhető nemzetközi adatoktól, illetve a hazai postmenopausalis nőkben tapasztaltaktól (**14. Táblázat**). Mind az rs4844880 mind pedig az rs12086634 polimorfizmus Hardy-Weinberg egyensúlyban volt mindkét csoportban.

14. Táblázat: A vizsgált SNP-k allélfrekvenciája NFAA-ban

<i>Polimorfizmus</i>	Allélfrekvencia (polimorf allél)		
	Saját betegek (n=71)	Nemzetközi adat (HapMap release 27) (n=224)	Postmenopausalis nők (n=101)
<i>rs4844880</i>	0,12	0,16	0,136
<i>rs12086634</i>	0,19	0,25	0,175

Az rs12086634 polimorf allél előfordulása a kétoldali adenomában szenvedők körében szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az egyoldali adenomás betegekben (0,27 vs 0,06; $p=0,0065$).

A polimorf (minor) allélt hordozó genotípus szignifikánsan jobb lumbális BMD, T-score és femurnyak Z-score csontparaméterekkel jár együtt (7. ábra és 15. Táblázat), amely összefüggés a korra és a BMI-re adjusztálva is szignifikáns marad.



7. ábra: Az rs4844880-as polimorfizmus hatása a csontanyagcserére hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás nőbetegekben

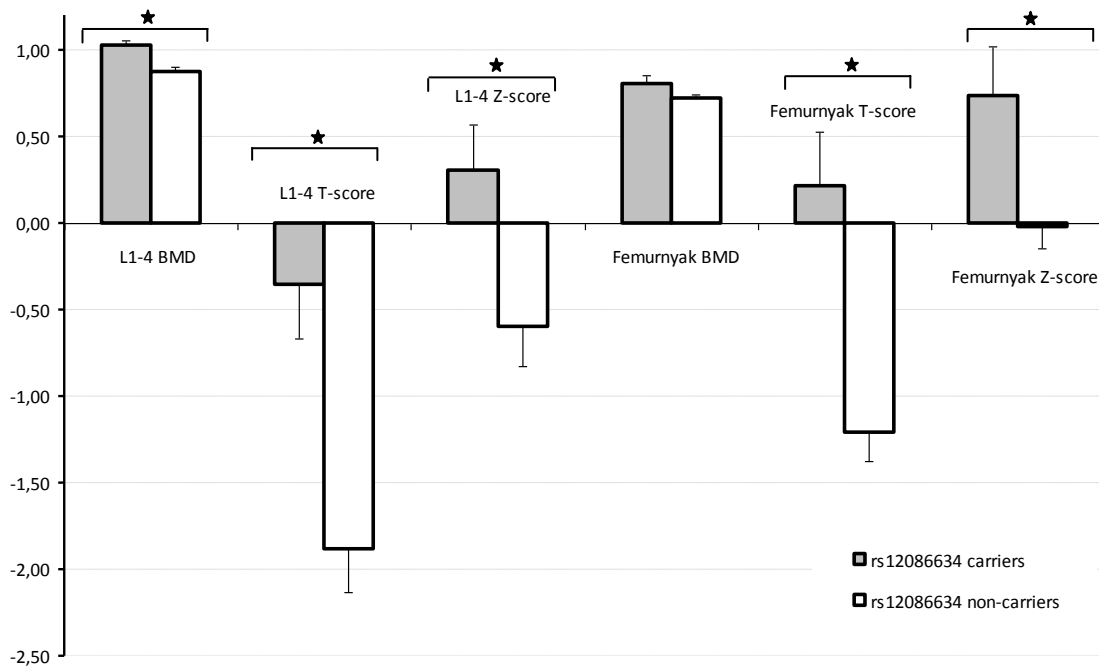
15. Táblázat: Az rs4844880-as polimorfizmus és a hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás nőkben mért hormon laboratóriumi és a csontanyagcsere jellemzésére használt markerek közötti összefüggések

<i>Paraméterek</i>		rs4844880-t hordozók (n=17)	rs4844880-t nem hordozók (n=54)	p érték
<i>Átlagéletkor, év</i>		56,82±2,12	58,78±1,47	0,490
<i>BMI, kg/m²</i>		31±1,38	28,26±1,09	0,139
<i>Kortizon, ug/dl</i>		2,35±0,12	2,51±0,11	0,517
<i>Kortizol, ug/dl</i>		10,34±0,87	11,94±0,52	0,135
<i>Szérum</i>	<i>osteocalcin, ng/ml</i>	27±3,79	25,38±4,5	0,803
	<i>β-crosslaps, ng/ml</i>	0,49±0,08	0,48±0,06	0,899
<i>L1-4</i>	<i>BMD, g/cm²</i>	1,04±0,03	0,90±0,03	0,011*
	<i>T-score</i>	-0,4±0,29	-1,51±0,28	0,023*
	<i>Z-score</i>	0,33±0,25	-0,4±0,23	0,067
<i>Femurnyak</i>	<i>BMD, g/cm²</i>	0,81±0,03	0,73±0,03	0,167
	<i>T-score</i>	-0,06±0,26	-0,79±0,25	0,106
	<i>Z-score</i>	0,83±0,24	0,17±0,19	0,037*

Átlag±SD; * p < 0.05 Student féle T-próba vagy Mann-Whitney U-teszt.

8.4.2. Az rs12086634-as polimorfizmus hatása a csontanyagcsere hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás nőbetegekben

Az rs12086634 polimorfizmust hordozók szignifikánsan magasabb lumbális BMD, T- és Z-score és femurnyak T- és Z-score értékekkel rendelkeztek a nem hordozókhöz képest (**8. ábra és 16. Táblázat**). Az összefüggés korra és BMI-re történő adjusztálás után is szignifikáns maradt.



8. ábra: Az rs12086634-es polimorfizmus hatása a csontanyagcsere hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás nőbetegekben

16. Táblázat: Az rs12086634-es polimorfizmus és a hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás nőkben mért hormon laboratóriumi és a csontanyagcsere jellemzésére használt markerek közötti összefüggések

Paraméter		rs12086634-t hordozók (n=26)	rs12086634-t nem hordozók (n=45)	p érték
Átlagéletkor, év		54,72±1,71	60,37±1,58	0,067
BMI, kg/m ²		30,10±1,33	28,64±1,17	0,627
Kortizon, ug/dl		2,47±0,21	2,49±0,11	0,926
Kortizol, ug/dl		11,34±0,94	11,68±0,47	0,454
Szérum	osteocalcin,	22,41±2,63	29,81±6,00	0,126
	β-crosslaps,	0,42±0,05	0,53±0,09	0,281
L1-4	BMD, g/cm ²	1,03±0,03	0,87±0,03	0,006*
	T-score	-0,36±0,31	-1,88±0,25	0,002*
	Z-score	0,31±0,26	-0,6±0,23	0,041*
Femur nyak	BMD, g/cm ²	0,79±0,05	0,72±0,02	0,230
	T-score	0,14±0,31	-1,21±0,16	0,001*
	Z-score	0,79±0,28	-0,02±0,13	0,002*

Átlag±SD; * p < 0.05 Student féle T-próba vagy Mann-Whitney U-teszt.

A fenti összefüggések még kifejezettebbek az rs4844880 és rs12086634 együttes előfordulása esetén (**17. Táblázat**).

17. Táblázat: Az rs4844880 és rs12086634 együttes előfordulásának hatása az ACTH stimulált kortizolra és a csontsűrűsége hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomában

<i>Paraméterek</i>		rs4844880 és rs12086634 kettős hordozók (n=9)	Nem hordozók (n=38)	p érték
<i>ACTH-teszt utáni kortizol, ug/dl</i>		67,7±27	46,6±21	0,075
<i>L1-4</i>	<i>BMD, g/cm²</i>	1.06	0.84	0.0004*
	<i>T-score</i>	-0.02	-2.0	0.0004*
	<i>Z-score</i>	0.686	-0.64	0.009*
<i>Femurnyak</i>	<i>BMD, g/cm²</i>	0.83	0.72	0.034*
	<i>T-score</i>	0.222	-1.24	0.0003*
	<i>Z-score</i>	1.01	-0.07	0.002*

Átlag±SD; * p < 0.05 Student féle T-próba vagy Mann-Whitney U-teszt.

A polimorfizmusokat hordozók körében alacsonyabb volt az osteoporosis előfordulási gyakorisága a nem hordozókhöz képest (**18. Táblázat**). Az rs12086634-es polimorfizmust hordozók körében szignifikánsan ritkábban fordult elő hyperlipidaemia a nem hordozókhöz képest (**18. Táblázat**).

18. Táblázat: A vizsgált hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás nők társbetegségei

<i>Betegségek előfordulási gyakorisága</i>	rs12086634-t hordozók	rs12086634-t nem hordozók	rs4844880-t hordozók	rs4844880-t nem hordozók
<i>Hypertonia</i>	71.43%	77.42%	85.71%	71.05%
<i>2-es típusú diabetes mellitus</i>	50%	45.45%	50%	46.15%
<i>Obesitas</i>	41.6%	63.4%	78.51%	70.37%
<i>Hyperlipidaemia</i>	35.7%	80%*	42.85%	58.82%
<i>Osteoporosis</i>	4,7%	30,4 %*	0%	26,6 %*

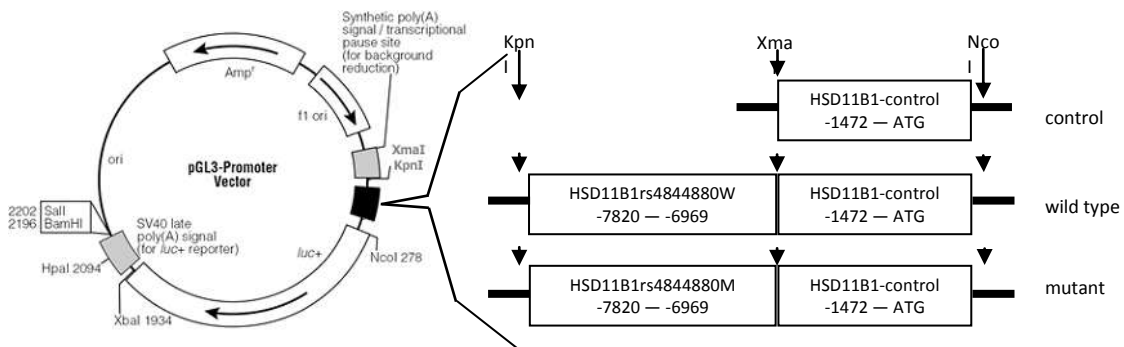
Vizsgálatunk nem tárt fel semmilyen összefüggést a polimorfizmus(ok) hordozása illetve a hypertonia, a 2-es típusú diabetes mellitus előfordulása, a BMI értéke valamint a szérumban a hormonkoncentrációjának vagy a csontanyagcsere szérumban a markereinek alakulása között (**16. Táblázat** és **18. Táblázat**).

8.5. Az rs4844880 funkcionális következményei

Az rs4844880 polimorfizmus funkcionális hatásáról ez idáig semmiféle adat nem áll rendelkezésre, celluláris mechanizmusát korábban még nem vizsgálták. Mivel ez az SNP a promotor régióban helyezkedik el, azt feltételeztem, hogy hatását a génátírás, a transzkripció szintjén fejtí ki. Munkám során ennek a vizsgálatához beállítottam egy transzkripció aktivitás mérést. A vizsgálni kívánt génszakasz transzkripció aktivitását *in vitro* riporter rendszerben végeztem el. A polimorfizmust hordozó promotor szakaszt egy expressziós vektorba klónoztam oly módon, hogy az végső formájában egy mögötte elhelyezkedő riporter-gént, esetünkben luciferázt hajtson meg, majd a keletkező fehérje aktivitását (esetünkben fluoreszcencia) mérve abból következtethetünk a transzkripció hatékonyságára.

8.5.1. Luciferáz riporter vektor konstrukció

A *HSD11B1* gén start kodonjához képest az rs4844880-as polimorfizmus -7372 bázisnyira található, ennek a teljes szakasznak a bakteriális vektorba való ligálása technikai okok miatt nem megvalósítható, a szakasz túlságosan hosszú lenne ehhez. Ezért az rs4844880 vizsgálatához a transzkripció iniciációs helyet, illetve a polimorfizmust is tartalmazó génrészletet külön kellett a plazmid konstrukciókba klónoznom.



9. ábra: A használt pGL3 vektorok szerkezete

A gyártótól származó plazmidok előre tartalmazták a replikációs origót (ori), a luciferáz génjének cDNS-ét, a polyA szignálokat és több előre tervezett restriktív hasítási helyet, melyek a konstrukt bejuttatásához kellenek (**9. ábra**). A vizsgálatokhoz 3 különböző plazmid konstrukciót készítettem: HSD11B1-control, HSD11B1-W (vad típusú) és HSD11B1-M (mutáns). Az első plazmid, a HSD11B1-kontroll egy 1478 bázispár hosszú részt tartalmaz a *HSD11B1* promoter proximális részéből a gén start kodonjától 5' irányba, és így többek között tartalmazza a gén transzkripciósi iniciációs helyét. Ehhez a szakaszhoz PCR primereket terveztem, majd azok segítségével a kérdéses génszakaszt egy egészséges kontroll egyén genomiai DNS-éből nyertem. A primerek úgy lettek tervezve, hogy a forward primer XmaI restriktív helyet tartalmaz a 3' helyen, a reverz primer NcoI restriktív helyet tartalmaz a primer 5' végén a plazmidba való irányított beillesztéshez.

