

Keringő mikroRNS-ek vizsgálata jó- és rosszindulatú mellékvese daganatokban

Doktori értekezés

Dr. Decmann Ábel

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Igaz Péter, DSc, egyetemi tanár
Hivatalos bírálók: Dr. Nagy Bálint, DSc, egyetemi tanár
Dr. Wiener Zoltán, PhD, egyetemi docens

Komplex vizsga bizottság elnöke: Dr. Horváth Csaba, DSc, egyetemi tanár
Komplex vizsga bizottság tagjai: Dr. Hubina Erika, PhD, főorvos
Dr. Beke Artúr, PhD, egyetemi adjunktus

Budapest
2019

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	8
1.1. A mellékvese daganatai	8
1.1.1. Mellékvesekéreg-rák	9
1.1.1.1. A mellékvesekéreg-rák etiológiája	9
1.1.1.2. A mellékvesekéreg-rák klinikai megjelenése	10
1.1.1.3. Molekuláris eltérések mellékvesekéreg-rákban	10
1.1.1.4. A mellékvesekéreg-rák kezelése	12
1.1.2. Mellékvese myelolipoma	12
1.1.2.1. A mellékvese myelolipoma etiológiája	13
1.1.2.2. A mellékvese myelolipoma patogenezise	13
1.1.2.3. A mellékvese myelolipoma patológiai jellemzői	15
1.1.2.4. A myelolipoma klinikai megjelenése	17
1.1.2.5. A myelolipoma kórisméje	20
1.1.2.6. A myelolipoma kezelése	21
1.1.3. Mellékvesekéreg-adenoma	22
1.1.3.1. Primer aldosteronismus	22
1.2. Differenciál diagnosztikai kihívások	24
1.2.1. A mellékvese daganatainak elkülönítése	24
1.2.2. A primer aldosteronismus diagnózisa és differenciál-diagnosztikája	25
1.3. A mikroRNS-ek	26
1.3.1. A mikroRNS-ek bioszintézise	26
1.3.2. A miRNS-ek biológiai hatásai	28
1.3.3. Az extracelluláris miRNS-ek	29
1.3.4. miRNS-ek a mellékvesekéreg-daganatok diagnosztikájában	30
2. Célkitűzések	35
3. Módszerek	37
3.1. miRNS profilozás mellékvese myelolipomában, mellékvesekéreg-rákban és mellékvesekéreg-adenomában	37
3.1.1. Felhasznált minták, betegadatok	37

3.1.2. A minták feldolgozása és miRNS izolálása szövetből és plazmából	46
3.1.3. Szöveti miRNS expressziós profilozás újgenerációs szekvenálás segítségével	46
3.1.4. A szekvenálás során szignifikánsan eltérő kifejeződésű miRNS-ek validálása	47
3.1.5. Statisztikai analízis	47
3.1.6. Útvonalelemzés	48
3.2. A <i>hsa-miR-483-5p</i> expressziójának összehasonlítása ACC és ACA betegek plazma és vizeletmintáiban	48
3.2.1. Felhasznált minták, betegadatok	48
3.2.2. A minták feldolgozása és RNS izolálás	51
3.2.3. A <i>miR-483-5p</i> expresszió mérése valós idejű PCR-rel	51
3.2.4. Statisztikai analízis	51
3.3. miRNS profilozás primer aldosteronismusban	51
3.3.1. Felhasznált minták, betegadatok	52
3.3.2. A minták feldolgozása	58
3.3.3. miRNS expresszió profilozás plazmamintákból újgenerációs szekvenálással	59
3.3.4. Egyedi miRNS-ek validálása	59
3.3.5. Statisztikai elemzés	59
4. Eredmények	61
4.1. miRNS profilozás mellékvese myelolipomában, mellékvesekéreg-rákban és mellékvesekéreg-adenomában	61
4.1.1. Szöveti miRNS expressziós profilozás újgenerációs szekvenálás segítségével	61
4.1.2. A szekvenálás során szignifikánsan eltérő kifejeződésű miRNS-ek validálása	61
4.1.3. miRNS expresszió vizsgálata plazmamintában	63
4.1.4. A miRNS-ek diagnosztikus hatékonyságának vizsgálata	66
4.1.5. Útvonal-elemzés	67
4.2. A <i>hsa-miR-483-5p</i> expressziójának összehasonlítása ACC és ACA betegek plazma és vizeletmintáiban	69
4.2.1. <i>hsa-miR-483-5p</i> expresszió analízis valós idejű PCR-rel plazma és vizeletmintákon	69
4.2.2. A plazma <i>hsa-miR-483-5p</i> diagnosztikus hatékonysága	70
4.3. miRNS profilozás primer aldosteronismusban	72

4.3.1. miRNS expresszió profilozás plazmamintákból NGS-sel	72
4.3.2. A kiválasztott miRNS-ek valós idejű PCR validálása	72
4.3.3. A keringő miRNS-ek diagnosztikus hatékonysága	75
5. Megbeszélés	76
5.1. miRNS expresszió profilozás mellékvese myelolipomában, mellékvesekéreg-rákban és mellékvesekéreg-adenomában	76
5.2. A <i>hsa-miR-483-5p</i> expressziójának összehasonlítása ACC és ACA betegek plazma és vizeletmintáiban	78
5.3. miRNS expressziós profilozás primer aldosteronismusban	79
6. Következtetések	82
7. Összefoglalás	84
8. Summary	85
9. Irodalomjegyzék	86
10. Saját publikációk jegyzéke	110
10.1. Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények jegyzéke	110
10.2. Az értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó saját közlemények jegyzéke	111
11. Köszönetnyilvánítás	112

Rövidítések jegyzéke

ACA: Adrenocorticalis adenoma

ACC: Adrenocorticalis carcinoma

ACTH: Adrenokortikotróp hormon

AGO: Argonaute

AML: Adrenalis myelolipoma

ANOVA: Analysis of Variance (variancia analízis)

APA: Aldosterone-producing adenoma (aldoszteron-termelő adenoma)

AUC: Area under curve (görbe alatti terület)

AVS: Adrenal venous sampling (szelektív mellékvesevéna katéterezés)

BAH: Bilaterális adrenális hyperplasia

BWS: Beckwith-Wiedemann-szindróma

CAH: Congenitalis adrenalis hyperplasia

cDNS: Komplementer DNS

Ct: Cycle threshold

CT: Computed tomography

DHEAS: Dehidroepiandroszteron-szulfát

DNS: Dexoxiribonukleinsav

EDP: Etopozid-doxorubicin-platina

EDTA: Etilén-diamin-tetraecetsav

EMH: Extra-medullary hematopoiesis (extramedulláris vérképzés)

ENSAT: European Network for the Study of Adrenal Tumors

EPO: Eritropoietin

ESE: European Society of Endocrinology

FDG: Fluorodeoxiglükóz

EV: Extracelluláris vezikula

FAP: Familiáris adenomatosus polyposis-szindróma

FC: Fold change

FFPE: Formalin-fixed paraffin embedded (formalinban fixált paraffinba ágyazott)

FH: Familiáris hyperaldosteronismus

GP-NET: Gastroenteropancreaticus neuroendokrin tumor

HDL: High-density lipoprotein

HU: Hounsfield Unit

KSZ: Katalógusszám

LAP: Lyophilized anterior pituitary (liofilizált elülső agyalapimirigy)

LI: Lateralizációs index

MEN1: Multiplex Endokrin Neoplasia szindróma 1-es típus

MRI: Magnetic Resonance Imaging (mágneses magrezonancia képalkotás)

miR, miRNS: mikroRNS

mRNS: Messenger, hírvivő RNS

NGS: Next-generation sequencing (újgenerációs szekvenálás)

NF1: Neurofibromatosis 1-es típus

Oncomir: Onkogén miRNS

PA: Primer aldosteronismus

PAC: Plazma aldosteron-koncentráció

PCOS: Policisztás ovarium szindróma

PET: Pozitronemissziós tomográfia

PRA: Plazma renin-aktivitás

PRC: Plazma renin-koncentráció

Pre-miRNS: Prekurzor miRNS

Pri-miRNS: Elsődleges miRNS

RISC: RNA-induced silencing complex

ROC: Receiver operating characteristic (hatásfokmérő karakterisztika)

TRBP: Transactivation-responsive RNA-binding protein

UAH: Unilateralis adrenalis hyperplasia

VIP: Vazoaktív intestinalis peptid

1. Bevezetés

1.1. A mellékvese daganatai

A mellékvese daganataira az esetek nagy részében véletlenszerűen (incidentaloma), mellékleletként figyelünk fel. Nagy többségük hormonálisan inaktív, mellékvesekéreg eredetű jóindulatú daganat, melyek beavatkozást legtöbbször nem igényelnek. Olykor azonban hormonális tüneteket eredményezve kerülnek felfedezésre: így az aldosteron-termelő adenoma (aldosterone-producing adenoma, APA) vagy kétoldali hyperplasia, ill. a Cushing-szindrómát okozó kortizol-termelő adenoma, illetve carcinoma. Sokkal ritkábban, nemi hormonok termelésével virilizációt is okozhatnak a betegnek. A teljes populációt vizsgálva megállapítható, hogy számos embert érint a mellékvesék daganatos betegsége. Fiatalkorúakban ritkán fordul elő mellékvesedaganat. A mellékvesekéreg-tumorok előfordulási aránya akár 3% is lehet a középkorú lakosságban, míg akár 10% is az idősebbek között [1, 2]. Nem csak a korosabb populációban gyakoribb az előfordulásuk, hanem az elhízott, cukorbeteg vagy magas vérnyomású betegeknél is [3]. Boncoláskor ez az arány még nagyobb is lehet [4]. A leggyakoribb incidentaloma a jóindulatú adenoma (55%), melynek több mint kétharmada hormonálisan inaktív. Ezután a kb. 10%-ot, illetve 8%-ot kitevő pheochromocytoma és myelolipoma fordul elő nagyobb arányban (**1. táblázat**).