A transzkripciósi iniciációs helyet tartalmazó HSD11B1-control konstrukthoz (-1472—+6 bázispár, bp) egy 851 bázispár hosszú, a *HSD11B1* gén (-7820 – -6969) szakaszát tartalmazó promoter-töredéket ligáltam, amely az rs4844880 SNP-t (-7372bp) tartalmazta. A forrásként felhasznált DNS-ek olyan betegektől származtak, akik homozigóta formában hordozzák a vad típusú illetve a polimorf allélt. A genotípusokat direkt DNS szekvenálással is megerősítettem. A primereket úgy terveztem, hogy a PCR termék XmaI restriktív helyet tartalmaz az 5' és KpnI hasítási helyet a 3' végén a vektorba való irányított beillesztéshez. Attól függően, hogy a kérdéses szakaszt vad típusú vagy polimorf rs4844880-régiót hordozó betegből nyertem, a létrehozott plazmidok is vagy a vad típusú (HSD11B1-W) vagy a polimorf rs4844880-t (HSD11B1-M) tartal-

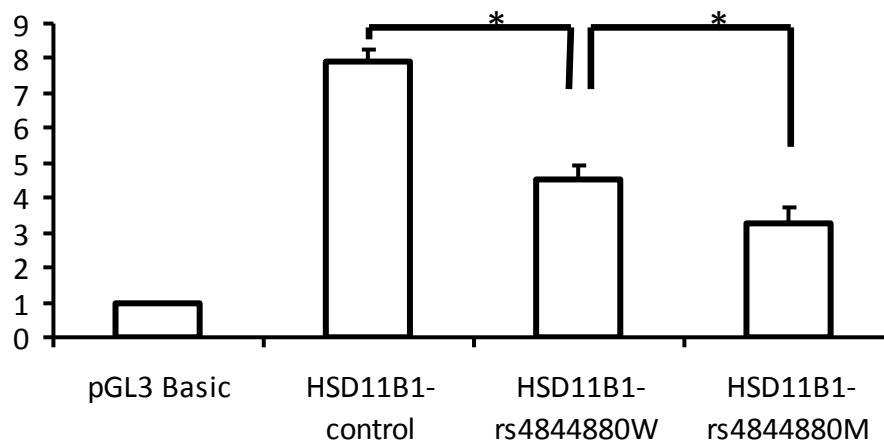
mazták (9. ábra). Az összes általam használt plazmidot direkt DNS szekvenálással ellenőriztem a felhasználás előtt.

8.5.2. Az rs4844880 polimorfizmus hatása a *HSD11B1* gén promoter aktivitására

Az rs4844880-as polimorfizmust *in vitro* heterolog expressziós rendszerben vizsgáltam: az általam gyártott háromféle plazmid konstrukcióval tranziensen transzfektáltam humán sejteket, majd mértem azok luciferáz-aktivitását.

Mind a HSD11B1-rs4844880W és -M plazmid konstrukció szignifikánsan alacsonyabb luciferáz aktivitást mutatott a HSD11B1-control konstrukcióhoz képest (10. ábra). Ez az eredmény azt sugallja, hogy ennek a 851bp hosszú szekvenciának, amely -7820 és -6969 bázispárryira van a start kodontól potenciálisan represszor szerepe lehet a *HSD11B1* gén promoter régiójában.

A HSD11B1-rs4844880M plazmid luciferáz aktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt a vad típusú (HSD11B1-rs4844880W) plazmid konstrukcióhoz képest, ami a polimorfizmus géntranszkripcióra kifejtett gátló hatására utal.



10. ábra: A *HSD11B1* start kodont tartalmazó HSD11B1-control, valamint az ezen felül az rs4844880 vad típusát hordozó HSD11B1-rs4844880W, illetve a mutáns allélt hordozó HSD11B1-rs4844880M konstrukciók hatása a luciferáz expressziójára *in vitro*

9. Megbeszélés

A glükokortikoidok direkt módon csökkentik a csont állományát. Ezt a hatást több útvonalon keresztül érvényesítik: fokozzák az osteoblastok apoptózisát és csökkentik az inzulinszerű növekedési faktor 1 (IGF-1) szintjét [242]; stimulálják a csontreszorpciót az osteoclastokon keresztül [187], gátolják a kalcium bélből való felszívódását és a gonádok szteroidszintézisét is [243]. Ezeknek a hatásoknak az eredőjeként az endogen hiperkortizolizmusban szenvedő és szteroid kezelésben részesülő betegekben csökken a csont ásványianyag-tartalma.

A csontok glükokortikoidokra bekövetkező 11β -HSD1 által mediált érzékenységet nagyban befolyásolja az adott csont anatómiai lokalizációja. Az egyes anatómiai helyekben eltérő a 11β -HSD1 expressziója, a felszín/térfogat arány különböző, a turnover sebessége más, különböző a corticalis és trabecularis csont aránya és mások az egyes helyek terhelésbeli eltérései (hajlítás vagy összenyomás) [244, 245]. A kortizon csökkent kortizollá alakulása hatással lehet a helyi RANKL/OPG arányra, ezáltal megnövekedhet a csont turnover.

A glükokortikoidok fiziológiai hatásait lokálisan a 11β -HSD1 enzim szabályozza, amely szövet-specifikus módon irányítja a folyamatot, azáltal hogy hatására az inaktív kortizonból aktív kortizol keletkezik [9]. A 11β -HSD1 enzim kódolásáért felelős *HSD11B1* gén variációi az enzimaktivitás megváltoztatásán keresztül összefüggésbe hozhatók különböző metabolikus paraméterekkel illetve a metabolikus szindróma egyes (kór)állapotaival, mint a BMI, az inzulin rezisztencia, a 2-es típusú diabetes mellitus, a hipertonia vagy az elhízás. Ezek közül az elhízás, a hipertonia, a diabetes, valamint az osteopénia és a csontritkulás gyakran társul hiperkortizolizmushoz. Ugyanakkor ismert, hogy a *HSD11B1* gén promoterében és intronikus régiójában található polimorfizmusok is összefüggésbe hozhatóak a csontanyagcsere változásaival [142, 148].

A *HSD11B1* gén polimorfizmusai közül a leggyakrabban a 3-as intronban található 83557insA-t és rs12086634-t illetve a proximális promoterben elhelyezkedő rs846910-t és rs846911-t vizsgálták. *In vitro* kísérletekkel igazolták, hogy az rs846910-nek valószínűleg nincs hatása a *HSD11B1* gén promoter aktivitására, miközben az rs13306421-as variáció esetében sikerült kimutatni fokozott 11β -HSD1 enzim

expressziót [246]. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a *HSD11B1* gén promoterében található polimorfizmusok hatással lehetnek a 11β -HSD1 enzim aktivitására *in vivo*. Az 83557insA polimorfizmust több munkacsoport, köztük a mi csoportunk is vizsgálta [145, 247]. Vizsgálataink során az endogen hiperkortizolizmusban szenvedő betegekben a polimorfizmust hordozók körében szignifikánsan magasabb plazma osteocalcin szintet mértünk a nem hordozókhöz képest, de az SNP hordozása és a csont ásványianyag-tartalma között nem tudtunk összefüggést igazolni [142].

A genotípus-fenotípus összefüggések feltárását célzó vizsgálatok legfontosabb korlátozó tényezője az esetszám, a vizsgált betegcsoportok megfelelő kiválasztása illetve polimorfizmusok esetén a minor, polimorf allél előfordulási gyakorisága lehet. Bármelyik nem megfelelő alakulása az egész vizsgálat sikertelenségét, illetve hibás következtetések levonását eredményezheti. Ezért kulcsfontosságú a megfelelően nagy esetszámú vizsgálati csoport, a polimorfizmusok gyakorisága alapján a vizsgálat prediktív értékének helyes felmérése és értelmezése.

Munkánk során ezért szisztematikusan tanulmányoztuk a *HSD11B1* gén proximális 38 kb-nyi szakaszát, tagging SNP-k után kutatva. A polimorfizmusok minor allél frekvenciája alapján online elérhető adatbázis (HapMap) segítségével kiválasztottuk és csökkentettük a vizsgálni kívánt SNP-k számát. Nagyon alacsony incidencia esetén ugyanis kifejezetten nagy vizsgálati csoportra lenne szükség a helyes következtetések levonásához. Az általunk a vizsgálatba bevonható populáció mérete azonban ezt nem tette lehetővé, ezért inkább korlátoztuk a vizsgálatainkat olyan polimorfizmusokra, amelyek allélgyakorisága alapján kellően nagy számban fordulnak majd elő a mi vizsgálati csoportunkban, hogy abból következtetéseket vonhassunk le. Ezáltal 10 polimorfizmus további elemzését végeztük egy közepesen nagy, egészséges magyar nőkből álló csoportban. Ezek az előzetes eredmények biztatóak voltak az rs4844880 SNP esetében.

Korábbi irodalmi adatokból tudjuk, hogy a *HSD11B1* gén polimorfizmusai és azok csontmetabolizmusra kifejtett hatása között sokkal erősebb összefüggéseket találtak postmenopausalis nőkben [148]. Az azt megelőző időben a magas szexuális hormon-szint elfedheti a 11β -HSD1 funkció váltazása miatt bekövetkező, arányaiban szerényebb mértékű eltérést. Ezzel ellentétben manifeszt csontanyagcsere-zavarok esetén, így pl. postmenopausalis osteoporosisban, vagy olyan „endokrin” betegségben, amely a

11 β -HSD1 enzim működésével jól ismertén kapcsolatba hozható, ezek a különbségek akár még kifejezettebbek is lehetnek. Ezért a *HSD11B1* gén rs4844880 polimorfizmusának vizsgálatát egy részről korlátoztuk az egészséges csoport postmenopausalis tagjaira, ugyanakkor kiterjesztettük csonttritkulásban szenvedő valamint hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás nőkre is.

Vizsgálataim során szignifikáns összefüggést találtam a BMD, a femurnyak T és Z-score értékei, a csont turnover biokémiai markerei és a polimorfizmus hordozása között. Postmenopausalis nőkben tett megfigyelésem párhuzamba vonható illetve kiterjeszti Hwang és munkatársai eredményeit, igazolva azt, hogy a *HSD11B1* gén polimorfizmusai előre vetíthetik a csontsűrűség és a törési kockázat alakulását egészséges postmenopausalis nőkben [148]. Eredményeim ugyanakkor ezeket kiegészítik azzal, hogy csonttritkulás esetén a polimorfizmus hordozása betegség lefolyását enyhítheti, valamint a normálisnál magasabb csonttritkulás-rizikóval járó hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás nőbetegekben a magasabb rizikót csökkenthetik.

Számos példával igazolható, hogy a gének promoterében található polimorfizmusok hatásai a csont metabolizmusra csak postmenopausalis állapotban tudnak érvényesülni. Többek között az ösztrogén receptor promoter T-1213C SNP-je növeli a törési kockázatot függetlenül a BMD értékeitől [248], az rs755622 polimorf C allélja, amely a makrofág migration inhibitory factor gén (*MIF*) promoterében található, fokozott csontvesztési kockázattal jár [249]. A tumor necrosis factor család 11-es tagjának (*TNFSF11*) promoterében található 290C > T, 643C > T és 693G > C polimorfizmusokat összefüggésbe hozták magasabb lumbális BMD értékekkel [250], és a *COL1A1* gén 5' régiójának 1997G/T, 1663IndelT és +1245G/T polimorfizmusai korreláltak a csökkent csontsűrűség értékekkel [251].

Korábbi vizsgálataink és egyéb irodalmi adatok alapján a hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás betegekben gyakrabban fordul elő diabetes mellitus, hypertonia, elhízás és emelkedett szérum lipidszint [196, 197, 213, 225]. Feltételezhető, hogy a hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenoma és a szubklinikus Cushing-szindróma fokozott csonttritkulási rizikóval jár együtt [236, 252-260], bár ezzel a megfigyeléssel nem mindegyik tanulmány ért egyet [197, 261, 262]. PhD munkám során tanulmányoztam két funkcionálisan aktív *HSD11B1* polimorfizmus klinikai-, hormoná-

lis- és a csontanyagcserére kifejtett hatásait hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás nőkben. Az általam vizsgált SNP-k allélgyakorisága a vizsgált NFAA-s betegcsoportunkban nem tért el szignifikánsan a HapMap adatbázisban található nemzetközi adatoktól. Hasonló allélgyakoriságot mértem korábban egészséges kontrollokban (**10. Táblázat**) és postmenopausalis nőkben is (**14. Táblázat**). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy ezek a polimorfizmusok nem hajlamosítanak mellékvese adenoma kialakulására, bár az rs12086634 SNP csökkent előfordulása kétoldali adenomás betegekben felvetheti a 11 β -HSD1 enzim szerepét a mellékvese adenoma kialakulásában. Ezen betegség genetikai háttere mindezidáig kevéssé ismert. Számos genetikai faktor, többek között monogénes öröklődésű betegségek (Congenital adrenal hyperplasia, Carney complex, Multiplex Endokrin Neoplasia 1-es típusa, Familiáris Conn-szindróma) [205, 206, 263, 264] és különböző SNP-k (*GR* és *GNB3*, *C4B*, *NOS3*, *ACE*, *TNF*, *TGFBI* gének) [265-268] szerepét sikerült igazolni az adenomák pathomechanizmusának hátterében.

A hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás betegek általában tünet- és panaszmentes állapotban végzett képalkotó vizsgálatok mellékleteként kerülnek diagnosztizálásra. A betegek többségében nem találunk emelkedett kortizol szinteket, de egy részüknél igazolható a szubklinikus Cushing-szindróma, amely enyhe hormoneltéréssel jár (dexamethason teszt hatására nem kellően szuprimált kortizolszint vagy a kortizol diurnális ritmusának eltűnése jellemző) [198, 209, 213, 229, 269]. A kortizol ritmusának a megváltozása felveti a lehetőségét annak, hogy a 11 β -HSD1 enzim működése illetve ez által a génjének polimorfizmusai befolyással lehetnek a betegség klinikai manifesztációjára. A hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenoma és a szubklinikus Cushing-szindróma fokozott csonttritkulási rizikóval járhatnak együtt, amely fokozottabban jelentkezhet postmenopausalis korban [236, 252-260].

Munkám során kimutattam, hogy az rs4844880-as polimorfizmus hordozása nőkben jobb csontsűrűség értékekkel jár együtt, amely sokkal kifejezettebbé válik a postmenopausalis időszakban illetve osteoporosisban. Az általunk vizsgált hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás nőbetegek többsége szintén a postmenopausalis kategóriába sorolható, amely a fentiek alapján predisponálja az rs4844880 esetleges hatásainak kifejezettebb megjelenését. Eredményeink azt mutatták, hogy a polimorfizmust hordozók körében szignifikánsan jobb a csontsűrűség értékek. Az rs4844880

allégyakorisága alacsonyabb volt az általunk vizsgált betegekben, de nem tért el szignifikánsan a nemzetközi adatbázisokban fellelhetőktől, illetve a mi kontrolljainkban kapott értékektől. Ez tovább erősíti egyrészt az általunk kapott eredmények nemzetközi populációkra való érvényességét, másrészt lehetővé teszi, hogy a nemzetközi populációkon végzett vizsgálatok, statisztikai elemzések eredményeit a magyar lakosságra is alkalmazhassuk.