1. táblázat: A mellékvese incidentalomák megoszlása*A táblázat Mansmann munkája alapján készült [4].*

Daganat típusa	Átlagos előfordulás (%)	Előfordulás min-max (%)
Adenoma	55	49-69
Carcinoma	11	1,2-12
Pheochromocytoma	10	11-23
Myelolipoma	8	7-15
Daganat áttét (metastasis)	7	0-21
Ciszta	5	4-22
Ganglioneuroma	4	0-8

Természetesen pontos adatok nem állnak rendelkezésre a mellékvese daganatait tekintve, ugyanis jelentős részük jóindulatú, illetve nem okoz panaszt a betegnek. Ha a daganat hormont termel, mértéke kiválthat klinikai tüneteket, de gyakran csak labortesztekkel kimutatható, szubklinikus hormontermelés figyelhető meg.

1.1.1. Mellékvesekéreg-rák**1.1.1.1. A mellékvesekéreg-rák etiológiája**

A mellékvesekéreg-rák (adrenocortical carcinoma, ACC) egy nagyon ritka betegség. Előfordulását nehéz mérni, de az irodalmi adatok alapján éves incidenciája 0,7-2 eset 1 milliós populációban [5, 6]. A daganat életkori megoszlásában két csúcs figyelhető meg (bimodális eloszlás). Az egyik csúcs gyermekkorban, az első évtizedben, míg a másik felnőttkorban, az ötödik, illetve a hatodik évtizedben [7, 8]. Brazíliában vizsgálták gyermekek körében, ahol kifejezetten magasabb incidenciáról (2,9-4,2:1.000.000) számoltak be. Ennek okát egy specifikus *TP53* csírarsejtes mutáció (R337H) magasabb

arányban való előfordulásával magyarázzák [9–12]. A teljes populációt tekintve, nők körében a daganat gyakrabban fordul elő, mint férfiakban (55-60:45-40) [13].

1.1.1.2. A mellékvesekéreg-rák klinikai megjelenése

A mellékvesekéreg-rákos betegek 40-60%-a hormonváltozások okozta tünetekről számol be elsőként [5, 14–16]. Magas kortizolszint (hypercortisolismus) az esetek majdnem felében (45%) megfigyelhető, mely súlynövekedést, gyengeséget, alvászavart, izomgyengeséget, diabetes mellitust, illetve hypokalaemiát okozhat. A Cushing-szindrómára jellemző tünetegyüttes azonban nem ritkán nem a klasszikus formában jelentkezik, hiszen az olykor nagyon gyors progresszió (3-6 hónap) nem teszi lehetővé a zsíreloszlási aránytalanságokat. A nagyon magas koncentrációjú kortizol aldoszteron-receptorhoz kötődése révén jelentkező aldoszteronhatás hypokalaemiát okozhat. 25%-ban androgének és kortizol együttes túlprodukciója okozhat keverten Cushing-szindrómát és virilizációt. Az esetek kevesebb, mint 10%-ban figyelhető meg csak virilizáció [8, 17]. A mellékvesekéreg-rák nagyon ritkán okoz primer aldosteronismust, melynek ismertetőjele a magas vérnyomás jellemzően alacsony káliumszinttel. A betegek egy kisebb része tünetmentes, illetve háti, hasi, deréktáji vagy ágyéki fájdalmat jelez, mint lokális tüneteket. Sztteroid metabolomikai vizsgálatok kimutatták, hogy még a klinikailag tüneteket nem okozó daganatok is termelnek glükokortikoidokat, ill. prekurzoraikat [18, 19].

1.1.1.3. Molekuláris eltérések mellékvesekéreg-rákban

Az ACC kialakulásában több genetikai eltérést azonosítottak az erre hajlamosító öröklődő szindrómák alapján. Ezt több megfigyelés is alátámasztja: gyermekek körében viszonylag gyakori az ACC [9]; egyéb tumorokkal együtt is megjelenik gyermekkorban [20]; felnőttkorban az ACC-hoz társuló rosszindulatú daganatok aránya a 10-20%-ot is elérheti [5, 21, 22]; mellékvesekéreg-rákos betegek kb. 2-10%-ában jelen van ellenkező oldali tumor is (szinkron vagy metakron) [6]. A gyermekkori esetek 50-80%-ában a már

említett csírasejtes *TP53* mutáció kimutatható, és ezzel a Li-Fraumeni-szindróma egyik legtipikusabb manifesztációja (további manifesztációk: sarcoma, choroid plexus tumor, agydaganat, korai emlődaganat, leukaemia, lymphoma).

ACC-ra egyéb öröklődő szindrómák is hajlamosítanak. A Beckwith-Wiedemann szindrómára (BWS) jellemző a 11p15 locus metilációja, így érintve az *IGF2* (aktiválás), *CDKN1C* (inaktiválás) és a *H19* (inaktiválás) géneket [23]. A BWS manifesztációi között szerepelnek még a Wilms tumor, a hepatoblastoma, macrosomia, mellékvesekéreg-adenoma (adrenocortical adenoma, ACA), mellékvese-ciszta, hemihypertrophia, macroglossia, omphalokele, preauricularis sinus/fistula. A BWS rosszindulatú daganatainak 5-15%-a ACC [24].

A multiplex endokrin neoplasia szindróma 1-es típusa (MEN1) is hajlamosíthat mellékvesekéreg-daganatra, bár itt döntően jóindulatú daganatok fordulnak elő. A MEN1 szindróma kialakulásáért a *MEN1* tumorszuppresszor gén inaktiváló mutációja felelős. Leggyakoribb manifesztációi a primer hyperparathyreosis, a gyomor-bélrendszer neuroendokrin tumorai (gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors; GP-NETs: insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, VIPoma), és az agyalapi mirigy elülső lebenyének tumorai. Az előzőekhez 20-55%-ban társulhat ACA, illetve egy- vagy kétoldali mellékvese-hyperplasia. ACC csupán az esetek kis részében társul [6, 25–29].

Lynch-szindrómás betegekben is előfordul, ami az ACC betegek kb. 3%-ánál figyelhető meg [30]. A Lynch-szindrómás betegekben a DNS-hibajavító enzimjeit kódoló gének mutációja jellemző, így a *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *MLH1* és *TACSD1/EPCAM*. További szindrómák, melyekben ACC előfordulhat: familiáris adenomatous poliposis, neurofibromatosis 1-es típusa (NF1), illetve Carney-komplex.

A csírasejtes mutációk mellett sporadikus előfordulású szomatikus mutációkat is leírtak ACC-ben. Leggyakrabban a *TP53* gén szomatikus mutációját találták, ritkábban *MEN1*, *IGF2*, *IGF2R*, *p16/INK4A (CDKN2A)*, *ZNRF3*, *PRKARIA*, *RPL22*, *TERF2*, *CCNE1* és az *NF1* gének mutációit is [31–36].

Az ACC kialakulásában a genomikai, multiomikai vizsgálatok alapján jelenleg elsődlegesnek tartott fő patogenetikai mechanizmusok az IGF-2, a Wnt/béta-katenin és a p53 jelátviteli utakat érintik [36–38].

1.1.1.4. A mellékvesekéreg-rák kezelése

A távoli áttéteket nem adó tumorok (ENSAT stage I-III) elsődleges kezelése a tumor teljes eltávolítása. A tumor teljes eltávolítása kiterjedt daganatoknál gyakran magával hordozza a kiterjesztett műtét szükségességét is. Így a mellékvesekéreggel együtt nem ritkán el kell távolítani a vesét, a máj kisebb-nagyobb részét, a lépet, a hasnyálmirigyet, a gyomrot, a vastagbelet vagy a v. cava falának egy részét is [39]. A túlélést alapvetően befolyásolja a daganat stádiuma, illetve az eltávolítás mértéke [15, 17, 40]. Ezekon kívül a szövettani jellegzetességek is jó mutatói lehetnek az ACC prognózisának. A mellékvesekéreg-rák szövettani vizsgálata mindazonáltal nehéz, nagy gyakorlatot igényel. A szövettani diagnózis általánosan használt alapja a Weiss-score vizsgálata. A Weiss-score az alábbi kilenc szempont szerint vizsgálja a szövettani képet: nukleáris grádus, mitotikus ráta, atípusos mitózisok, világos sejtes összetevők aránya, diffúz felépítés/architektúra, tumor nekrózis, vénás vagy sinusoidalis invázió, tumor tokjának áttörése. Ha a pontszám háromnál kevesebb, jóindulatú tumorról állunk szemben [41]. A mitotikus rátát értékeli a Ki-67 index, mely ugyancsak jó prognosztikai mutató [42, 43]. Az ACC gyógyszeres kezelésének alapját az adrenolitikus mitotán képezi (normál mellékvesében atrófiát és/vagy szteroidszintézis gátlást okoz), melyet egyedül vagy egyéb citotoxikus szerekkel [elsősorban EDP protokoll (etopozid-doxorubicin-platina)] kombinációban adnak. Az eddig kipróbált célzott kezelések (pl. IGF-2 gátlás) az esetek döntő részében kiábrándító eredményeket adtak [44].

1.1.2. Mellékvese myelolipoma

A mellékvese myelolipoma (adrenal myelolipoma, AML) egy kivétel nélkül jóindulatú daganat, amely zsírszövetből és vérképző elemekből áll. Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) legfrissebb besorolása szerint a mellékvese mesenchymalis és stromalis tumorai közé tartozik [45]. Annak ellenére, hogy jóindulatú tumor, klinikailag releváns, ugyanis olykor nehéz elkülöníteni a rosszindulatú mellékvesekéreg-ráktól. A mellékvese myelolipoma jellemzőit a PubMed

és Scopus adatbázisokban található részletesen leírt 420 myelolipoma eset és további 20 saját gondozású myelolipomás beteg adatainak feldolgozásával összesítettem.

1.1.2.1. A mellékvese myelolipoma etiológiája

A mellékvese myelolipoma általában incidentalomaként kerül felfedezésre, a képalkotó eljárások széleskörű elterjedésével egyre gyakrabban. A tumor jóindulatú és az esetek nagy részében tünetmentes, így pontos gyakoriságát felmérni nehéz feladat. Vélhető előfordulási arányukat boncolási statisztikák segítségével lehet megbecsülni. A mellékvese incidentalomák 60-70%-a mellékvesekéreg-adenoma, míg 6-16%-a myelolipoma. Így a második leggyakoribb a jóindulatú mellékvese-incidentalomák között [46–48]. A mellékvesekéreg mellett a test más részeiben is előfordulhat a daganat. Ezek összefoglaló neve: extra-adrenális myelolipoma. Myelolipomát többek között a mediastinumban [49], a lépben [50], a vesében [51], a csontokban [52], a mellkasban [53], az orrüregben [54], ectopiás mellékvesében [55, 56], a szemben [57], illetve peridurális térben [58] figyeltek meg eddig. A myelolipomás betegek többségénél nem figyelhető meg hormontermelés. Ha biokémiai tesztekkel mégis kimutatható, sok esetben valószínűleg egyidejűleg fennálló adenomatoid vagy hyperplasticus elváltozás tehető felelőssé.

1.1.2.2. A mellékvese myelolipoma patogeneze

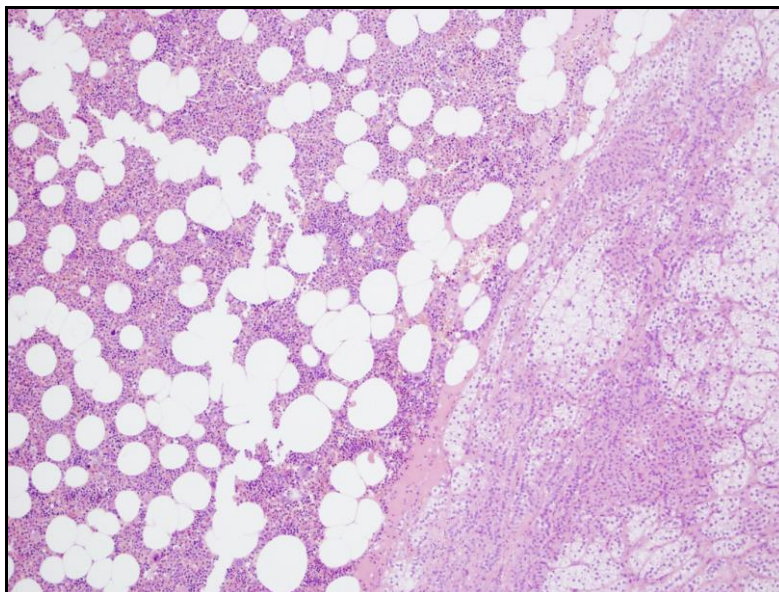
A myelolipomák érett zsírsejtekből és trilineáris hematopoietikus sejtekből állnak, így megképzésükig hasonlítanak az extramedulláris vérképzésre (extramedullary haematopoiesis, EMH). A magzati fejlődés során az extramedulláris vérképzés egy fiziológiás folyamat mindaddig, amíg a csontvelő vérképzésre alkalmassá nem válik. Ez főleg a májban és lépben figyelhető meg. Extramedulláris vérképzés a születés után már csak kóros esetekben fordul elő egyes betegségekhez kapcsolódóan. Így myeloproliferatív betegségekben (pl. myelofibrosis) vagy hemoglobinopathiákban (pl. thalassaemia) [59]. A hasonlóság ellenére, jelenlegi tudásunk szerint a myelolipoma és

az extramedulláris vérképzés két külön betegségnek számít nagyon hasonló megjelenéssel. Mindkettő elkülöníthető a csontvelőtől a reticularis sinusoidok hiánya miatt. A klinikai gyakorlatban a két betegség között a klinikai összkép alapján teszünk különbséget: extramedulláris vérképzés elsősorban hematológiai betegségek kísérőjeként figyelhető meg, míg a myelolipoma egy tumor egyidejűleg egészséges csontvelővel [60]. A myelolipomák a környezetüktől általában jól elkülöníthetők, gyakran rendelkeznek tokkal, zsírsejtekből és vérképző elemekből állnak. Az extramedulláris vérképzés általában nem körülhatárolt folyamat és a zsír nem kötelező alkotóeleme [61]. A myelolipoma keletkezésére eddig nem találtak széles körben elfogadott magyarázatot. Több hipotézist is alkottak korábban. Az egyik feltételezés szerint a kapillárisokban található reticuloendotheliális sejtek metaplasztikus átalakulása az elsődleges folyamat, mely megágyaz a myelolipoma kifejlődésének [61–63]. Egy közlemény felveti a myelolipoma patogenezisében egy kiegyensúlyozott transzlokáció (3;21)(q25;p11) szerepét, ám a betegségben betöltött szerepét nem tudja alátámasztani [64]. Egy másik feltételezés szerint a mellékvese myelolipoma két különböző progenitor sejt egymásra hatása miatt alakul ki. Elsőként bizonyos stimulációra a mellékvesekéreg állományában található zsír apró véredényeiben található mesenchymális őssejtekből alakul ki zsírszövet. Az érési folyamat közben gyulladásszerű reakció formálódik és ez stimulálja a mellékvesekérget, hogy olyan anyagokat termeljen, melyek hematopoietikus progenitor sejteket vonzanak a mellékvesekéregbe, amelyek később ott megtelepszenek és differenciálódnak [65]. További hipotézisek között megemlítendő még az, mely szerint klonális eredete lehet e tumoroknak. Ezt a vizsgált myelolipomák közötti gyakran előforduló non-random X-kromoszóma inaktivációnak tulajdonítják [66]. A myelolipoma keletkezésére vonatkozóan a hipotézisek második csoportja hormonális eredetet valószínűsít. Ezek egyik első úttörő kísérletezője a magyar származású Selye János volt. Megfigyelte, hogy a mellékvesekéregben extramedulláris vérképzés gyakran előfordul Addison-kórhoz kapcsolható vérszegénységben és hypercortisolismusban. A kutatásában patkányokat használt, melyeket csoportokra osztott és beoltotta azokat metiltesztoszteronnal, L-tiroxinnal vagy liofilizált elülső agyalapi miriggyel (liophilized anterior pituitary, LAP). A kísérlet 57. napján az állatok mellékveséjét eltávolította és megvizsgálta. Ekkor háromfajta megfigyelést tett: A) a metiltesztoszteron hatására a mellékvese sejtjei normális zsírsejtekre jellemző

tulajdonságokat mutattak; B) csak LAP-pal kezelt állatokban észrevehető hematopoiesis indult meg az állatok mellékvesekérgében; C) kombinált metiltesztoszteron és LAP kezelés hatására a teljes zona fasciculata és reticulata átalakult csontvelőre hasonlító szövetre [67]. Ez támaszthatja alá azt a klinikai megfigyelést, amely szerint kezeletlen vagy rosszul kezelt congenitalis adrenalis hyperplasiás (CAH) betegekben, akikben az adrenocorticotropin (ACTH) szintje magas, myelolipoma alakulhat ki. ACTH-termelő tüdőrákhoz asszociált myelolipomát is írtak már le [68]. Ennek az elméletnek bizonyítására egy vizsgálatban ACTH-receptor felülexpresszióját keresték egyidejűleg myelolipomás és CAH-os betegekben, de nem találtak megfelelő bizonyítékot [69]. Az ACTH mellett felvetették a krónikus vérszegénység miatti eritropoetin túlzott termelésének szerepét is [62, 70]. A hipotéziseket vizsgálva nem kizárt, hogy a hormonális mechanizmusok és a megváltozott működésű mesenchymális őssejtek együttesen alakítják ki a daganatot.