Munkám másik fontos eredménye az rs12086634-es polimorfizmushoz kapcsolódik. Ez a polimorfizmus 100%-an kapcsolt a *HSD11B1* gén 3-as intronjában található InsA variációjával, amelyet, kiterjedten vizsgáltak különböző betegcsoportokban, köztük a mi munkacsoportunk is Cushing-szindrómás betegekben [142]. Munkám során igazoltam, hogy az rs12086634 hordozása is jobb csontparaméterekkel jár együtt hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás betegekben. Ez az összefüggés egybehangzó a különböző betegcsoportokban és egészségesekben általunk és mások által is leírt korábbi megfigyelésekkel [142, 148, 270]. Jelen vizsgálatunk alapján felmerül, hogy ezek a polimorfizmusok a csökkent 11 β -HSD1 enzimaktivitás által mellékvese adenomában szenvedő betegben osteoprotektívek lehetnek, védenek az osteoporosis illetve -penia kialakulásától. Ez a hatás azonban nem mutatkozik meg a csontanyagcsere szérummarkereinek változásában, amely arra utal, hogy a létrejövő kedvező hatás hasonló mértékben érinti mind az osteoblast, mind az osteoclast sejteket. Ugyanakkor ennek a polimorfizmusnak a hatása manifeszt hiperkortizolizmusban eltűnik [142].

A genotípus-fenotípus összefüggések megerősítéséhez, a kapcsolatok mikéntjéhez elengedhetetlen a funkcionális vizsgálatok végzése. Munkám során beazonosítottam egy olyan SNP-t (rs4844880), amely a kedvező csontsűrűséggel mutatott összefüggést egészséges postmenopausalis, osteoporoticus és mellékvesekéreg adenomás betegekben. Az SNP hatásmechanizmusáról azonban nem állt rendelkezésre semmiféle adat. Munkám fontos része volt kimutatni ennek a promoter SNP-nek a géntranszkripcióra gyakorolt hatását. Ahhoz, hogy igazoljam az rs4844880 potenciális szerepét a géntranszkripcióban *in vitro* kísérleteket végeztem. Korábban HeLa és HEK-293 sejtvonalatokat használtak mind a *HSD11B1* mind pedig egyéb gének *in vitro* funkcionális vizsgálatához [133, 250, 271]. Endogén módon egyik sejtvonalt sem tartalmazza a *HSD11B1* gént, tehát a genomikus és a plazmiddal bejuttatott „riporter” promoter semmilyen formában sem interferálhat egymással, illetve teljes mértékben kizárható az endogén 11 β -HSD1

enzim bármiféle visszacsatolása a saját termelésére. Ez az irodalomban bevett módszer jellegénél fogva inkább a megfigyelt hatások felerősítését hordozza magában, ugyanakkor tisztább formában figyelhetők meg a promoter egyes jól körülhatárolt régiójának funkciói. A csontműködés szempontjából közvetlenebb információt nyerhettünk volna valamilyen csont eredetű sejtvonal használatával. A leggyakrabban erre a célra használt MG63 osteosarcoma [272] és az SV-HFO emberi osteoclast [273] vonal azonban endogén módon tartalmazza a *HSD11B1* gént, ezáltal elfedhetik az általunk vizsgálni kívánt hatást [108, 109, 274]. Ennek az allélnak a funkcionális vizsgálatával két fontos dolgot sikerült megállapítanom: 1) a gén 5' irányában található -7820 és -6969 nukleotid közé eső területe nagy valószínűséggel transzkripciós represszor régiót tartalmaz, 2) az rs4844880-as polimorfizmus mutáns alléljának nagyobb a transzkripció gátló hatása, mint a vad allélnak. Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy ez a polimorfizmus csökkenti a 11 β -HSD1 enzim expresszióját és ezáltal aktivitását is, amely a periférián csökkent kortizol hatást eredményezhet. Ez lehet a magyarázata az SNP-t hordozó postmenopausalis egészséges és osteoporotikus nőkben mért nagyobb csontsűrűség értékeknek.

A glükokortikoidok a *HSD11B1* gén -196 és -88 bp-ja között, a transzkripciós iniciációs helyhez képest disztálisan elhelyezkedő glükokortikoid responsive element (GRE) által növelik a 11 β -HSD1 enzim expresszióját számos sejtvonalban [275-278], többek között emberi adipocytá [279] és preadipocytá [280] sejtvonalakban. A 11 β -HSD1 enzim a csontsejtekben hozzájárul az osteoblast és osteoclast differenciációhoz [109, 244, 273]. Eredményeink igazolták a kapcsolatot az rs4844880-as polimorfizmus, a csont BMD és a csontmarkerek kedvező szérumszintje között. A gének promoter régiója sejttípustól és a sejtek mikrokörnyezetétől függően hat a transzkripcióra, tehát a polimorfizmus transzkripció gátló hatásának áttételes megjelenése a csontanyagcserében közvetett bizonyítékként szolgál arra nézve, hogy emberi csontban az SNP körüli génszakasz valamilyen formában aktív.

Összefoglalásképpen elmondható, hogy az rs4844880-as polimorfizmus összefügg a magasabb csontsűrűség értékekkel egészséges és postmenopausalis nőkben. Az *in vitro* funkcionális vizsgálatok igazolták a polimorf allél nagyobb represszor aktivitását, ez az eredmény azt sugallja, hogy a polimorfizmus ezt a jótékony hatását azon keresztül éri el, hogy csökkenti a 11 β -HSD1 enzim expresszióját a csontszövetben.

10. Következtetések

1. A *HSD11B1* proximális 38 kilobázisnyi területén lévő tagging SNP-k allélfrekvenciája egészséges magyar nők körében megegyezik a nemzetközi populációkban leírtakkal.
2. Egészséges magyar nőkben az rs4844880 és az rs3753519 tagging SNP-kkel jellemzhető haplotípusokban szignifikánsan jobb a csontsűrűség értékek.
3. Postmenopausalis egészséges nőkben az rs4844880 polimorfizmus jelenléte szignifikánsan jobb csont L1-4 BMD, Z-score és T-score értékekkel járt együtt.
4. Postmenopausalis osteoporosisban az rs4844880 hordozókban jobb a femurnyak T- és Z-score illetve magasabb a szérum osteocalcin és alacsonyabb a β -crosslaps szintje.
5. Hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás nőkben az rs4844880-as és az rs12086634-es polimorfizmusok esetében is szignifikánsan magasabb a csont ásványianyag-tartalom.
6. A *HSD11B1* -7820 és -6969 bp közötti szakasza egy transzkripció represszor régiót tartalmaz.
7. Az rs4844880-as változat polimorf formájának nagyobb a transzkripciót gátló hatása mint a vad típusnak.

11. Összefoglalás

A glükokortikoidok szabályozzák a szénhidrát, aminosav anyagcserét, modulálják az immunrendszer működését és a stresszhez kapcsolódó folyamatokat. A glükokortikoidok szöveti szintű szabályozó folyamatainak kulcsenzimeit a sejtek endoplazmatikus retikulumában elhelyezkedő 11β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz 1-es és 2-es típusa (11β -HSD1, 2), melyek az inaktív kortizon és az aktív kortizol közötti átalakulást katalizálják; a 11β -HSD1 elsősorban az aktiválásban játszik szerepet. Ez az enzim főként a májban, gonádokban, zsírszövetben illetve az agyban, csontban fejeződik ki. Génje, a *HSD11B1* az 1-es kromoszómán helyezkedik el.

Számos glükokortikoidokkal összefüggésbe hozható betegség hátterében nem a központi hypothalamus-hypophysis-mellékvese tengely zavara áll, hanem a 11β -HSD1 működésének megváltozása, amely a szöveti szintű szabályozás felborításával összervezeti hormontúlsúly nélkül alakítja ki a jellegzetes elváltozásokat. Az enzim működésében bekövetkező változások gyakran genetikai okokra, az enzim génjét, a *HSD11B1*-t érintő genetikai változatok hatására vezethetők vissza.

PhD munkámban azonosítottam, majd *in vivo* és *in vitro* funkció szempontjából elemeztem a *HSD11B1* proximális szakaszának polimorfizmusait egészséges, osteoporoticus és hormonálisan inaktív mellékvesekéreg-adenomás nőbetegekben.

In silico módszerekkel a *HSD11B1* proximális 38 kilobázisnyi területén 64 SNP-t azonosítottam, majd további vizsgálataim céljából ennek a génszakasznak a tagging SNP-eket elemeztem. A vizsgált tagging SNP-k allélfrekvenciája egészséges magyar nők körében megegyezik a nemzetközi populációkban tapasztaltakkal.

Egészséges magyar nőkben az rs4844880 és az rs3753519 tagging SNP-ekkel jellemezhető haplotípusokban szignifikánsan jobb a csontsűrűség értékek.

Postmenopausalis egészséges nőkben az rs4844880 polimorfizmus jelenléte szignifikánsan jobb csont L1-4 BMD, Z-score és T-score értékekkel jár együtt. Postmenopausalis osteoporosisban a hordozókban kedvezőbb a femurnyak T- és Z-score illetve magasabb a szérum osteocalcin és alacsonyabb a β -crosslaps szintje.

Hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás nőkben az rs4844880-as és az rs12086634-es polimorfizmusok esetében is szignifikánsan jobb/magasabb a csont ásványianyag-tartalom.

A HSD11B1 -7820 és -6969 bp közötti szakasza egy transzkripció represszor régiót tartalmaz, melynek aktivitását az rs4844880-as változat fokozza, azaz a transzkripciót jobban gátolja, mint a vad típus.

Jelen munkám is aláhúzza a 11β -HSD1 enzim illetve annak génje, a *HSD11B1* kiemelt szerepét a különféle glükokortikoid-függő betegségek, így az osteoporosis patofiziológiájában. Munkám során sikerült olyan génváltozatot találnom, amely az enzimműködés gátlásán keresztül osteoprotectiv hatást fejt ki, bizonyítva ezzel azon elképzelés létjogosultságát, hogy 11β -HSD1 enzimgátlók jótékony hatásúak lehetnek a csonttrikulás megelőzésében és kezelésében.

12. Summary

Glucocorticoids play a key role in many of the human body's processes including but not limited to various metabolic features, immune processes and bone turnover. Their function is regulated at at least two different levels. General, body-wide regulation is organized by the hypothalamic-pituitary-adrenal axis setting the level of blood cortisol and cortisone. Another much poorer understood level of regulation happens in the glucocorticoid target tissues. The key components of this mechanism are the 11 β -hydroxysteroid-dehydrogenase (11 β -HSD1 & 2) isoenzymes, which convert the inactive cortisone to the hormonally active cortisol (11 β -HSD1) and vice versa (11 β -HSD2). Alterations in 11 β -HSD1 function may therefore lead to changes in glucocorticoid effector responses without an apparent hypo- or hypercortisolism.

During my PhD thesis work I investigated the proximal region of the *HSD11B1* gene searching for tagging SNPs to identify any connections between the genetic structure of the *HSD11B1* promoter and the clinical and laboratory markers of a major glucocorticoid target tissue, the bone.

The proximal 38 kb region of the *HSD11B1* gene contains 10 tagging SNPs, of which rs4844880 and rs3753519 showed significant association with bone density parameters. The allele frequencies of all SNPs were the same in our Hungarian group as in the Caucasian population found in online databases.

In postmenopausal healthy women the beneficial effect of rs4844880 is more apparent; carriers of this SNP have significantly higher BMD, Z- and T-score in the L1-4 region. Postmenopausal osteoporotic women also benefit from carrying the rs4844880 by having significantly better bone turnover as indicated by higher femur neck BMD, T-score, Z-score, higher serum osteocalcin and lower serum β -crosslaps.

Rs4844880 is associated with better bone features (L1-4 BMD, T- and Z-score, femur neck T- and Z-score) in women patients with non-functioning adrenal adenoma (NFAA).

Another tagging SNP of *HSD11B1*, rs12086634 is in 100% linkage disequilibrium with insA and is also associated with better bone turnover in NFAA.

The region of rs4844880 proved to contain a functional repressor site, and the mutant (polymorph) allele of rs4844880 acted as a stronger repressor than the wild type allele.

13. Irodalomjegyzék

1. Leövey A, Nagy VE, Paragh G, Rácz K. (szerk.), Az endokrin és anyagcsere-betegségek gyakorlati kézikönyve. Medicina, Budapest, 2011: 17-25.
2. Leövey A, Nagy VE, Paragh G, Rácz K. (szerk.), Az endokrin és anyagcsere-betegségek gyakorlati kézikönyve. Medicina, Budapest, 2011: 17-71.
3. Leövey A, Nagy VE, Paragh G, Rácz K. (szerk.), Az endokrin és anyagcsere-betegségek gyakorlati kézikönyve. Medicina, Budapest, 2011: 265-338.
4. Munck A, Naray-Fejes-Toth A. (1992) The ups and downs of glucocorticoid physiology. Permissive and suppressive effects revisited. *Mol Cell Endocrinol*, 90(1): C1-4.
5. Fukushima DK, Bradlow HL, Hellman L, Zumoff B, Gallagher TF. (1960) Metabolic transformation of hydrocortisone-4-C¹⁴ in normal men. *J Biol Chem*, 235: 2246-52.
6. Glyn J. (1998) The discovery and early use of cortisone. *J R Soc Med*, 91(10): 513-7.
7. Jenkins JS. (1966) The metabolism of cortisol by human extra-hepatic tissues. *J Endocrinol*, 34(1): 51-6.
8. Osinski PA. (1960) Steroid 11beta-ol dehydrogenase in human placenta. *Nature*, 187: 777.
9. Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, Draper N, Lavery GG, Cooper MS, Hewison M, Stewart PM. (2004) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocr Rev*, 25(5): 831-66.
10. Hellman L, Nakada F, Zumoff B, Fukushima D, Bradlow HL, Gallagher TF. (1971) Renal capture and oxidation of cortisol in man. *J Clin Endocrinol Metab*, 33(1): 52-62.
11. Srivastava LS, Werk EE, Jr., Thrasher K, Sholiton LJ, Kozera R, Nolten W, Knowles HC, Jr. (1973) Plasma cortisone concentration as measured by radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab*, 36(5): 937-43.

12. Whitworth JA, Stewart PM, Burt D, Atherden SM, Edwards CR. (1989) The kidney is the major site of cortisone production in man. *Clinical endocrinology*, 31(3): 355-61.
13. Walker BR, Connacher AA, Webb DJ, Edwards CR. (1992) Glucocorticoids and blood pressure: a role for the cortisol/cortisone shuttle in the control of vascular tone in man. *Clinical science*, 83(2): 171-8.
14. Albiston AL, Obeyesekere VR, Smith RE, Krozowski ZS. (1994) Cloning and tissue distribution of the human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. *Mol Cell Endocrinol*, 105(2): R11-7.
15. Brown RW, Chapman KE, Kotelevtsev Y, Yau JL, Lindsay RS, Brett L, Leckie C, Murad P, Lyons V, Mullins JJ, Edwards CR, Seckl JR. (1996) Cloning and production of antisera to human placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *The Biochemical journal*, 313 (Pt 3): 1007-17.
16. Edwards CR, Stewart PM, Burt D, Brett L, McIntyre MA, Sutanto WS, de Kloet ER, Monder C. (1988) Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet*, 2(8618): 986-9.
17. Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AI. (1988) Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science*, 242(4878): 583-5.
18. Brown RW, Diaz R, Robson AC, Kotelevtsev YV, Mullins JJ, Kaufman MH, Seckl JR. (1996) The ontogeny of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor gene expression reveal intricate control of glucocorticoid action in development. *Endocrinology*, 137(2): 794-7.
19. Benediktsson R, Calder AA, Edwards CR, Seckl JR. (1997) Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure. *Clinical endocrinology*, 46(2): 161-6.
20. Seckl JR, Cleasby M, Nyirenda MJ. (2000) Glucocorticoids, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and fetal programming. *Kidney international*, 57(4): 1412-7.

21. Smith RE, Maguire JA, Stein-Oakley AN, Sasano H, Takahashi K, Fukushima K, Krozowski ZS. (1996) Localization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II in human epithelial tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, 81(9): 3244-8.
22. Hirasawa G, Sasano H, Takahashi K, Fukushima K, Suzuki T, Hiwatashi N, Toyota T, Krozowski ZS, Nagura H. (1997) Colocalization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II and mineralocorticoid receptor in human epithelia. *J Clin Endocrinol Metab*, 82(11): 3859-63.
23. Page N, Warriar N, Govindan MV. (1994) 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human lung cells and transcription regulation by glucocorticoids. *The American journal of physiology*, 267(4 Pt 1): L464-74.
24. Brem AS, Bina RB, King TC, Morris DJ. (1998) Localization of 2 11beta-OH steroid dehydrogenase isoforms in aortic endothelial cells. *Hypertension*, 31(1 Pt 2): 459-62.
25. Christy C, Hadoke PW, Paterson JM, Mullins JJ, Seckl JR, Walker BR. (2003) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in mouse aorta: localization and influence on response to glucocorticoids. *Hypertension*, 42(4): 580-7.
26. Stewart PM, Wallace AM, Valentino R, Burt D, Shackleton CH, Edwards CR. (1987) Mineralocorticoid activity of liquorice: 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency comes of age. *Lancet*, 2(8563): 821-4.
27. Kotelevtsev Y, Brown RW, Fleming S, Kenyon C, Edwards CR, Seckl JR, Mullins JJ. (1999) Hypertension in mice lacking 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *The Journal of clinical investigation*, 103(5): 683-9.
28. Mune T, Rogerson FM, Nikkila H, Agarwal AK, White PC. (1995) Human hypertension caused by mutations in the kidney isozyme of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Nature genetics*, 10(4): 394-9.
29. Dave-Sharma S, Wilson RC, Harbison MD, Newfield R, Azar MR, Krozowski ZS, Funder JW, Shackleton CH, Bradlow HL, Wei JQ, Hertecant J, Moran A, Neiberger RE, Balfe JW, Fattah A, Daneman D, Akkurt HI, De Santis C, New MI. (1998) Examination of genotype and phenotype relationships in 14 patients with apparent mineralocorticoid excess. *J Clin Endocrinol Metab*, 83(7): 2244-54.

30. Lindsay RS, Lindsay RM, Edwards CR, Seckl JR. (1996) Inhibition of 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in pregnant rats and the programming of blood pressure in the offspring. *Hypertension*, 27(6): 1200-4.
31. Lindsay RS, Lindsay RM, Waddell BJ, Seckl JR. (1996) Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. *Diabetologia*, 39(11): 1299-305.
32. Seckl JR, Morton NM, Chapman KE, Walker BR. (2004) Glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in adipose tissue. *Recent progress in hormone research*, 59: 359-93.
33. Lakshmi V, Monder C. (1988) Purification and characterization of the corticosteroid 11 beta-dehydrogenase component of the rat liver 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase complex. *Endocrinology*, 123(5): 2390-8.
34. Ozols J. (1995) Lumenal orientation and post-translational modifications of the liver microsomal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem*, 270(5): 2305-12.
35. Oppermann UC, Filling C, Jornvall H. (2001) Forms and functions of human SDR enzymes. *Chemico-biological interactions*, 130-132(1-3): 699-705.
36. Jornvall H, Persson B, Krook M, Atrian S, Gonzalez-Duarte R, Jeffery J, Ghosh D. (1995) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry*, 34(18): 6003-13.
37. Grundy WN, Bailey TL, Elkan CP, Baker ME. (1997) Hidden Markov model analysis of motifs in steroid dehydrogenases and their homologs. *Biochemical and biophysical research communications*, 231(3): 760-6.
38. Stewart PM, Krozowski ZS. (1999) 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam Horm*, 57: 249-324.
39. Miguet L, Zhang Z, Barbier M, Grigorov MG. (2006) Comparison of a homology model and the crystallographic structure of human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11betaHSD1) in a structure-based identification of inhibitors. *J Comput Aided Mol Des*, 20(2): 67-81.
40. Maser E, Volker B, Friebertshauer J. (2002) 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: dimerization and enzyme cooperativity

- support its postulated role as glucocorticoid reductase. *Biochemistry*, 41(7): 2459-65.
41. Odermatt A, Arnold P, Stauffer A, Frey BM, Frey FJ. (1999) The N-terminal anchor sequences of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases determine their orientation in the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*, 274(40): 28762-70.
 42. Duax WL, Ghosh D, Pletnev V. (2000) Steroid dehydrogenase structures, mechanism of action, and disease. *Vitam Horm*, 58: 121-48.
 43. Pu X, Yang K. (2000) Guinea pig 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: primary structure and catalytic properties. *Steroids*, 65(3): 148-56.
 44. Agarwal AK, Tusie-Luna MT, Monder C, White PC. (1990) Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase using recombinant vaccinia virus. *Mol Endocrinol*, 4(12): 1827-32.
 45. Maser E, Friebertshauser J, Volker B. (2003) Purification, characterization and NNK carbonyl reductase activities of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: enzyme cooperativity and significance in the detoxification of a tobacco-derived carcinogen. *Chemico-biological interactions*, 143-144: 435-48.
 46. Low SC, Chapman KE, Edwards CR, Seckl JR. (1994) 'Liver-type' 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase cDNA encodes reductase but not dehydrogenase activity in intact mammalian COS-7 cells. *Journal of molecular endocrinology*, 13(2): 167-74.
 47. Hundertmark S, Buhler H, Ragosch V, Dinkelborg L, Arabin B, Weitzel HK. (1995) Correlation of surfactant phosphatidylcholine synthesis and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the fetal lung. *Endocrinology*, 136(6): 2573-8.
 48. Jamieson PM, Chapman KE, Edwards CR, Seckl JR. (1995) 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase is an exclusive 11 beta- reductase in primary cultures of rat hepatocytes: effect of physicochemical and hormonal manipulations. *Endocrinology*, 136(11): 4754-61.
 49. Rajan V, Edwards CR, Seckl JR. (1996) 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in cultured hippocampal cells reactivates inert 11-dehydrocorticosterone,

- potentiating neurotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(1): 65-70.
50. Agarwal AK, Mune T, Monder C, White PC. (1995) Mutations in putative glycosylation sites of rat 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase affect enzymatic activity. *Biochimica et biophysica acta*, 1248(1): 70-4.
 51. Draper N, Walker EA, Bujalska IJ, Tomlinson JW, Chalder SM, Arlt W, Lavery GG, Bedendo O, Ray DW, Laing I, Malunowicz E, White PC, Hewison M, Mason PJ, Connell JM, Shackleton CH, Stewart PM. (2003) Mutations in the genes encoding 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase interact to cause cortisone reductase deficiency. *Nat Genet*, 34(4): 434-9.
 52. Pereira CD, Azevedo I, Monteiro R, Martins MJ. (2012) 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: relevance of its modulation in the pathophysiology of obesity, the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, obesity & metabolism*, 14(10): 869-81.
 53. Rutters F, Nieuwenhuizen AG, Lemmens SG, Born JM, Westerterp-Plantenga MS. (2010) Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis functioning in relation to body fat distribution. *Clinical endocrinology*, 72(6): 738-43.
 54. Reaven GM. (2011) The metabolic syndrome: time to get off the merry-go-round? *Journal of internal medicine*, 269(2): 127-36.
 55. Gathercole LL, Stewart PM. (2010) Targeting the pre-receptor metabolism of cortisol as a novel therapy in obesity and diabetes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 122(1-3): 21-7.
 56. Anagnostis P, Athyros VG, Tziomalos K, Karagiannis A, Mikhailidis DP. (2009) Clinical review: The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 94(8): 2692-701.
 57. Phillips DI, Barker DJ, Fall CH, Seckl JR, Whorwood CB, Wood PJ, Walker BR. (1998) Elevated plasma cortisol concentrations: a link between low birth weight and the insulin resistance syndrome? *J Clin Endocrinol Metab*, 83(3): 757-60.

58. Duclos M, Marquez Pereira P, Barat P, Gatta B, Roger P. (2005) Increased cortisol bioavailability, abdominal obesity, and the metabolic syndrome in obese women. *Obesity research*, 13(7): 1157-66.
59. Misra M, Bredella MA, Tsai P, Mendes N, Miller KK, Klibanski A. (2008) Lower growth hormone and higher cortisol are associated with greater visceral adiposity, intramyocellular lipids, and insulin resistance in overweight girls. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 295(2): E385-92.
60. Sen Y, Aygun D, Yilmaz E, Ayar A. (2008) Children and adolescents with obesity and the metabolic syndrome have high circulating cortisol levels. *Neuro endocrinology letters*, 29(1): 141-5.
61. Weigensberg MJ, Cruz ML, Goran MI. (2003) Association between insulin sensitivity and post-glucose challenge plasma insulin values in overweight Latino youth. *Diabetes care*, 26(7): 2094-9.
62. Walker BR. (2006) Cortisol--cause and cure for metabolic syndrome? *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, 23(12): 1281-8.
63. Walker BR, Andrew R. (2006) Tissue production of cortisol by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and metabolic disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1083: 165-84.
64. Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS. (2001) A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science*, 294(5549): 2166-70.
65. Low SC, Chapman KE, Edwards CR, Wells T, Robinson IC, Seckl JR. (1994) Sexual dimorphism of hepatic 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat: the role of growth hormone patterns. *J Endocrinol*, 143(3): 541-8.
66. Jamieson PM, Nyirenda MJ, Walker BR, Chapman KE, Seckl JR. (1999) Interactions between oestradiol and glucocorticoid regulatory effects on liver-specific glucocorticoid-inducible genes: possible evidence for a role of hepatic 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Endocrinol*, 160(1): 103-9.
67. Li S, Liu W, Wang L, Huang R, Chen Q, Wu Y, Cai Y. (2011) Effects of menopause on hepatic 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity and adrenal sensitivity to adrenocorticotropin in healthy non-obese women.

- Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology, 27(10): 794-9.
68. Stewart PM, Burra P, Shackleton CH, Sheppard MC, Elias E. (1993) 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase deficiency and glucocorticoid status in patients with alcoholic and non-alcoholic chronic liver disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 76(3): 748-51.
 69. Ahmed A, Saksena S, Sherlock M, Olliff SP, Elias E, Stewart PM. (2008) Induction of hepatic 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in patients with alcoholic liver disease. *Clinical endocrinology*, 68(6): 898-903.
 70. Rogatsky I, Trowbridge JM, Garabedian MJ. (1997) Glucocorticoid receptor-mediated cell cycle arrest is achieved through distinct cell-specific transcriptional regulatory mechanisms. *Mol Cell Biol*, 17(6): 3181-93.
 71. Sanchez I, Goya L, Vallerga AK, Firestone GL. (1993) Glucocorticoids reversibly arrest rat hepatoma cell growth by inducing an early G1 block in cell cycle progression. *Cell Growth Differ*, 4(3): 215-25.
 72. Bujalska IJ, Kumar S, Stewart PM. (1997) Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? *Lancet*, 349(9060): 1210-3.
 73. Quirk SJ, Slattery JA, Funder JW. (1990) Epithelial and adipose cells isolated from mammary glands of pregnant and lactating rats differ in 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 37(4): 529-34.
 74. Hauner H, Schmid P, Pfeiffer EF. (1987) Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 64(4): 832-5.
 75. Friedberg M, Zoumakis E, Hiroi N, Bader T, Chrousos GP, Hochberg Z. (2003) Modulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in mature human subcutaneous adipocytes by hypothalamic messengers. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(1): 385-93.
 76. Handoko K, Yang K, Strutt B, Khalil W, Killinger D. (2000) Insulin attenuates the stimulatory effects of tumor necrosis factor alpha on 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 in human adipose stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 72(3-4): 163-8.