1.1.2.3. A mellékvese myelolipoma patológiai jellemzői

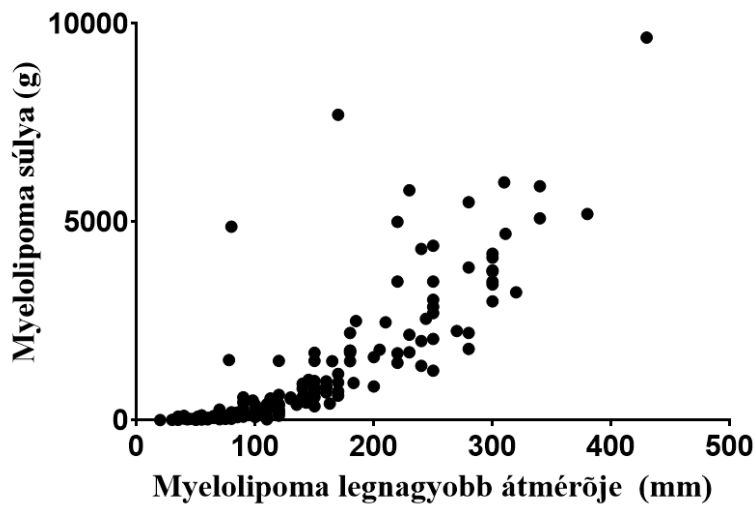
A myelolipomák az esetek többségében tokkal rendelkeznek. Az elvékonyodott zona glomerulosa és fasciculata által képzett áltok veszi sok esetben körbe a daganatot. A daganatok vágási felszíne többnyire sárga és vörösesbarna. A sárga megfelel a zsírszövetnek, míg utóbbi a hematopoietikus szövetre utal (**1. ábra**). Felfedezéskor változó méretűek lehetnek a daganatok. Néhány milliméteres, illetve 43 centiméteres daganatot is írtak már le. Az átlagos méret felfedezéskor 10,2 cm (e szám valószínűleg felülbecsüli a valós átlagot, ugyanis nagyobb valószínűséggel közölnek le egy óriás myelolipomát, mint egy kisebb méretűt). A 10 cm-nél nagyobbakat óriás myelolipomáknak nevezzük [62]. Jobb- és baloldali daganatok átlagos méretében különbséget nem találtunk (jobboldali: 10,2 cm; baloldali: 10,3 cm).



1. ábra: A myelolipoma szövettani képe

*A kép jobb oldalán az egészséges mellékvesekéreg látható, bal oldalán a myelolipomát alkotó zsírszövet és vérképző elemek. 100x nagyítás.
Illusztráció dr. Borka Katalin PhD (II. számú Patológiai Intézet, Általános Orvostudományi Kar, Semmelweis Egyetem) jóvoltából.*

A tumorok súlya természetesen függ a tumorok méretétől, a nagyobb tumorok esetén a súlyok szórása nagyobb, vélhetően a bevézések, illetve a zsírszövet és a hematopoietikus elemek változó aránya miatt (**2. ábra**).



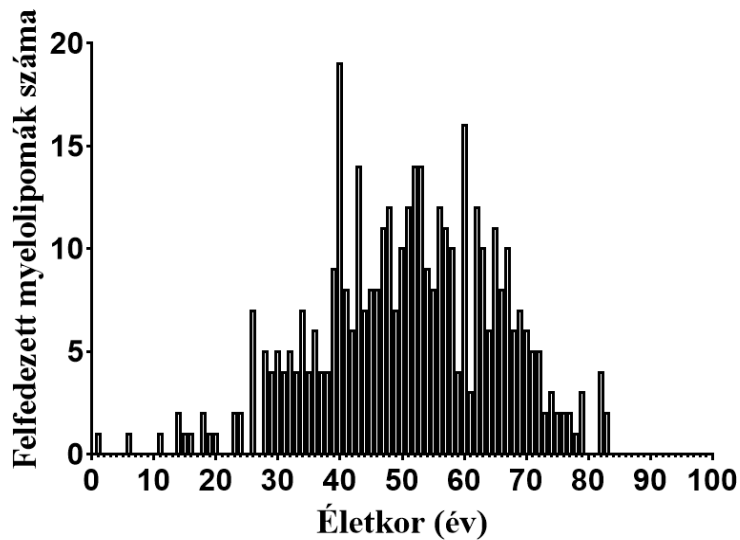
2. ábra: A myelolipomák súlya és mérete közötti összefüggés

A tumorok mérete és súlya között egyértelmű az összefüggés. Korrelációs együttható értéke $r=0,92$; $p<0,0001$. A korrelációt a Shapiro-Wilks normalitás vizsgálat alapján Spearman korrelációval vizsgáltam.

1.1.2.4. A myelolipoma klinikai megjelenése

A myelolipomák jellemző megjelenési ideje változó. Előfordult 1 éves gyermeknél [71], illetve 83 éves embernél is [72]. A myelolipomák klinikai diagnózisa jellemzően az ötödik és a hatodik évtizedben születik meg (**3. ábra**), melyet korábbi tanulmányok is megerősítenek [73, 74]. Férfiak és nők között ebben a tekintetben nincs különbség: férfiaknál átlagosan 50,84 év, nőknél 51,02 évesen történik a betegség felismerése. A betegség gyakoriságára vonatkozóan - ellentétben az irodalomban vázolt női túlsúllyal - megfigyeltük, hogy a betegek 48,6%-a nő és 51,4%-a férfi, mely arra enged következtetni, hogy nincs jelentős nemi különbség a betegség előfordulásában. A vizsgált tumorok 59,2%-a volt jobboldali, 25,3%-a baloldali és 12,3%-a kétoldali. Az arányok korábbi tanulmányokban is hasonlóképpen jelentek meg [45, 62, 75]. Ha a daganat mindkét oldalon megjelent, a baloldali tumorok átlagos mérete meghaladta a jobboldali tumorokét (bal: 10,9 cm; jobb: 9,3 cm), de ez a különbség nem volt

szignifikáns ($p = 0,25$). A myelolipoma méretéből és összetételéből adódóan hajlamos lehet retroperitonális vérzést okozó rupturára, mely akár hemorrhágiás sokkig is súlyosbodhat [76]. Az irodalomban közölt és általunk vizsgált myelolipomák 4,5%-a (20 eset) rupturált. Ezek nagy része 10 cm fölötti mérettel rendelkezett, míg a legkisebb 6,5 cm-es volt [72].



3. ábra: Myelolipoma diagnózis az életkor függvényében

A myelolipoma diagnózist leggyakrabban az ötödik, illetve a hatodik évtizedben állítják fel.

A tüneteket tekintve elsősorban a daganatméret okozta panaszok vezettek (**2. táblázat**). A leggyakoribb panaszok a hasi diszkomfort vagy fájdalom, hypochondriális fájdalom, lágyéktáji fájdalom és abdominális térfoglalás voltak. Gyakran a következő nem specifikus tünetek is megfigyelhetők voltak: dyspepsia, hányinger, hányás, súlyvesztés, alsó végtagi ödéma, paresztézia, paralízis.

2. táblázat: A myelolipomás betegek vezető panaszai

Az irodalmi közlésekben leírt 440 esetből 267-nél volt egyértelműen megadva a kivizsgálást elindító panasz

Vezető panasz	Betegek száma az adott panasszal	Százalékos arány
Abdominális diszkomfort/fájdalom	60	22,5
Hypochondriális fájdalom	37	13,9
Lágyéktáji fájdalom	37	13,9
Abdominális térfoglalás	14	5,2
Dyspepsia	13	4,9
Hányinger/hányás	12	4,5
Ágyéki fájdalom	11	4,1
Hirtelen hasi/lágyéktáji fájdalom	9	3,4
Intermittáló fájdalom	8	3,0
Alsó végtagi paresztézia, ödéma, paralízis	8	3,0
Epigasztriális fájdalom	6	2,2
Légzési nehezítettség	5	1,9
Háti fájdalom	4	1,5
Súlyvesztés	4	1,5
Láz	4	1,5
Mellkasi fájdalom	3	1,1
Virilizáció	1	0,4
„Húzó, vonzó” érzés (Dragging sensation)	1	0,4
Generalizált ödéma	1	0,4
Egyéb (3% alatt)	29	10,9
Összesen	267	100,0

A daganat növekedési ütemét több tanulmány is vizsgálta. Az egyik tanulmányban 69 myelolipomát vizsgáltak. Ebből 11 daganat a vizsgálati idő alatt méretben növekedett. Az utánkövetési idő mediánértéke 3,9 év volt, a számított daganat-növekedés mediánértéke 0,16 cm/év volt (min: 0,08 cm/év; max: 0,71 cm/év) [77]. Egy másik csoport vizsgálatában 12 beteg 13 daganatát nézték. A vizsgálati idő alatt 6 növekedett, 2 tumor mérete csökkent, míg 5 tumoré stagnált. A leggyorsabb növekedési ütem

5,5%/hónap volt (4,5 cm-ről 5,5 cm-re 4 hónap alatt). Az átlagos növekedési arány 0,64%/hónap volt [78].