77. Tomlinson JW, Moore J, Cooper MS, Bujalska I, Shahmanesh M, Burt C, Strain A, Hewison M, Stewart PM. (2001) Regulation of expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue: tissue-specific induction by cytokines. *Endocrinology*, 142(5): 1982-9.
78. Bujalska IJ, Walker EA, Hewison M, Stewart PM. (2002) A switch in dehydrogenase to reductase activity of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 upon differentiation of human omental adipose stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(3): 1205-10.
79. Tomlinson JW, Sinha B, Bujalska I, Hewison M, Stewart PM. (2002) Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue is not increased in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(12): 5630-5.
80. Bujalska IJ, Kumar S, Hewison M, Stewart PM. (1999) Differentiation of adipose stromal cells: the roles of glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology*, 140(7): 3188-96.
81. Desbriere R, Vuaroqueaux V, Achard V, Boullu-Ciocca S, Labuhn M, Dutour A, Grino M. (2006) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 mRNA is increased in both visceral and subcutaneous adipose tissue of obese patients. *Obesity*, 14(5): 794-8.
82. Munoz R, Carvajal C, Escalona A, Boza C, Perez G, Ibanez L, Fardella C. (2009) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is overexpressed in subcutaneous adipose tissue of morbidly obese patients. *Obesity surgery*, 19(6): 764-70.
83. Makkonen J, Westerbacka J, Kolak M, Sutinen J, Corner A, Hamsten A, Fisher RM, Yki-Jarvinen H. (2007) Increased expression of the macrophage markers and of 11beta-HSD-1 in subcutaneous adipose tissue, but not in cultured monocyte-derived macrophages, is associated with liver fat in human obesity. *International journal of obesity*, 31(10): 1617-25.
84. Lindsay RS, Wake DJ, Nair S, Bunt J, Livingstone DE, Permana PA, Tataranni PA, Walker BR. (2003) Subcutaneous adipose 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity and messenger ribonucleic acid levels are associated with adiposity and insulinemia in Pima Indians and Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(6): 2738-44.

85. Rask E, Olsson T, Soderberg S, Andrew R, Livingstone DE, Johnson O, Walker BR. (2001) Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(3): 1418-21.
86. Rask E, Walker BR, Soderberg S, Livingstone DE, Eliasson M, Johnson O, Andrew R, Olsson T. (2002) Tissue-specific changes in peripheral cortisol metabolism in obese women: increased adipose 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(7): 3330-6.
87. Tomlinson JW, Finney J, Gay C, Hughes BA, Hughes SV, Stewart PM. (2008) Impaired glucose tolerance and insulin resistance are associated with increased adipose 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and elevated hepatic 5alpha-reductase activity. *Diabetes*, 57(10): 2652-60.
88. Andrew R, Phillips DI, Walker BR. (1998) Obesity and gender influence cortisol secretion and metabolism in man. *J Clin Endocrinol Metab*, 83(5): 1806-9.
89. Tiosano D, Eisentein I, Militianu D, Chrousos GP, Hochberg Z. (2003) 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase activity in hypothalamic obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(1): 379-84.
90. Stewart PM, Boulton A, Kumar S, Clark PM, Shackleton CH. (1999) Cortisol metabolism in human obesity: impaired cortisone-->cortisol conversion in subjects with central adiposity. *J Clin Endocrinol Metab*, 84(3): 1022-7.
91. Paulmyer-Lacroix O, Boullu S, Oliver C, Alessi MC, Grino M. (2002) Expression of the mRNA coding for 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue from obese patients: an in situ hybridization study. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(6): 2701-5.
92. Wake DJ, Rask E, Livingstone DE, Soderberg S, Olsson T, Walker BR. (2003) Local and systemic impact of transcriptional up-regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(8): 3983-8.
93. Morton NM, Seckl JR. (2008) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and obesity. *Frontiers of hormone research*, 36: 146-64.
94. Swali A, Walker EA, Lavery GG, Tomlinson JW, Stewart PM. (2008) 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 regulates insulin and glucagon secretion in pancreatic islets. *Diabetologia*, 51(11): 2003-11.

95. Gong R, Morris DJ, Brem AS. (2008) Variable expression of 11beta Hydroxysteroid dehydrogenase (11beta-HSD) isoforms in vascular endothelial cells. *Steroids*, 73(11): 1187-96.
96. Walker BR, Connacher AA, Lindsay RM, Webb DJ, Edwards CR. (1995) Carbenoxolone increases hepatic insulin sensitivity in man: a novel role for 11-oxosteroid reductase in enhancing glucocorticoid receptor activation. *J Clin Endocrinol Metab*, 80(11): 3155-9.
97. Alzamora R, Michea L, Marusic ET. (2000) Role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in nongenomic aldosterone effects in human arteries. *Hypertension*, 35(5): 1099-104.
98. Walker BR, Yau JL, Brett LP, Seckl JR, Monder C, Williams BC, Edwards CR. (1991) 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in vascular smooth muscle and heart: implications for cardiovascular responses to glucocorticoids. *Endocrinology*, 129(6): 3305-12.
99. Brem AS, Bina RB, King T, Morris DJ. (1995) Bidirectional activity of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in vascular smooth muscle cells. *Steroids*, 60(5): 406-10.
100. Young MJ, Moussa L, Dilley R, Funder JW. (2003) Early inflammatory responses in experimental cardiac hypertrophy and fibrosis: effects of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inactivation. *Endocrinology*, 144(3): 1121-5.
101. Walker BR, Williams BC. (1992) Corticosteroids and vascular tone: mapping the messenger maze. *Clin Sci (Lond)*, 82(6): 597-605.
102. Brem AS, Bina RB, Hill N, Alia C, Morris DJ. (1997) Effects of licorice derivatives on vascular smooth muscle function. *Life Sci*, 60(3): 207-14.
103. Souness GW, Brem AS, Morris DJ. (2002) 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase antisense affects vascular contractile response and glucocorticoid metabolism. *Steroids*, 67(3-4): 195-201.
104. Ullian ME, Schelling JR, Linas SL. (1992) Aldosterone enhances angiotensin II receptor binding and inositol phosphate responses. *Hypertension*, 20(1): 67-73.
105. van Uum SH, Hermus AR, Sweep CG, Walker BR, Ross HA, de Leeuw PW, Lenders JW. (2002) Short-term cortisol infusion in the brachial artery, with and without inhibiting 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, does not alter forearm

- vascular resistance in normotensive and hypertensive subjects. *Eur J Clin Invest*, 32(12): 874-81.
106. Hadoke PW, Christy C, Kotelevtsev YV, Williams BC, Kenyon CJ, Seckl JR, Mullins JJ, Walker BR. (2001) Endothelial cell dysfunction in mice after transgenic knockout of type 2, but not type 1, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Circulation*, 104(23): 2832-7.
107. Hult M, Elleby B, Shafqat N, Svensson S, Rane A, Jornvall H, Abrahmsen L, Oppermann U. (2004) Human and rodent type 1 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases are 7beta-hydroxycholesterol dehydrogenases involved in oxysterol metabolism. *Cell Mol Life Sci*, 61(7-8): 992-9.
108. Bland R, Worker CA, Noble BS, Eyre LJ, Bujalska IJ, Sheppard MC, Stewart PM, Hewison M. (1999) Characterization of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity and corticosteroid receptor expression in human osteosarcoma cell lines. *J Endocrinol*, 161(3): 455-64.
109. Cooper MS, Walker EA, Bland R, Fraser WD, Hewison M, Stewart PM. (2000) Expression and functional consequences of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human bone. *Bone*, 27(3): 375-81.
110. Cooper MS, Rabbitt EH, Goddard PE, Bartlett WA, Hewison M, Stewart PM. (2002) Osteoblastic 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity increases with age and glucocorticoid exposure. *J Bone Miner Res*, 17(6): 979-86.
111. Finckh C, Atalla A, Nagel G, Stinner B, Maser E. (2001) Expression and NNK reducing activities of carbonyl reductase and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human lung. *Chem Biol Interact*, 130-132(1-3): 761-73.
112. Moisan MP, Seckl JR, Edwards CR. (1990) 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase bioactivity and messenger RNA expression in rat forebrain: localization in hypothalamus, hippocampus, and cortex. *Endocrinology*, 127(3): 1450-5.
113. Lakshmi V, Sakai RR, McEwen BS, Monder C. (1991) Regional distribution of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat brain. *Endocrinology*, 128(4): 1741-8.

114. Korbonits M, Bujalska I, Shimojo M, Nobes J, Jordan S, Grossman AB, Stewart PM. (2001) Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoenzymes in the human pituitary: induction of the type 2 enzyme in corticotropinomas and other pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(6): 2728-33.
115. Rabbitt EH, Ayuk J, Boelaert K, Sheppard MC, Hewison M, Stewart PM, Gittoes NJ. (2003) Abnormal expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pituitary adenomas: a prereceptor determinant of pituitary cell proliferation. *Oncogene*, 22(11): 1663-7.
116. Rabbitt EH, Lavery GG, Walker EA, Cooper MS, Stewart PM, Hewison M. (2002) Prereceptor regulation of glucocorticoid action by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a novel determinant of cell proliferation. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(1): 36-44.
117. Koyama K, Myles K, Smith R, Krozowski Z. (2001) Expression of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme in breast tumors and modulation of activity and cell growth in PMC42 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 76(1-5): 153-9.
118. Wamil M, Seckl JR. (2007) Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as a promising therapeutic target. *Drug discovery today*, 12(13-14): 504-20.
119. Masuzaki H, Yamamoto H, Kenyon CJ, Elmquist JK, Morton NM, Paterson JM, Shinyama H, Sharp MG, Fleming S, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS. (2003) Transgenic amplification of glucocorticoid action in adipose tissue causes high blood pressure in mice. *The Journal of clinical investigation*, 112(1): 83-90.
120. van Raalte DH, Ouwens DM, Diamant M. (2009) Novel insights into glucocorticoid-mediated diabetogenic effects: towards expansion of therapeutic options? *Eur J Clin Invest*, 39(2): 81-93.
121. London E, Castonguay TW. (2009) Diet and the role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 on obesity. *The Journal of nutritional biochemistry*, 20(7): 485-93.

122. Morton NM. (2010) Obesity and corticosteroids: 11beta-hydroxysteroid type 1 as a cause and therapeutic target in metabolic disease. *Mol Cell Endocrinol*, 316(2): 154-64.
123. Masuzaki H, Flier JS. (2003) Tissue-specific glucocorticoid reactivating enzyme, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 beta-HSD1)--a promising drug target for the treatment of metabolic syndrome. *Current drug targets. Immune, endocrine and metabolic disorders*, 3(4): 255-62.
124. Staab CA, Maser E. (2010) 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is an important regulator at the interface of obesity and inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 119(1-2): 56-72.
125. Paterson JM, Morton NM, Fievet C, Kenyon CJ, Holmes MC, Staels B, Seckl JR, Mullins JJ. (2004) Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(18): 7088-93.
126. Kotelevtsev Y, Holmes MC, Burchell A, Houston PM, Schmol D, Jamieson P, Best R, Brown R, Edwards CR, Seckl JR, Mullins JJ. (1997) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26): 14924-9.
127. Morton NM, Holmes MC, Fievet C, Staels B, Tailleux A, Mullins JJ, Seckl JR. (2001) Improved lipid and lipoprotein profile, hepatic insulin sensitivity, and glucose tolerance in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 null mice. *J Biol Chem*, 276(44): 41293-300.
128. Liu Y, Nakagawa Y, Wang Y, Li R, Li X, Ohzeki T, Friedman TC. (2003) Leptin activation of corticosterone production in hepatocytes may contribute to the reversal of obesity and hyperglycemia in leptin-deficient ob/ob mice. *Diabetes*, 52(6): 1409-16.
129. Tannin GM, Agarwal AK, Monder C, New MI, White PC. (1991) The human gene for 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization. *J Biol Chem*, 266(25): 16653-8.

130. McKnight SL, Lane MD, Gluecksohn-Waelsch S. (1989) Is CCAAT/enhancer-binding protein a central regulator of energy metabolism? *Genes Dev*, 3(12B): 2021-4.
131. Ramos RA, Nishio Y, Maiyar AC, Simon KE, Ridder CC, Ge Y, Firestone GL. (1996) Glucocorticoid-stimulated CCAAT/enhancer-binding protein alpha expression is required for steroid-induced G1 cell cycle arrest of minimal-deviation rat hepatoma cells. *Mol Cell Biol*, 16(10): 5288-301.
132. Seckl JR, Walker BR. (2001) Minireview: 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1- a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology*, 142(4): 1371-6.
133. de Quervain DJ, Poirier R, Wollmer MA, Grimaldi LM, Tsolaki M, Streffer JR, Hock C, Nitsch RM, Mohajeri MH, Papassotiropoulos A. (2004) Glucocorticoid-related genetic susceptibility for Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 13(1): 47-52.
134. Franks PW, Knowler WC, Nair S, Koska J, Lee YH, Lindsay RS, Walker BR, Looker HC, Permana PA, Tataranni PA, Hanson RL. (2004) Interaction between an 11betaHSD1 gene variant and birth era modifies the risk of hypertension in Pima Indians. *Hypertension*, 44(5): 681-8.
135. Gambineri A, Vicennati V, Genghini S, Tomassoni F, Pagotto U, Pasquali R, Walker BR. (2006) Genetic variation in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 predicts adrenal hyperandrogenism among lean women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(6): 2295-302.
136. Gelernter-Yaniv L, Feng N, Sebring NG, Hochberg Z, Yanovski JA. (2003) Associations between a polymorphism in the 11 beta hydroxysteroid dehydrogenase type I gene and body composition. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27(8): 983-6.
137. Nair S, Lee YH, Lindsay RS, Walker BR, Tataranni PA, Bogardus C, Baier LJ, Permana PA. (2004) 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase Type 1: genetic polymorphisms are associated with Type 2 diabetes in Pima Indians independently of obesity and expression in adipocyte and muscle. *Diabetologia*, 47(6): 1088-95.