A társuló betegségeket fel lehet osztani endokrin és nem endokrin kórképekre. A leginkább feltűnő társult betegség a congenitalis adrenális hyperplasia, amely 440 vizsgált betegből 44 esetében volt jelen (10%). Ezek közül 35 betegnél 21-hidroxiláz hiányt írtak le (6 sóvesztő, 13 egyszerű virilizáló, 3 nem klasszikus és 19 nem részletezett). A 17-alfa-hidroxiláz hiány fordult elő második leggyakrabban, míg a 11-béta-hidroxiláz hiány csak egy esetért volt felelős. A CAH-os betegek myelolipomái 51%-ban kétoldaliak voltak (18 eset), 34% baloldali és 14% jobboldali. Jelentősége lehet annak is, hogy több mint az esetek felében (26/44) a CAH rosszul kezelt vagy újonnan felfedezett volt. Myelolipomában néhány hormon fokozott termelését is leírták, így hypercortisolismus, hyperaldosteronismus, hyperandrogenismus is megfigyelhető volt (33, 9, illetve 4 esetben). A myelolipomás betegek hormontermelése a daganat eltávolítása után az összes esetben visszaszorult. Ez a tény nem azt bizonyítja, hogy a myelolipoma olykor termelhet hormonokat, hanem valószínűbbnek tűnik az a felvetés, miszerint egyes myelolipomák más, hormontermelő mellékvesekéreg elemekkel együtt jelennek meg. Hypogonadismus, primer hyperparathyreosis és pheochromocytoma által termelt katekolamin túlsúly is megfigyelhető volt két-két esetben. Egyéb endokrin kórképek – melyek asszociációja vélhetőleg csak véletlen egybeesés - is megfigyelhetők voltak egy-egy esetben: Carney-komplex [79], polycystás ovárium szindróma [80], multiplex endokrin neoplasia szindróma egyes típusa (MEN1) [81], Nelson-szindróma [82], papilláris pajzsmirigyrák [83], hyper- és hypothyreosis. 98 betegnél írtak le magasvérnyomás-betegséget és 41 beteg szenvedett 2-es típusú cukorbetegségben is. Nem endokrinológiai kórképet 56 betegben találtunk. 12 beteg (2,7%) thalassaemiában, 6 (1,3%) vesesejtes rákban, 3 prosztatatarákban szenvedett.

1.1.2.5. A myelolipoma kórisméje

A myelolipoma jóindulatú incidentaloma lévén legtöbbször a mellékvese-daganatok elkülönítő kórisméjében szerepel. Ultrahang (UH) felvételek általában egy körülírt, hyperechogén és heterogén tumornak írják le a myelolipomákat. Atípusos

jellegzetességek itt is gyakran láthatók. A myelolipoma ultrahangos képe sokszor nem diagnosztikus értékű. Elsősorban CT-vizsgálattal lehet felismerni a daganatot. A felvételeken jól körülírt, szabályos vagy szabálytalan gömb alakú, alacsony denzitású és heterogén térfoglalások. Diagnosztikus értékű a daganatban megjelenő, CT-vel is kimutatható zsír, mely -120 és -90 HU (Hounsfield Unit) közötti denzitás értékeket vesz fel. Az átlagos denzitás változó a myelolipoma változó összetétele miatt. Olykor atípusos bevérzést vagy kalcifikációt is meg lehet figyelni [62]. PET-CT felvételek a legtöbb esetben nem mutatnak FDG-felvételt, de előfordulhat, hogy a vérképző elemek változó aránya nyomán, a 18-fluorodeoxiglükóz felvétele mégis jelentős differenciáldiagnosztikai kihívást okoznak [84, 85]. Mágnesesrezonancia-képalkotással (MRI) vizsgálva, mind T1, mind T2 súlyozású képeken magas intenzitású a zsírszövet. Az MRI vizsgálat elemzésekor a zsírszuppresszió alkalmazásával is lehet segíteni a myelolipoma diagnózisát.

1.1.2.6. A myelolipoma kezelése

A myelolipoma kezelésére nincsenek széles körben elfogadott irányelvek, így minden esetet egyedileg kell megítélni. Sebészi eltávolítás az egyetlen terápiás megközelítés, amennyiben szükséges. Az Európai Endokrin Társaság (ESE) legfrissebb ajánlása szerint a 4 cm-nél kisebb incidentalomákat, melyek képalkotó vizsgálattal egyértelműen jóindulatúnak tűnnek (<10 HU), nem szükséges követni [86]. A myelolipomák azonban általában nagyobbak, de lassabban növekednek. A diagnózis felállítása után a daganat követése – irányelv híján – egyedi mérlegeléssel, tapasztalati úton történik. Méret alapján meghatározott elv nem létezik, ugyanakkor az óriás myelolipomák (>10 cm) követése ajánlott, mely célból hasi ultrahang vizsgálat elegendő. Sebészi terápia akkor jön szóba, ha ezt szignifikáns növekedés, tünetek (pl. hasi fájdalom, diszkomfort) vagy társuló hormonális aktivitás indokolja.

1.1.3. Mellékvesekéreg-adenoma

A mellékvesekéreg-adenoma a mellékvese leggyakoribb jóindulatú daganata. A termelt hormonoktól függően, hypercortisolismust, hyperaldosteronismust, virilizációt vagy nagyon ritkán feminizációt okozhat. Hormontermelés azonban csak az esetek kevesebb, mint egyharmadában figyelhető meg [87]. A hormontermelő adenomák körében leggyakrabban a kortizol-termelés fordul elő. A kortizol szekréciójának mértékétől függően klinikailag tünetet nem okozó vagy nyilvánvaló Cushing-szindrómát okoz. Kisméretű (általában 4 cm-nél kisebb) daganat lévén, legtöbbször véletlen leletként kerül felfedezésre. A mellékvesekéreg-adenomák általában monoklonális eredetűek [88].

1.1.3.1. Primer aldosteronismus

A primer aldosteronismus (PA) az aldoszteron autonóm túltermelését jelenti, mely magasvérnyomás betegséget okoz. Az összes magasvérnyomás beteg kb. 5-13%-át érintheti ez a betegség [89–91], és ezzel a szekunder endokrin hipertonia leggyakoribb okát képezi. Az arányt ismerve, ha a magasvérnyomás betegek valós számát tekintjük, ez a betegség extrém mértékben alul diagnosztizált. A PA klinikai megjelenésében már említett magas vérnyomáshoz változó súlyosságú hypokalaemia is társulhat, de ez az újabb adatok szerint nem feltétele a diagnózisnak. A PA-t két fő betegség okozza: a bilaterális adrenális hyperplasia (BAH) és az egyoldali aldoszteron-termelő adenoma (APA). Előbbi az összes PA eset 60-70%-áért, míg utóbbi 30-40%-ért felel [92]. További, sokkal ritkábban előforduló kórformák az unilaterális adrenális hyperplasia (melyet a zona glomerulosa micro- vagy macronoduláris hyperplasiája okoz), a familiáris hyperaldosteronismus (FH) I-IV típusai és az aldoszteron-termelő mellékvesekéreg-rák. A FH I-es típusára jellemző, hogy az aldoszteron szintetizálása függ az ACTH-tól, melyet glükokortikoid adásával lehet kontrollálni. A *CYP11B1/CYP11B2* kimérágén tehető felelőssé a betegség kialakulásáért. A FH II-es típusára jellemző genetikai eltérést eddig nem azonosítottak. A FH III-as típusában csírasejtes *KCNJ5* (Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 5) mutáció

figyelhető meg, míg a FH IV-es típusában a *CACNA1D* (Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha 1D) gén csírasejtes mutációja okozza a betegséget [93]. A gének - melyek csírasejtes mutációit leírták - szomatikus mutációja sporadikus APA-t is okozhat. Előbbiek és más gének szomatikus mutációi együtt felelősek a sporadikus APA-k kb. 50%-áért [94–98]. Az APA-k 34-47%-ában írták le a *KCNJ5* gén (Gly151Arg vagy Leu168Arg) mutációját [99–103]. Kisebb arányban felelősek az *ATP1A1* (ATPase Na⁺/K⁺ transporting Subunit Alpha 1), az *ATP2B3* (ATPase Plasma Membrane Ca⁺⁺ Transporting 3), a *CACNA1D* és a *CTNNB1* (Catenin Beta 1) gének szomatikus mutációi [104, 105]. Ezzel ellentétben, a BAH kóréredete lényegében ismeretlen, mely összefügg azzal, hogy a kétoldali hyperplasiát elsődlegesen gyógyszeresen kezeljük, így eltávolított szövetminta korlátozott mértékben áll rendelkezésre. A mellékvese angiotenzin II iránti túlzott érzékenységet korábban leírták BAH-ban, de ennek döntő patogenetikai jelentősége ellen szól, hogy a hyperaldosteronismust az angiotenzin II hatásának kizárólagos gátlásával nem lehet kezelni [106].

A két betegség klinikai képében minimális eltérés mutatkozik. APA betegek hypertensiója és hypokalaemiája általában súlyosabb, mint BAH betegeknél. E megfigyelések természetesen nem elegendőek ahhoz, hogy a két betegséget egy adott betegben nagy biztonsággal elkülönítsük egymástól. A betegség klasszikus manifesztációjának tartották sokáig a hypokalaemiát, mely becslések szerint a betegek kb. 9-37%-ára jellemző csupán [107, 108]. Újabban a betegség súlyos hypokalaemia nélküli manifesztációit is sokkal gyakrabban diagnosztizálják az aldosteron/renin arány (ARR) konzekvensebb használata miatt. [90, 92, 108, 109]. APA-ban szenvedő betegekben genotípus-fenotípus összefüggést is megfigyeltek. *KCNJ5* mutáció gyakoribb nőkben, mint férfiakban, illetve nagyobbra nőnek a daganatok, mint a szomatikus mutáció nélküli APA esetekben [99, 102]. *ATP1A1* vagy *ATP2B3* mutációt férfiaknál gyakrabban találtak, és mutáció-negatív esetekhez viszonyítva alacsonyabb plazma káliumszinttel és magasabb plazma aldosteron-koncentrációval rendelkeznek [104]. *CACNA1D* mutációt hordozó betegek általában idősebbek és kisebb méretű tumoraik vannak, mint a *KCNJ5* mutációt hordozóknak [96].

Az APA és a BAH terápiája különböző. Az adenomák kezelése sebészi mellékveseltávolítás, míg a BAH kezelése – a betegség kétoldalisága miatt – mineralokortikoid antagonistá adásával történik. Így természetesen elkülönítésük döntő fontosságú.

1.2. Differenciál diagnosztikai kihívások

1.2.1. A mellékvese daganatainak elkülönítése

A mellékvese daganatainak elkülönítése legtöbbször a mellékvese incidentaloma elkülönítő kórisméjét jelenti. A legfőbb kérdés az, hogy az adott daganat jó- vagy rosszindulatú. Természetesen e mellett felmérendő a daganat funkcionalitása, azaz a hormontermelés megléte.

A rosszindulatúság megítélésére az Európai Endokrin Társaság (European Society of Endocrinology, ESE) és az Európai Hálózat a Mellékvese Tumorok Kutatásáért (European Network for the Study of Adrenal Tumors, ENSAT) alapelveket fogalmazott meg, amelyek elsősorban a képalkotó vizsgálatok eredményein alapulnak. A daganat jóindulatúságára utal, ha nem kontrasztos CT-felvételen homogén és lipidben gazdag a daganat. Ha a CT-felvételen jóindulatúnak (<10 HU) tűnik, és 4 cm-nél kisebb a daganat, további képalkotó vizsgálatot nem javasolnak. Ha nem egyértelmű az előbbi képalkotó eljárás, három további lehetőséget ajánlanak: másik képalkotó eljárás használata, 6-12 hónap elteltével ismételt képalkotó vizsgálat vagy azonnali műtéti beavatkozás. A mellékvese biopsziáját sem javasolják a szövettani vizsgálat nehézsége, illetve a rosszindulatú daganat terjedésének lehetősége miatt [86]. Jelenleg nem ismert olyan vérből meghatározható marker, ami a daganatok jó- vagy rosszindulatúságát megbízhatóan jelezné.

Ígéretes kutatások folynak ugyanakkor a vizelet szteroid metabolomika terén, ahol a szteroid metabolitok vizsgálata a mellékvesekéreg daganatok jó- vagy rosszindulatúságának jelzésére alkalmasnak tűnik, de ez a technika csak korlátozottan érhető el [19].

1.2.2. A primer aldosteronismus diagnózisa és differenciál-diagnosztikája

A primer aldosteronismus két leggyakoribb kórformájának elkülönítése nagyon fontos, mert kezelésük alapvetően eltér egymástól. Magához a primer aldosteronismus gyanújának felállításához először szűrővizsgálatot szükséges végezni. Ehhez a plazma renin aktivitás (PRA) vagy koncentráció (PRC) szuppresszált voltát és a plazma aldosteron-koncentráció (PAC) jelentős emelkedését keressük, és az aldosteron/renin arányt használjuk. Ha a PAC/PRA arány nagyobb, mint 20-25 (függően a laborban használt referenciaértékektől) és a reggeli fekvő helyzetben levett aldosteron érték is nagyobb, mint 20 ng/dl, a diagnózis valószínű [110]. A szűrővizsgálat után konfirmációs teszt elvégzése szükséges (pl. sóinfúzió, orálisan végzett sóterhelés, fludrokortizon teszt) a primer aldosteronismus diagnózisának felállításához [92, 111]. Saját gyakorlatunkban elsősorban a sóinfúziót alkalmazzuk, amelynek során primer aldosteronismus esetén az aldosteron-koncentráció nem csökken centrumtól függően 5-7 ng/dl alá.

Az APA és BAH elkülönítéséhez képalkotó vizsgálatok (CT, MRI), ill. legmegbízhatóbban a szelektív mellékvesevéna-katéterezés (AVS) használható. Mellékvese CT és AVS együttes alkalmazásával a legtöbb esetben elkülöníthető egymástól a két betegség. Ha 4 cm-nél nagyobb a daganat, malignus daganat irányában is indokolt vizsgálandó. Ha a mellékvesék mindkét oldalon kiszélesedtek, BAH valószínű. Ha egyik oldalon normális morfológiájú a mellékvese, másik oldalon szoliter, hipodenz adenoma látszik fiatal betegben, APA a valószínűbb [112, 113]. Az AVS metodikája mindazonáltal nem egységes, a vizsgálat sajnos nem általánosan elérhető és nagy gyakorlatot igényel, különösen a baloldali v. renalisba beszájadzó bal v. suprarenalis kanülálása terén. Egyes ajánlások alapján kosztropin (ACTH) stimuláció szükséges, más ajánlások szerint viszont nem szükséges [114–116]. A jobb és bal mellékvesevéna, illetve a vena cava inferior (VCI) területén szükséges aldosteron- és kortizol-koncentrációt mérni. Sikeresnek minősítünk egy katéterezést, ha a mellékvesevéna kortizol-koncentrációja legalább háromszorosa a VCI-ben mértnek [117]. A nemrégiben publikált, de vitatott SPARTACUS vizsgálat a CT és AVS megbízhatóságát vizsgálta a primer aldosteronismus differenciál-diagnosztikájában. Az

AVS megbízhatóságát magasabbra értékelték a képalkotó vizsgálatoknál, ám megkérdőjelezték arany standard módszerként való alkalmazását [118].