138. Dujic T, Bego T, Mlinar B, Semiz S, Malenica M, Prnjavorac B, Ostanek B, Marc J, Causevic A. (2012) Association between 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene polymorphisms and metabolic syndrome in Bosnian population. *Biochemia medica : casopis Hrvatskoga drustva medicinskih biokemicara / HDMB*, 22(1): 76-85.
139. Robitaille J, Brouillette C, Houde A, Despres JP, Tchernof A, Vohl MC. (2004) Molecular screening of the 11beta-HSD1 gene in men characterized by the metabolic syndrome. *Obesity research*, 12(10): 1570-5.
140. San Millan JL, Botella-Carretero JI, Alvarez-Blasco F, Luque-Ramirez M, Sancho J, Moghetti P, Escobar-Morreale HF. (2005) A study of the hexose-6-phosphate dehydrogenase gene R453Q and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene 83557insA polymorphisms in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(7): 4157-62.
141. Smit P, Dekker MJ, de Jong FJ, van den Beld AW, Koper JW, Pols HA, Brinkmann AO, de Jong FH, Breteler MM, Lamberts SW. (2007) Lack of Association of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene 83,557insA and hexose-6-phosphate dehydrogenase gene R453Q polymorphisms with body composition, adrenal androgen production, blood pressure, glucose metabolism, and dementia. *J Clin Endocrinol Metab*, 92(1): 359-62.
142. Szappanos A, Patocs A, Gergics P, Bertalan R, Kerti A, Acs B, Feldmann K, Racz K, Toth M. (2011) The 83,557insA variant of the gene coding 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 enzyme associates with serum osteocalcin in patients with endogenous Cushing's syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 123(1-2): 79-84.
143. Moon SS, Lee YS, Kim JG, Kim SW, Jeong JY, Jeon EJ, Seo HA, Kwak SH, Park KS, Lee IK. (2011) Relationship of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase gene polymorphisms with metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Endocrine journal*, 58(11): 949-59.
144. Gambineri A, Tomassoni F, Munarini A, Stimson RH, Mioni R, Pagotto U, Chapman KE, Andrew R, Mantovani V, Pasquali R, Walker BR. (2011) A combination of polymorphisms in HSD11B1 associates with in vivo 11{beta}-

- HSD1 activity and metabolic syndrome in women with and without polycystic ovary syndrome. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 165(2): 283-92.
145. White PC. (2005) Genotypes at 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 11B1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase loci are not risk factors for apparent cortisone reductase deficiency in a large population-based sample. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(10): 5880-3.
 146. Draper N, Powell BL, Franks S, Conway GS, Stewart PM, McCarthy MI. (2006) Variants implicated in cortisone reductase deficiency do not contribute to susceptibility to common forms of polycystic ovary syndrome. *Clinical endocrinology*, 65(1): 64-70.
 147. Miyamoto Y, Morisaki H, Yamanaka I, Kokubo Y, Masuzaki H, Okayama A, Tomoike H, Nakao K, Okamura T, Yoshimasa Y, Morisaki T. (2009) Association study of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene polymorphisms and metabolic syndrome in urban Japanese cohort. *Diabetes Res Clin Pract*, 85(2): 132-8.
 148. Hwang JY, Lee SH, Kim GS, Koh JM, Go MJ, Kim YJ, Kim HC, Kim TH, Hong JM, Park EK, Lee JY, Kim SY. (2009) HSD11B1 polymorphisms predicted bone mineral density and fracture risk in postmenopausal women without a clinically apparent hypercortisolemia. *Bone*, 45(6): 1098-103.
 149. Olza J, Gil-Campos M, Leis R, Ruperez AI, Tojo R, Canete R, Gil A, Aguilera CM. (2012) A gene variant of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is associated with obesity in children. *International journal of obesity*.
 150. Feigelson HS, Teras LR, Diver WR, Tang W, Patel AV, Stevens VL, Calle EE, Thun MJ, Bouzyk M. (2008) Genetic variation in candidate obesity genes ADRB2, ADRB3, GHRL, HSD11B1, IRS1, IRS2, and SHC1 and risk for breast cancer in the Cancer Prevention Study II. *Breast cancer research : BCR*, 10(4): R57.
 151. Rahman TJ, Mayosi BM, Hall D, Avery PJ, Stewart PM, Connell JM, Watkins H, Keavney B. (2011) Common variation at the 11-beta hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene is associated with left ventricular mass. *Circulation. Cardiovascular genetics*, 4(2): 156-62.

152. Feldman K, Szappanos A, Butz H, Grolmusz V, Majnik J, Liko I, Kriszt B, Lakatos P, Toth M, Racz K, Patocs A. (2012) The rs4844880 polymorphism in the promoter region of the HSD11B1 gene associates with bone mineral density in healthy and postmenopausal osteoporotic women. *Steroids*, 77(13): 1345-51.
153. Rebhan M, Chalifa-Caspi V, Prilusky J, Lancet D. (1997) GeneCards: integrating information about genes, proteins and diseases. *Trends in genetics : TIG*, 13(4): 163.
154. Lavery GG, Walker EA, Tiganescu A, Ride JP, Shackleton CH, Tomlinson JW, Connell JM, Ray DW, Biason-Lauber A, Malunowicz EM, Arlt W, Stewart PM. (2008) Steroid biomarkers and genetic studies reveal inactivating mutations in hexose-6-phosphate dehydrogenase in patients with cortisone reductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, 93(10): 3827-32.
155. Lawson AJ, Walker EA, Lavery GG, Bujalska IJ, Hughes B, Arlt W, Stewart PM, Ride JP. (2011) Cortisone-reductase deficiency associated with heterozygous mutations in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(10): 4111-6.
156. Caramelli E, Strippoli P, Di Giacomo T, Tietz C, Carinci P, Pasquali R. (2001) Lack of mutations of type 1 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene in patients with abdominal obesity. *Endocrine research*, 27(1-2): 47-61.
157. Tu H, Powers JP, Liu J, Ursu S, Sudom A, Yan X, Xu H, Meininger D, Degraffenreid M, He X, Jaen JC, Sun D, Labelle M, Yamamoto H, Shan B, Walker NP, Wang Z. (2008) Distinctive molecular inhibition mechanisms for selective inhibitors of human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Bioorg Med Chem*, 16(19): 8922-31.
158. Courtney R, Stewart PM, Toh M, Ndongo MN, Calle RA, Hirshberg B. (2008) Modulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11betaHSD) activity biomarkers and pharmacokinetics of PF-00915275, a selective 11betaHSD1 inhibitor. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 93(2): 550-6.
159. Blum A, Favia AD, Maser E. (2009) 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors with oleanan and ursan scaffolds. *Mol Cell Endocrinol*, 301(1-2): 132-6.

160. Sundbom M, Kaiser C, Bjorkstrand E, Castro VM, Larsson C, Selen G, Nyhem CS, James SR. (2008) Inhibition of 11betaHSD1 with the S-phenylethylaminothiazolone BVT116429 increases adiponectin concentrations and improves glucose homeostasis in diabetic KKAY mice. *BMC Pharmacol*, 8: 3.
161. Bhat BG, Younis H, Herrera J, Palacio K, Pascual B, Hur G, Jessen B, Ogilvie KM, Rejto PA. (2008) Antisense inhibition of 11betahydroxysteroid dehydrogenase type 1 improves diabetes in a novel cortisone-induced diabetic KK mouse model. *Biochemical and biophysical research communications*, 365(4): 740-5.
162. Barf T, Vallgarda J, Emond R, Haggstrom C, Kurz G, Nygren A, Larwood V, Mosialou E, Axelsson K, Olsson R, Engblom L, Edling N, Ronquist-Nii Y, Ohman B, Alberts P, Abrahmsen L. (2002) Arylsulfonamidothiazoles as a new class of potential antidiabetic drugs. Discovery of potent and selective inhibitors of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Journal of medicinal chemistry*, 45(18): 3813-5.
163. Su X, Vicker N, Trusselle M, Halem H, Culler MD, Potter BV. (2009) Discovery of novel inhibitors of human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Mol Cell Endocrinol*, 301(1-2): 169-73.
164. Andrews RC, Rooyackers O, Walker BR. (2003) Effects of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone on insulin sensitivity in men with type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 88(1): 285-91.
165. Engeli S, Bohnke J, Feldpausch M, Gorzelnik K, Heintze U, Janke J, Luft FC, Sharma AM. (2004) Regulation of 11beta-HSD genes in human adipose tissue: influence of central obesity and weight loss. *Obesity research*, 12(1): 9-17.
166. Kannisto K, Pietilainen KH, Ehrenborg E, Rissanen A, Kaprio J, Hamsten A, Yki-Jarvinen H. (2004) Overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 in adipose tissue is associated with acquired obesity and features of insulin resistance: studies in young adult monozygotic twins. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(9): 4414-21.

167. Sandeep TC, Andrew R, Homer NZ, Andrews RC, Smith K, Walker BR. (2005) Increased in vivo regeneration of cortisol in adipose tissue in human obesity and effects of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor carbenoxolone. *Diabetes*, 54(3): 872-9.
168. Tomlinson JW, Sherlock M, Hughes B, Hughes SV, Kilvington F, Bartlett W, Courtney R, Rejto P, Carley W, Stewart PM. (2007) Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in vivo limits glucocorticoid exposure to human adipose tissue and decreases lipolysis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 92(3): 857-64.
169. Rosenstock J, Banarer S, Fonseca VA, Inzucchi SE, Sun W, Yao W, Hollis G, Flores R, Levy R, Williams WV, Seckl JR, Huber R. (2010) The 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor INCB13739 improves hyperglycemia in patients with type 2 diabetes inadequately controlled by metformin monotherapy. *Diabetes care*, 33(7): 1516-22.
170. Feig PU, Shah S, Hermanowski-Vosatka A, Plotkin D, Springer MS, Donahue S, Thach C, Klein EJ, Lai E, Kaufman KD. (2011) Effects of an 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor, MK-0916, in patients with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome. *Diabetes, obesity & metabolism*, 13(6): 498-504.
171. Shah S, Hermanowski-Vosatka A, Gibson K, Ruck RA, Jia G, Zhang J, Hwang PM, Ryan NW, Langdon RB, Feig PU. (2011) Efficacy and safety of the selective 11beta-HSD-1 inhibitors MK-0736 and MK-0916 in overweight and obese patients with hypertension. *Journal of the American Society of Hypertension : JASH*, 5(3): 166-76.
172. Kwon JM, Goate AM. (2000) The candidate gene approach. *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 24(3): 164-8.
173. Zhu M, Zhao S. (2007) Candidate gene identification approach: progress and challenges. *International journal of biological sciences*, 3(7): 420-7.
174. Ralston SH. (2007) Genetics of osteoporosis. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 66(2): 158-65.

175. Fang Y, van Meurs JB, d'Alesio A, Jhamai M, Zhao H, Rivadeneira F, Hofman A, van Leeuwen JP, Jehan F, Pols HA, Uitterlinden AG. (2005) Promoter and 3'-untranslated-region haplotypes in the vitamin d receptor gene predispose to osteoporotic fracture: the rotterdam study. *American journal of human genetics*, 77(5): 807-23.
176. Mazziotti G, Angeli A, Bilezikian JP, Canalis E, Giustina A. (2006) Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 17(4): 144-9.
177. Patschan D, Loddenkemper K, Buttgereit F. (2001) Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone*, 29(6): 498-505.
178. den Uyl D, Bultink IE, Lems WF. (2011) Advances in glucocorticoid-induced osteoporosis. *Current rheumatology reports*, 13(3): 233-40.
179. Weinstein RS, Wan C, Liu Q, Wang Y, Almeida M, O'Brien CA, Thostenson J, Roberson PK, Boskey AL, Clemens TL, Manolagas SC. (2010) Endogenous glucocorticoids decrease skeletal angiogenesis, vascularity, hydration, and strength in aged mice. *Aging cell*, 9(2): 147-61.
180. Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, Bilezikian JP. (2007) Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 18(10): 1319-28.
181. Chen TL. (2004) Inhibition of growth and differentiation of osteoprogenitors in mouse bone marrow stromal cell cultures by increased donor age and glucocorticoid treatment. *Bone*, 35(1): 83-95.
182. Moutsatsou P, Kassi E, Papavassiliou AG. (2012) Glucocorticoid receptor signaling in bone cells. *Trends in molecular medicine*, 18(6): 348-59.
183. Takayama S, Rogatsky I, Schwarcz LE, Darimont BD. (2006) The glucocorticoid receptor represses cyclin D1 by targeting the Tcf-beta-catenin complex. *J Biol Chem*, 281(26): 17856-63.
184. Horsch K, de Wet H, Schuurmans MM, Allie-Reid F, Cato AC, Cunningham J, Burrin JM, Hough FS, Hulley PA. (2007) Mitogen-activated protein kinase

- phosphatase 1/dual specificity phosphatase 1 mediates glucocorticoid inhibition of osteoblast proliferation. *Molecular endocrinology*, 21(12): 2929-40.
185. Pierotti S, Gandini L, Lenzi A, Isidori AM. (2008) Pre-receptorial regulation of steroid hormones in bone cells: insights on glucocorticoid-induced osteoporosis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 108(3-5): 292-9.
 186. Pantschenko AG, Zhang W, Nahounou M, McCarthy MB, Stover ML, Lichtler AC, Clark SH, Gronowicz GA. (2005) Effect of osteoblast-targeted expression of bcl-2 in bone: differential response in male and female mice. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 20(8): 1414-29.
 187. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S. (1999) Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology*, 140(10): 4382-9.
 188. Gláz E. Hormontúltermeléssel nem járó mellékvese daganatok. In: Tulassay Z (szerk.), *A belgyógyászat alapjai*. Medicina, Budapest, 2007: 1463-1466.
 189. Abecassis M, McLoughlin MJ, Langer B, Kudlow JE. (1985) Serendipitous adrenal masses: prevalence, significance, and management. *American journal of surgery*, 149(6): 783-8.
 190. Belledegrun A, Hussain S, Seltzer SE, Loughlin KR, Gittes RF, Richie JP. (1986) Incidentally discovered mass of the adrenal gland. *Surgery, gynecology & obstetrics*, 163(3): 203-8.
 191. (2002) NIH state-of-the-science statement on management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma"). *NIH consensus and state-of-the-science statements*, 19(2): 1-25.
 192. Barzon L, Scaroni C, Sonino N, Fallo F, Gregianin M, Macri C, Boscaro M. (1998) Incidentally discovered adrenal tumors: endocrine and scintigraphic correlates. *J Clin Endocrinol Metab*, 83(1): 55-62.
 193. Gross MD, Shapiro B. (1993) Clinical review 50: Clinically silent adrenal masses. *J Clin Endocrinol Metab*, 77(4): 885-8.