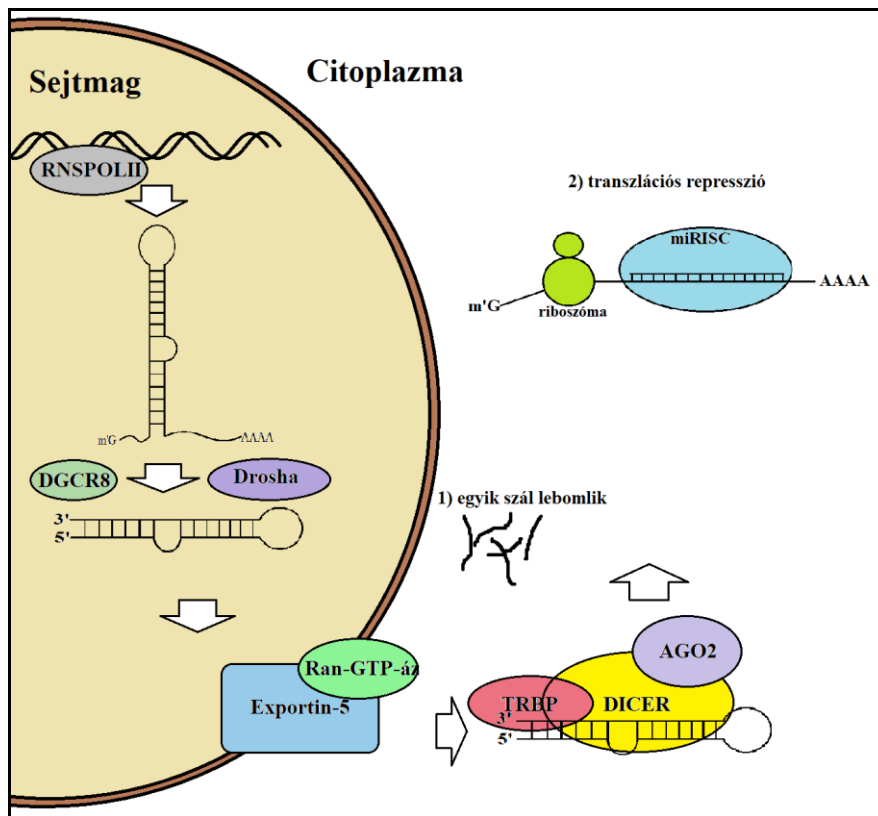
1.3. A mikroRNS-ek

A mikroRNS-ek (miR, miRNS) rövid – 19-25 nukleotid hosszúságú – érett formájukban egyszálú, nem fehérje-kódoló RNS-molekulák, melyek a génexpressziót főként poszttranszkripcionális szinten befolyásolják. A mikroRNS-ek az RNS-interferencia endogén mediátorai. Tekintettel arra, hogy génexpresszió szabályozása keretében a DNS nukleotidsorrendjében módosítást nem hajtanak végre, az epigenetikus szabályozás részei. Több, mint 2500 miRNS gén található a humán genomban (A miRBase 22-es verziójában 2019. március 19-én 2654 miRNS szerepel), melyek képesek befolyásolni a fehérjét kódoló gének akár felét is (30-60%) [119]. A mikroRNS gének az Y-kromoszóma kivételével az összes kromoszómán megtalálhatóak. A mikroRNS gének megtalálhatók fehérjét kódoló régiókban, de 90%-uk fehérjét nem kódoló szakaszon helyezkedik el [120].

1.3.1. A mikroRNS-ek bioszintézise

Az intragénikus mikroRNS-ek átírását az RNS-polimeráz-II végzi (**4. ábra**), míg az intergénikus mikroRNS-ek átírását az RNS-polimeráz III [121]. Így keletkeznek az elsődleges, hosszú mikroRNS-ek (pri-miRNS) a sejtmagban. A mikroRNS-ek transzkripcióját szabályozzák serkentő és csendesítő elemek, kromatin módosulások és transzkripciós faktorok is, melyek fejlődés- és szövetspecifikusak. Több útvonala is ismert az érési folyamatnak, de a legáltalánosabb a kanonikus útvonal. A pri-miRNS-t a Drosha (egy RNáz) és a DGCR8 (DiGeorge syndrome critical/chromosomal region 8) kofaktor alkotta mikroprocesszor komplex hasítja egy kb. 70-100 nukleotidból álló, kettős láncú, hajtűszerű prekursor miRNS-sé (pre-miRNS). A pre-miRNS a sejtmagból a citoplazmába a Ran GTP-áz függő Exportin-5 fehérje segítségével jut ki. A pre-miRNS-t ezután az RN-áz funkciójú Dicer enzim alakítja duplaszálú miRNS-sé. Ebben

a duplaszálú miRNS-ben megtalálható az érett miRNS (általában miR-5p) és a komplementer szál, melyet miR* vagy miR-3p-nek nevezünk. A komplementer szál általában lebomlik, de olykor funkcionalitással bíró miRNS marad belőle. A citoplazmában a RISC (RNA-induced silencing protein), helikázaktivitással rendelkező komplex részévé válik a TRBP (transactivation-responsive RNA-binding protein), a Dicer és az AGO2 (Argonaute-2) fehérjékkel együtt. E komplex segítségével keletkezik és egyben stabilizálódik az egyszálú miRNS, mely mRNS-hez (messenger RNS) kötődni képes [122].



4. ábra: Az érett miRNS keletkezése

A miRNS nem szabadon, hanem a miRISC részeként gátolja a transzlációt. AGO2: Argonaute-2; DGCR8: DiGeorge syndrome critical / chromosomal region 8; miRISC: RNA-induced silencing complex; RNAPOLII: RNS-polimeráz II; TRBP: transactivation-responsive RNA-binding protein

1.3.2. A miRNS-ek biológiai hatásai

A miRNS-ek fő funkciója a mRNS-ek specifikus kötése a citoplazmában, így a géneexpresszió poszttranszkripcionális szabályozásának résztvevői. Az érett, egyszálú miRNS – a RISC részeként – kötődik a cél mRNS 3' át nem íródó szakaszához (3' UTR). A géneexpresszió szabályozásában általában szuppresszív szerepet töltenek be, de a géneexpressziót közvetlen vagy közvetett módon is elősegíthetik [119, 123]. Teljes komplementaritás esetén az mRNS degradációja következik be, mely elsősorban a növényeknél figyelhető meg. Állatokra részleges komplementaritás jellemző, ekkor a transzláció gátlódik [124]. Utóbbi esetén a transzláció három lépése is érintett lehet: pretranszlációs, kotranszlációs vagy posztiniciációs [119, 121, 125, 126]. Egy miRNS-szekvencia a genom eltérő helyeiről is kifejeződhet, illetve egy mRNS-t akár többszáz miRNS is célba vehet. Emiatt a miRNS-ekre jellemző a redundancia. A miRNS-ek pleiotróp tulajdonsága, hogy egy miRNS akár többszáz mRNS-sel is kapcsolatba léphet [127–130]. A miRNS-ek nem csak a citoplazmában céloznak mRNS-eket, hanem a sejtmagban is kifejthetnek hatást, mely befolyásolhatja a génkifejeződést. Közvetlen hatásuk lehet a transzkripcióra, hiszton aktivitásra vagy a kromatin remodelingre is [119]. A miRNS-ek szövetspecifikus kifejeződésének nagy jelentősége lehet a klinikai gyakorlatban, hiszen biomarkerként való alkalmazásuk alapjául szolgál.

A miRNS-ek olyan alapvető folyamatokban játszanak bizonyítottan szerepet a szabályozáson keresztül, mint a sejtciklus, a sejt differenciálódás, sejtprolifráció, egyedfejlődés, sejthalál, stresszválasz, vérvérvétel vagy az immunrendszer fejlődése és szabályozása [131, 132]. Kóros kifejeződésük kóros elváltozásokat okozhat. Különböző gyulladások, autoimmun folyamatok, vascularis betegségek, illetve daganatok patogenezisében is szerepet játszhatnak [122, 133]. A miRNS-eket tumorképződésben betöltött szerepük szerint két csoportra lehet osztani: tumorsuppresszorok és onkogének. Onkogén miRNS-ek (oncomiR) azok, melyek elősegítik a proliferációt, az érújdonképződést és/vagy csökkentik a tumorsuppresszor miRNS-ek szintjét. Míg azok, melyek elősegítik a differenciációt és sejthalált, tumorsuppresszor miRNS-ek. Daganatokban az onkogének általában felülexpresszáltak, míg a tumorsuppresszorok alulexpresszáltak. A miRNS-ek szövetspecifitása miatt azonban előfordulhat, hogy egyes miRNS-ek az egyik szövetben onkogének, míg másik szövetben

tumorszuppresszorok [134]. Példa lehet erre a *miR-29a*, mely krónikus limfocitás leukémiában tumorszuppresszor, míg emlőrákban onkogén [135]. Hasonlóan, a *miR-503* felülexpresszált mellékvesekéreg-rákban, míg alulexpresszált agyalapimirigy tumorokban [136, 137].

A szöveti miRNS-ek mind diagnosztikus, mind prognosztikus relevanciája magas, szövetspecifitásuk révén hasznosíthatók. Stabilitásuk nyomán, formalinban fixált paraffinba (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) ágyazott minták miRNS expressziós mintázata is meghatározható [138]. Szöveti mintavételből vagy eltávolított tumorszövetből való meghatározásuk is segíthet egyes betegségek diagnózisában [139–141]. 2008-ban Mitchell és mtsai, majd 2010-ben Weber és mtsai. kimutatták, hogy miRNS-ek nem csak szövetekben, hanem különböző testfolyadékokban is megtalálhatók. Ugyan különböző koncentrációban, de jelen vannak a vérben, az anyatejben, nyálban, ondóban, bronchiális váladékban, könnyben, peritoneális nedvben, székletben, illetve vizeletben is. Az anyatej miRNS-koncentrációja a legmagasabb (10^5 $\mu\text{g/l}$), míg a vizelet miRNS-koncentrációja a legalacsonyabb (10^2 $\mu\text{g/l}$) [142, 143].