194. Ross NS, Aron DC. (1990) Hormonal evaluation of the patient with an incidentally discovered adrenal mass. *The New England journal of medicine*, 323(20): 1401-5.
195. Hornsby PJ. (1987) Physiological and pathological effects of steroids on the function of the adrenal cortex. *Journal of steroid biochemistry*, 27(4-6): 1161-71.
196. Terzolo M, Bovio S, Reimondo G, Pia A, Osella G, Borretta G, Angeli A. (2005) Subclinical Cushing's syndrome in adrenal incidentalomas. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 34(2): 423-39, x.
197. Rossi R, Tauchmanova L, Luciano A, Di Martino M, Battista C, Del Viscovo L, Nuzzo V, Lombardi G. (2000) Subclinical Cushing's syndrome in patients with adrenal incidentaloma: clinical and biochemical features. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 85(4): 1440-8.
198. Tauchmanova L, Rossi R, Biondi B, Pulcrano M, Nuzzo V, Palmieri EA, Fazio S, Lombardi G. (2002) Patients with subclinical Cushing's syndrome due to adrenal adenoma have increased cardiovascular risk. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 87(11): 4872-8.
199. Terzolo M, Bovio S, Pia A, Conton PA, Reimondo G, Dall'Asta C, Bemporad D, Angeli A, Opocher G, Mannelli M, Ambrosi B, Mantero F. (2005) Midnight serum cortisol as a marker of increased cardiovascular risk in patients with a clinically inapparent adrenal adenoma. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 153(2): 307-15.
200. McNicol AM, Nolan CE, Struthers AJ, Farquharson MA, Hermans J, Haak HR. (1997) Expression of p53 in adrenocortical tumours: clinicopathological correlations. *The Journal of pathology*, 181(2): 146-52.
201. Nawar R, Aron D. (2005) Adrenal incidentalomas -- a continuing management dilemma. *Endocrine-related cancer*, 12(3): 585-98.
202. Baumgartner-Parzer SM, Pauschenwein S, Waldhausl W, Polzler K, Nowotny P, Vierhapper H. (2002) Increased prevalence of heterozygous 21-OH germline mutations in patients with adrenal incidentalomas. *Clinical endocrinology*, 56(6): 811-6.

203. Jaresch S, Kornely E, Kley HK, Schlaghecke R. (1992) Adrenal incidentaloma and patients with homozygous or heterozygous congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*, 74(3): 685-9.
204. Kjellman M, Holst M, Backdahl M, Larsson C, Farnebo LO, Wedell A. (1999) No overrepresentation of congenital adrenal hyperplasia in patients with adrenocortical tumours. *Clinical endocrinology*, 50(3): 343-6.
205. Beuschlein F, Schulze E, Mora P, Gensheimer HP, Maser-Gluth C, Allolio B, Reincke M. (1998) Steroid 21-hydroxylase mutations and 21-hydroxylase messenger ribonucleic acid expression in human adrenocortical tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 83(7): 2585-8.
206. Patocs A, Toth M, Barta C, Sasvari-Szekely M, Varga I, Szucs N, Jakab C, Glaz E, Racz K. (2002) Hormonal evaluation and mutation screening for steroid 21-hydroxylase deficiency in patients with unilateral and bilateral adrenal incidentalomas. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 147(3): 349-55.
207. Copeland PM. (1983) The incidentally discovered adrenal mass. *Annals of internal medicine*, 98(6): 940-5.
208. Favia G, Lumachi F, Basso S, D'Amico DF. (2000) Management of incidentally discovered adrenal masses and risk of malignancy. *Surgery*, 128(6): 918-24.
209. McLeod MK, Thompson NW, Gross MD, Bondeson AG, Bondeson L. (1990) Sub-clinical Cushing's syndrome in patients with adrenal gland incidentalomas. Pitfalls in diagnosis and management. *The American surgeon*, 56(7): 398-403.
210. Unger N, Hinrichs J, Deutschbein T, Schmidt H, Walz MK, Mann K, Petersenn S. (2012) Plasma and urinary metanephrines determined by an enzyme immunoassay, but not serum chromogranin A for the diagnosis of pheochromocytoma in patients with adrenal mass. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 120(8): 494-500.
211. Sohn SY, Park HD, Lee SY, Kim JH, Jung BC, Kim HJ, Jang HW, Kim KW, Lee MK, Min YK. (2012) Different diagnostic cut-off values of urinary fractionated metanephrines according to sex for the diagnosis of pheochromocytoma in Korean subjects. *Endocrine journal*, 59(9): 831-8.

212. Sereg M, Toke J, Patocs A, Varga I, Igaz P, Szucs N, Horanyi J, Pusztai P, Czirjak S, Glaz E, Racz K, Toth M. (2011) Diagnostic performance of salivary cortisol and serum osteocalcin measurements in patients with overt and subclinical Cushing's syndrome. *Steroids*, 76(1-2): 38-42.
213. Terzolo M, Osella G, Ali A, Borretta G, Cesario F, Paccotti P, Angeli A. (1998) Subclinical Cushing's syndrome in adrenal incidentaloma. *Clinical endocrinology*, 48(1): 89-97.
214. Toth M, Racz K, Adleff V, Varga I, Futo L, Jakab C, Karlinger K, Kiss R, Glaz E. (2000) Comparative analysis of plasma 17-hydroxyprogesterone and cortisol responses to ACTH in patients with various adrenal tumors before and after unilateral adrenalectomy. *Journal of endocrinological investigation*, 23(5): 287-94.
215. Leövey A. (szerk.), A klinikai endokrinológia és anyagcsere-betegségek kézikönyve. Medicina, Budapest, 2001: 440-448.
216. Nieman LK. (2010) Approach to the patient with an adrenal incidentaloma. *J Clin Endocrinol Metab*, 95(9): 4106-13.
217. Mayo-Smith WW, Boland GW, Noto RB, Lee MJ. (2001) State-of-the-art adrenal imaging. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc*, 21(4): 995-1012.
218. Baker ME, Spritzer C, Blinder R, Herfkens RJ, Leight GS, Dunnick NR. (1987) Benign adrenal lesions mimicking malignancy on MR imaging: report of two cases. *Radiology*, 163(3): 669-71.
219. Dunnick NR, Korobkin M. (2002) Imaging of adrenal incidentalomas: current status. *AJR. American journal of roentgenology*, 179(3): 559-68.
220. Chezmar JL, Robbins SM, Nelson RC, Steinberg HV, Torres WE, Bernardino ME. (1988) Adrenal masses: characterization with T1-weighted MR imaging. *Radiology*, 166(2): 357-9.
221. Reinig JW, Doppman JL, Dwyer AJ, Frank J. (1986) MRI of indeterminate adrenal masses. *AJR. American journal of roentgenology*, 147(3): 493-6.
222. Tsushima Y. (1994) Different lipid contents between aldosterone-producing and nonhyperfunctioning adrenocortical adenomas: in vivo measurement using

- chemical-shift magnetic resonance imaging. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 79(6): 1759-62.
223. Honigschnabl S, Gallo S, Niederle B, Prager G, Kaserer K, Lechner G, Heinz-Peer G. (2002) How accurate is MR imaging in characterisation of adrenal masses: update of a long-term study. *European journal of radiology*, 41(2): 113-22.
224. McCorkell SJ, Niles NL. (1985) Fine-needle aspiration of catecholamine-producing adrenal masses: a possibly fatal mistake. *AJR. American journal of roentgenology*, 145(1): 113-4.
225. Sereg M, Szappanos A, Toke J, Karlinger K, Feldman K, Kaszper E, Varga I, Glaz E, Racz K, Toth M. (2009) Atherosclerotic risk factors and complications in patients with non-functioning adrenal adenomas treated with or without adrenalectomy: a long-term follow-up study. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 160(4): 647-55.
226. Barzon L, Scaroni C, Sonino N, Fallo F, Paoletta A, Boscaro M. (1999) Risk factors and long-term follow-up of adrenal incidentalomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 84(2): 520-6.
227. Libe R, Dall'Asta C, Barbetta L, Baccarelli A, Beck-Peccoz P, Ambrosi B. (2002) Long-term follow-up study of patients with adrenal incidentalomas. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 147(4): 489-94.
228. Grossrubatscher E, Vignati F, Possa M, Lohi P. (2001) The natural history of incidentally discovered adrenocortical adenomas: a retrospective evaluation. *Journal of endocrinological investigation*, 24(11): 846-55.
229. Osella G, Terzolo M, Borretta G, Magro G, Ali A, Piovesan A, Paccotti P, Angeli A. (1994) Endocrine evaluation of incidentally discovered adrenal masses (incidentalomas). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 79(6): 1532-9.
230. Bulow B, Jansson S, Juhlin C, Steen L, Thoren M, Wahrenberg H, Valdemarsson S, Wangberg B, Ahren B. (2006) Adrenal incidentaloma - follow-up results from a Swedish prospective study. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 154(3): 419-23.

231. Mansmann G, Lau J, Balk E, Rothberg M, Miyachi Y, Bornstein SR. (2004) The clinically inapparent adrenal mass: update in diagnosis and management. *Endocrine reviews*, 25(2): 309-40.
232. Siren J, Tervahartiala P, Sivula A, Haapiainen R. (2000) Natural course of adrenal incidentalomas: seven-year follow-up study. *World journal of surgery*, 24(5): 579-82.
233. Bernini GP, Moretti A, Oriandini C, Bardini M, Taurino C, Salvetti A. (2005) Long-term morphological and hormonal follow-up in a single unit on 115 patients with adrenal incidentalomas. *British journal of cancer*, 92(6): 1104-9.
234. Luton JP, Martinez M, Coste J, Bertherat J. (2000) Outcome in patients with adrenal incidentaloma selected for surgery: an analysis of 88 cases investigated in a single clinical center. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 143(1): 111-7.
235. Terzolo M, Pia A, Ali A, Osella G, Reimondo G, Bovio S, Daffara F, Procopio M, Paccotti P, Borretta G, Angeli A. (2002) Adrenal incidentaloma: a new cause of the metabolic syndrome? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 87(3): 998-1003.
236. Emral R, Uysal AR, Asik M, Gullu S, Corapcioglu D, Tonyukuk V, Erdogan G. (2003) Prevalence of subclinical Cushing's syndrome in 70 patients with adrenal incidentaloma: clinical, biochemical and surgical outcomes. *Endocrine journal*, 50(4): 399-408.
237. Masserini B, Morelli V, Bergamaschi S, Ermetici F, Eller-Vainicher C, Barbieri AM, Maffini MA, Scillitani A, Ambrosi B, Beck-Peccoz P, Chiodini I. (2009) The limited role of midnight salivary cortisol levels in the diagnosis of subclinical hypercortisolism in patients with adrenal incidentaloma. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 160(1): 87-92.
238. Flecchia D, Mazza E, Carlini M, Blatto A, Olivieri F, Serra G, Camanni F, Messina M. (1995) Reduced serum levels of dehydroepiandrosterone sulphate in adrenal incidentalomas: a marker of adrenocortical tumour. *Clinical endocrinology*, 42(2): 129-34.

239. Toniato A, Merante-Boschin I, Opocher G, Pelizzo MR, Schiavi F, Ballotta E. (2009) Surgical versus conservative management for subclinical Cushing syndrome in adrenal incidentalomas: a prospective randomized study. *Ann Surg*, 249(3): 388-91.
240. Mondok A, Varga I, Glaz E, Szucs N, Toth M, Patocs A, Beko G, Racz K. (2009) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in acromegalic patients with normal or impaired carbohydrate metabolism. *Steroids*, 74(9): 725-9.
241. Looker AC, Wahner HW, Dunn WL, Calvo MS, Harris TB, Heyse SP, Johnston CC, Jr., Lindsay RL. (1995) Proximal femur bone mineral levels of US adults. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 5(5): 389-409.
242. Dalle Carbonare L, Arlot ME, Chavassieux PM, Roux JP, Portero NR, Meunier PJ. (2001) Comparison of trabecular bone microarchitecture and remodeling in glucocorticoid-induced and postmenopausal osteoporosis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 16(1): 97-103.
243. Klein RG, Arnaud SB, Gallagher JC, Deluca HF, Riggs BL. (1977) Intestinal calcium absorption in exogenous hypercortisonism. Role of 25-hydroxyvitamin D and corticosteroid dose. *The Journal of clinical investigation*, 60(1): 253-9.
244. Cooper MS. (2004) Sensitivity of bone to glucocorticoids. *Clin Sci (Lond)*, 107(2): 111-23.
245. Mancini T, Doga M, Mazziotti G, Giustina A. (2004) Cushing's syndrome and bone. *Pituitary*, 7(4): 249-52.
246. Malavasi EL, Kelly V, Nath N, Gambineri A, Dakin RS, Pagotto U, Pasquali R, Walker BR, Chapman KE. Functional effects of polymorphisms in the human gene encoding 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 beta-HSD1): a sequence variant at the translation start of 11 beta-HSD1 alters enzyme levels. *Endocrinology*, 151(1): 195-202.
247. Deary IJ, Hayward C, Permana PA, Nair S, Whalley LJ, Starr JM, Chapman KE, Walker BR, Seckl JR. (2006) Polymorphisms in the gene encoding 11B-

- hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (HSD11B1) and lifetime cognitive change. *Neurosci Lett*, 393(1): 74-7.
248. Kung AW, Lai BM, Ng MY, Chan V, Sham PC. (2006) T-1213C polymorphism of estrogen receptor beta is associated with low bone mineral density and osteoporotic fractures. *Bone*, 39(5): 1097-106.
249. Swanberg M, McGuigan F, Ivaska KK, Gerdhem P, Lerner UH, Bucala R, Kuchel G, Kenny A, Akesson K. (2010) Polymorphisms in the macrophage migration inhibitory factor gene and bone loss in postmenopausal women. *Bone*, 47(2): 424-9.
250. Mencej S, Albagha OM, Prezelj J, Kocjan T, Marc J. (2008) Tumour necrosis factor superfamily member 11 gene promoter polymorphisms modulate promoter activity and influence bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *Journal of molecular endocrinology*, 40(6): 273-9.
251. Jin H, van't Hof RJ, Albagha OM, Ralston SH. (2009) Promoter and intron 1 polymorphisms of COL1A1 interact to regulate transcription and susceptibility to osteoporosis. *Human molecular genetics*, 18(15): 2729-38.
252. Osella G, Terzolo M, Reimondo G, Piovesan A, Pia A, Termine A, Paccotti P, Angeli A. (1997) Serum markers of bone and collagen turnover in patients with Cushing's syndrome and in subjects with adrenal incidentalomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 82(10): 3303-7.
253. Tauchmanova L, Rossi R, Nuzzo V, del Puente A, Esposito-del Puente A, Pizzi C, Fonderico F, Lupoli G, Lombardi G. (2001) Bone loss determined by quantitative ultrasonometry correlates inversely with disease activity in patients with endogenous glucocorticoid excess due to adrenal mass. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 145(3): 241-7.
254. Sartorio A, Conti A, Ferrero S, Giambona S, Re T, Passini E, Ambrosi B. (1998) Evaluation of markers of bone and collagen turnover in patients with active and preclinical Cushing's syndrome and in patients with adrenal incidentaloma. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 138(2): 146-52.
255. Torlontano M, Chiodini I, Pileri M, Guglielmi G, Cammisa M, Modoni S, Carnevale V, Trischitta V, Scillitani A. (1999) Altered bone mass and turnover

- in female patients with adrenal incidentaloma: the effect of subclinical hypercortisolism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 84(7): 2381-5.
256. Chiodini I, Guglielmi G, Battista C, Carnevale V, Torlontano M, Cammisa M, Trischitta V, Scillitani A. (2004) Spinal volumetric bone mineral density and vertebral fractures in female patients with adrenal incidentalomas: the effects of subclinical hypercortisolism and gonadal status. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 89(5): 2237-41.
257. Chiodini I, Tauchmanova L, Torlontano M, Battista C, Guglielmi G, Cammisa M, Colao A, Carnevale V, Rossi R, Di Lembo S, Trischitta V, Scillitani A. (2002) Bone involvement in eugonadal male patients with adrenal incidentaloma and subclinical hypercortisolism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 87(12): 5491-4.
258. Chiodini I, Torlontano M, Carnevale V, Guglielmi G, Cammisa M, Trischitta V, Scillitani A. (2001) Bone loss rate in adrenal incidentalomas: a longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(11): 5337-41.
259. Bardet S, Rohmer V, Boux de Casson F, Coffin C, Ronci N, Sabatier JP, Lecomte P, Audran M, Henry-Amar M, Tabarin A. (2002) [Bone mineral density and biological markers of bone repair in patients with adrenal incidentaloma: effect of subclinical hypercortisolism]. *La Revue de medecine interne / fondee ... par la Societe nationale francaise de medecine interne*, 23(6): 508-17.
260. Hadjidakis D, Tsagarakis S, Roboti C, Sfakianakis M, Iconomidou V, Raptis SA, Thalassinou N. (2003) Does subclinical hypercortisolism adversely affect the bone mineral density of patients with adrenal incidentalomas? *Clinical endocrinology*, 58(1): 72-7.
261. Francucci CM, Pantanetti P, Garrapa GG, Massi F, Arnaldi G, Mantero F. (2002) Bone metabolism and mass in women with Cushing's syndrome and adrenal incidentaloma. *Clinical endocrinology*, 57(5): 587-93.
262. Osella G, Reimondo G, Peretti P, Ali A, Paccotti P, Angeli A, Terzolo M. (2001) The patients with incidentally discovered adrenal adenoma (incidentaloma) are

- not at increased risk of osteoporosis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 86(2): 604-7.
263. Tung SC, Hwang DY, Yang JW, Chen WJ, Lee CT. (2012) An unusual presentation of Carney complex with diffuse primary pigmented nodular adrenocortical disease on one adrenal gland and a nonpigmented adrenocortical adenoma and focal primary pigmented nodular adrenocortical disease on the other. *Endocrine journal*, 59(9): 823-30.
264. Newey PJ, Thakker RV. (2011) Role of multiple endocrine neoplasia type 1 mutational analysis in clinical practice. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*, 17 Suppl 3: 8-17.
265. Tzanela M, Mantzou E, Saltiki K, Tampourlou M, Kalogeris N, Hadjidakis D, Tsagarakis S, Alevizaki M. (2012) Clinical and biochemical impact of BCL1 polymorphic genotype of the glucocorticoid receptor gene in patients with adrenal incidentalomas. *Journal of endocrinological investigation*, 35(4): 395-400.
266. Lazurova I, Spisakova D, Wagnerova H, Habalova V, Dravecka I, Darina P, Drahovska I, Pundova L. (2011) Clinically silent adrenal adenomas - their relation to the metabolic syndrome and to GNB3 C825T gene polymorphism. *Wiener klinische Wochenschrift*, 123(19-20): 618-22.
267. Banlaki Z, Raizer G, Acs B, Majnik J, Doleschall M, Szilagyi A, Racz K, Fust G, Patocs A. (2012) ACTH-induced cortisol release is related to the copy number of the C4B gene encoding the fourth component of complement in patients with non-functional adrenal incidentaloma. *Clinical endocrinology*, 76(4): 478-84.
268. Harman E, Karadeniz M, Biray C, Zengi A, Cetinkalp S, Ozgen AG, Saygili F, Berdeli A, Gunduz C, Yilmaz C. (2009) The relation of adiponectin and tumor necrosis factor alpha levels between endothelial nitric oxide synthase, angiotensin-converting enzyme, transforming growth factor beta, and tumor necrosis factor alpha gene polymorphism in adrenal incidentalomas. *Journal of endocrinological investigation*, 32(11): 881-8.

269. Reincke M, Nieke J, Krestin GP, Saeger W, Allolio B, Winkelmann W. (1992) Preclinical Cushing's syndrome in adrenal "incidentalomas": comparison with adrenal Cushing's syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 75(3): 826-32.
270. Feldman K, Szappanos A, Butz H, Grolmusz V, Majnik J, Liko I, Kriszt B, Lakatos P, Toth M, Racz K, Patocs A. (2012) The rs4844880 polymorphism in the promoter region of the HSD11B1 gene associates with bone mineral density in healthy and postmenopausal osteoporotic women. *Steroids*.
271. Vidal C, Formosa R, Xuereb-Anastasi A. (2011) Functional polymorphisms within the TNFRSF11B (osteoprotegerin) gene increase the risk for low bone mineral density. *Journal of molecular endocrinology*, 47(3): 327-33.
272. Cooper MS, Bujalska I, Rabbitt E, Walker EA, Bland R, Sheppard MC, Hewison M, Stewart PM. (2001) Modulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes by proinflammatory cytokines in osteoblasts: an autocrine switch from glucocorticoid inactivation to activation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 16(6): 1037-44.
273. Eijken M, Hewison M, Cooper MS, de Jong FH, Chiba H, Stewart PM, Uitterlinden AG, Pols HA, van Leeuwen JP. (2005) 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase expression and glucocorticoid synthesis are directed by a molecular switch during osteoblast differentiation. *Mol Endocrinol*, 19(3): 621-31.
274. Cooper MS, Hewison M, Stewart PM. (1999) Glucocorticoid activity, inactivity and the osteoblast. *J Endocrinol*, 163(2): 159-64.
275. Bruley C, Lyons V, Worsley AG, Wilde MD, Darlington GD, Morton NM, Seckl JR, Chapman KE. (2006) A novel promoter for the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene is active in lung and is C/EBPalpha independent. *Endocrinology*, 147(6): 2879-85.
276. Sai S, Esteves CL, Kelly V, Michailidou Z, Anderson K, Coll AP, Nakagawa Y, Ohzeki T, Seckl JR, Chapman KE. (2008) Glucocorticoid regulation of the promoter of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is indirect and requires

- CCAAT/enhancer-binding protein-beta. *Molecular endocrinology*, 22(9): 2049-60.
277. Williams LJ, Lyons V, MacLeod I, Rajan V, Darlington GJ, Poli V, Seckl JR, Chapman KE. (2000) C/EBP regulates hepatic transcription of 11beta - hydroxysteroid dehydrogenase type 1. A novel mechanism for cross-talk between the C/EBP and glucocorticoid signaling pathways. *J Biol Chem*, 275(39): 30232-9.
278. Yang Z, Guo C, Zhu P, Li W, Myatt L, Sun K. (2007) Role of glucocorticoid receptor and CCAAT/enhancer-binding protein alpha in the feed-forward induction of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression by cortisol in human amnion fibroblasts. *J Endocrinol*, 195(2): 241-53.
279. Gout J, Tirard J, Thevenon C, Riou JP, Begeot M, Naville D. (2006) CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBPs) regulate the basal and cAMP-induced transcription of the human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase encoding gene in adipose cells. *Biochimie*, 88(9): 1115-24.
280. Staab CA, Stegk JP, Haenisch S, Neiss E, Kobsch K, Ebert B, Cascorbi I, Maser E. Analysis of alternative promoter usage in expression of HSD11B1 including the development of a transcript-specific quantitative real-time PCR method. *Chem Biol Interact*, 191(1-3): 104-112.

14. Saját közlemények

14.1. A dolgozat témájában megjelent közlemények

1. Feldman, K., Szappanos A., Butz H., Grolmusz V., Majnik J., Likó I., Kriszt B., Lakatos P., Tóth M., Rác K., Patócs. A. (2012) "The rs4844880 polymorphism in the promoter region of the *HSD11B1* gene associates with bone mineral density in healthy and postmenopausal osteoporotic women." **Steroids**. 77(13):1345-1351 **IF:2,83**
2. Feldman K., Likó I., Nagy Zs., Szappanos A., Grolmusz V., Tóth M., Rác K., Patócs A. (2013) A 11- β -hidroxi-szteroid-dehidrogenáz enzim jelentősége klinikai kórképekben. **Orvosi hetilap.**, 154, 283–293.
3. Szappanos A, Patócs A, Gergics P, Bertalan R, Kerti A, Ács B, Feldmann K, Rác K, Tóth M. (2011) The 83557insA variant of the gene coding 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 enzyme associates with serum osteocalcin in patients with endogenous Cushing's syndrome. **J Steroid Biochem Mol Biol**. 123: 79–84. **IF:3,053**

14.2. A dolgozat témájától független publikációk

1. Boyle B, Butz H, Liko I, Zalatnai A, Toth M, Feldman K, Horanyi J, Igaz P, Racz K, Patocs A. (2010) Expression of glucocorticoid receptor isoforms in human adrenocortical adenomas. **Steroids**. 75(10):695-700. **IF:3,106**
2. Beko G, Varga I, Glaz E, Sereg M, Feldman K, Toth M, Racz K, Patocs A. (2010) Cutoff values of midnight salivary cortisol for the diagnosis of overt hypercortisolism are highly influenced by methods. **Clin Chim Acta**. 411(5-6):364-7. **IF:2,389**
3. Sereg M, Szappanos A, Toke J, Karlinger K, Feldman K, Kaszper E, Varga I, Gláz E, Rác K, Tóth M. (2009) Atherosclerotic risk factors and complications in patients with non-functioning adrenal adenomas treated with or without adrenalectomy: a long-term follow-up study. **Eur J Endocrinol**. 160(4):647-55. **IF:3,539**

15. Köszönetnyilvánítás

A munkámban nyújtott segítségért szeretnék köszönetet mondani:

Dr. Rácz Károly professzor úrnak, aki lehetővé tette, hogy a II. számú Belgyógyászati Klinika Endokrin Laborjában dolgozhassak már TDK hallgatóként is, megszeretette velem az endokrinológiát, és PhD tanulmányaim elején témavezetőként, a későbbiek során pedig konzulensként segítette munkámat.

Témavezetőmnek, Dr. Patócs Attilának, aki szakmai irányításával és értékes tanácsaival támogatta a munkámat, és megismertetett a genetika szépségeivel.

Dr. Tulassay Zsolt professzor úrnak, a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika előző igazgatójának és a Klinikai Orvostudományok Tudományági Doktori Iskola jelenlegi vezetőjének a lehetőségért, hogy a II. sz. Belgyógyászati Klinikán végezhettem PhD tanulmányaimat.

Dr. Tóth Miklós egyetemi docens úrnak, Dr. Gláz Edit és Dr. Gerendai Ida professzor asszonyoknak, Dr. Kiss Róbertnek, Dr. Igaz Péternek, Dr. Ádler Ildikónak, Dr. Szűcs Nikolette-nek, Dr. Pusztai Péternek, Dr. Reismann Péternek, Dr. Tőke Juditnak és a II. Sz. Belgyógyászati Klinika endokrin munkacsoportjának.

Krauszne Vaczula Máriának a labormunka alapjainak elsajátításában nyújtott segítségéért és a sok támogatásért.

Dr. Likó Istvánnak, akinek a funkcionális vizsgálatok során nyújtott segítsége és szemlélete elengedhetetlen volt a munkámhoz.

A Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika Endokrinológiai és Izo-¹²⁵I Laboratóriumában dolgozó valamennyi asszisztensnek és Dr. Varga Ibolyának.

A molekuláris labor volt és jelenlegi PhD hallgatói közül Dr. Szappanos Ágnesnek, dr. Lendvai Nikolettának, Dr. Butz Henriettnek, Dr. Tömböl Zsófiának, Dr. Szabó Péternek, dr. Grolmusz Vincének, dr. Ács Bencének és dr. Kender Zoltánnak. Nagy Zsolt és Kövesdi Zsófia TDK hallgatóknak.

A Richter munkacsoportban dolgozó munkatársaknak, elsősorban Szendrei Juditnak, akinek türelme és kedvessége átsegített a funkcionális mérések nehézségein, továbbá Tárnokné Vörös Erzsébetnek, Kocsisné Tatár Brigittának, Authné Éles Gabrielának és Bugovics Gyulának.

Férjemnek, kislányomnak, szüleimnek, családomnak a sok-sok türelemért, segítségért és támogatásért.