1.3.3. Az extracelluláris miRNS-ek

A sejtekből a miRNS-ek három fő úton kerülhetnek ki: 1) gyulladás vagy nekrosis következtében kialakuló sejtszétválás következményeként passzív kiáramlással, 2) extracelluláris vezikulák (EV) aktív szekréciója révén, 3) makromolekuláris komplexek (AGO vagy lipoprotein, általában HDL komplexek) részeként ugyancsak aktív szekrécióval. A vérben található miRNS-eket keringő miRNS-eknek hívjuk. A vérben levő miRNS-ek két szempontból kerültek a tudományos érdeklődés látóterébe. Egyrészt azért, mert a vér könnyen hozzáférhető, biomarkerként való használatuk a diagnosztikában és a betegségek követésében is jelentős lehet. A mai napig számos különböző betegségnek írták le megváltozott keringő miRNS expressziós mintázatát. Csak példákat kiragadva - a teljesség igénye nélkül – májkárosodáskor, cukorbetegségben, szívizom sérülésekor, harántcsíkolt izom sérülésekor, különböző daganatokban [143–149]. Másrészt, ha a miRNS-ek szelektíven szekretálódnak és sejten kívül is stabilak, akkor jogos a felvetés, miszerint akár a sejt-sejt kommunikációban is

szerepet játszhatnak. E gondolatmenetet tovább folytatva felmerül, hogy a miRNS-eknek akár szöveteket befolyásoló, hormonszerű hatásuk is lehet.

A keringő miRNS-eken kívül nagy tudományos érdeklődés övezi a vizeletben található – noha kis koncentrációban jelenlevő – miRNS-eket is. A keringő miRNS-ektől eltérően nem csupán minimálisan invazív, hanem non-invazív biomarkerként is használhatók lehetnének ily módon a miRNS-ek. Számos tanulmány mutatta be, hogy egyes urológiai és nefrológiai betegségben potenciális biomarkerként lehet alkalmazni a vizelet miRNS-eket [150]. Sőt, egyéb, nem húgyivarszervi betegségekben is kimutattak vizelet miRNS expressziós eltéréseket. Szignifikánsan eltérő miRNS szinteket találtak többek között myocardialis infarktusban [151–153], cukorbetegségben [154, 155] és különféle tumorokban is (gyomor, hepatocelluláris carcinoma, petefészek-rák) [156–160]. Plazma és vizelet miRNS közötti korrelációt is megfigyeltek ezek közül egyes tanulmányokban [156, 158].

A miRNS-ek a kikerülés módjának megfelelően keringhetnek extracelluláris vezikulumokban, illetve makromolekuláris komplexek részeként. Először az extracelluláris vezikulákban megtalálható miRNS-eket írták le exoszómákban és mikrovezikulákban. Ezek egy módját jelentik a miRNS-ek vérben való stabilizálásának [161]. Később ezt több tanulmány is kiegészítette azzal, hogy a vérben keringő miRNS-ek csak 5-10%-a lehet az, amely EV-ban található. 90-95%-a a keringő miRNS-eknek azonban makromolekuláris komplexek része. Először az AGO fehérjével alkotott komplexeket írták le, később fedezték fel a HDL-lel alkotott komplexet is [162–165].

Mindezeket figyelembe véve, a miRNS-ek extracelluláris térben való stabilitása és szövetspecifitása potenciálisan alkalmassá teheti őket arra, hogy biomarkerként hasznosítsuk őket a diagnosztikában vagy betegségek követésében.

1.3.4. miRNS-ek a mellékvesekéreg-daganatok diagnosztikájában

A mellékvesekéreg-daganatok miRNS expressziós mintázatát először szöveti mintákon vizsgálták. Jóindulatú adenomák, mellékvesekéreg-rák és normális mellékvesekéreg minták összehasonlítása során 3-3 szignifikáns felül-, illetve alulexpresszáldott

miRNS-t írt le kutatócsoportunk. Mellékvesekéreg-rákban felülexpresszáldott a *miR-503*, a *miR-184* és a *miR-210*, míg alulexpresszáldott a *miR-214*, a *miR-511* és a *miR-375* (**3. táblázat**) [136]. A *miR-483-5p* szignifikáns szöveti felülexpresszióját mellékvesekéreg-rákban először Soon és munkatársai írták le [166]. A következő években hasonló vizsgálatokat több kutatócsoport is végzett. A tanulmányok legtöbb esetben megmutatták, hogy mellékvesekéreg-rákban a *miR-483-3p*, *miR-483-5p*, *miR-210* és a *miR-503* felülexpresszáldik mellékvesekéreg-adenomához és/vagy normális mellékvesekéreghez képest, illetve a *miR-195* és a *miR-335* szignifikánsan alulexpresszált adenomához és/vagy normális mellékvesekéreghez képest [35, 167–173]. A kutatócsoportunk által leírt *miR-511* és *miR-503* kifejeződésének különbsége, mint lehetséges marker a mellékvesekéreg-rákot és mellékvesekéreg-adenomát 100%-os szenzitivitással és 97%-os specificitással különítette el [136].

Tekintettel arra, hogy a mellékvesekéreg-daganatok szövettani vizsgálata nehéz, a szöveti miRNS markerek vizsgálata a szövettani vizsgálatok hasznos kiegészítője lehet a jövőben.

3. táblázat: A mellékvesekéreg-rákban leírt miRNS mintázatbeli eltérések

ACA = adrenocorticalis adenoma; *ACC* = adrenocorticalis carcinoma; *CPA* = cortisol-producing adenoma (kortizol-termelő adenoma); *EV* = extracelluláris vezikula; *NA* = normal adrenal (mellékvesekéreg)

Szerző	Minta	Kontroll	Felülexpresszáldott miRNS-ek	Alulexpresszáldott miRNS-ek
Tömböl és mtsai, 2009 [136]	szövet	NA, CPA	<i>miR-503</i> , <i>miR-184</i> , <i>miR-210</i>	<i>miR-214</i> , <i>miR-511</i> , <i>miR-375</i>
Soon és mtsai, 2009 [166]	szövet	ACA, NA	<i>miR-483-5p</i>	<i>miR-335</i> , <i>miR-195</i>
Patterson és mtsai, 2011 [167]	szövet	ACA, NA	<i>miR-483-5p</i>	<i>miR-100</i> , <i>miR-125b</i> , <i>miR-195</i>

Szerző	Minta	Kontroll	Felülexpresszáldott miRNS-ek	Alulexpresszáldott miRNS-ek
Özata és mtsai, 2011 [168]	szövet	ACA	<i>miR-483-3p, miR-483-5p, miR-210</i>	<i>miR-497, miR-195, miR-1974</i>
Schmitz és mtsai, 2011 [169]	szövet	ACA, NA		<i>miR-139-3p, miR-675, miR-335</i>
Assie és mtsai, 2013 [174]	szövet	NA	<i>miR-483-3p, miR-483-5p, miR-210, miR-503</i>	<i>miR-195, miR-335</i>
Duregon és mtsai, 2014 [170]	szövet	ACA	<i>miR-483-3p, miR-483-5p, miR-210</i>	<i>miR-195</i>
Feinmesser és mtsai, 2015 [171]	szövet	ACA	<i>miR-483-3p, miR-483-5p, miR-10b, miR-513-5p</i>	<i>miR-34a, miR-214, miR-99a, miR-497, miR-125b, miR-195, miR-30c</i>
Gara és mtsai, 2015 [172]	szövet	ACA, NA	<i>miR-9, miR-25, miR-124, miR-183, miR-185, miR-206</i>	
Koperski és mtsai, 2017 [173]	szövet	ACA, NA	<i>miR-483-3p, miR-483-5p, miR-210</i>	
Chabre és mtsai, 2013 [174]	szérum	ACA, NA	<i>miR-483-5p</i>	<i>miR-195, miR-335</i>
Szabó és mtsai, 2013 [175]	plazma	ACA	<i>miR-100, miR-181b, miR-184, miR-210, miR-483-5p</i>	<i>miR-195</i>
Patel és mtsai, 2013 [176]	szérum	ACA	<i>miR-34a, miR-483-5p</i>	
Perge és mtsai, 2017 [177]	plazma EV	ACA	<i>miR-101, miR-483-5p</i>	

A keringő miRNS-ek, mint minimálisan invazív biomarkerek játszhatnak szerepet a mellékvesekéreg-daganatok diagnosztikájában. A korábban leírt szöveti miRNS

expressziós mintázatok alapot és segítséget nyújtanak a minimálisan invazív markerek megtalálásához. Mellékvesekéreg-rákra jellemző miRNS-eket eddig összesen négy tanulmány vizsgált, melyből kettő kutatócsoportunkhoz köthető. Chabre és mtsai a *miR-483-5p* fokozott, míg a *miR-195* és *miR-335* csökkent kifejeződését találták ACC-ben ACA-hoz képest. A *miR-483-5p* szintjében különbséget találtak, mikor összehasonlították az agresszív, gyorsan progrediáló daganatokat a nem agresszív viselkedésűekkel [174]. Patel és mtsai a *miR-34a* szintjét – a szövetben megfigyelttől eltérően – szignifikánsan magasabbnak találták ACC-ben adenomákhoz képest [176]. Vannak adatok arra, hogy a szöveti és a keringő miRNS-ek szabályozása nem feltétlenül párhuzamos, és a mikroRNS-ek szekrúciójának molekuláris szabályozása még alig ismert [178]. Kutatócsoportunk két különböző tanulmányban is közölte eredményeit. Plazmamintákat vizsgálva azt találtuk, hogy a *miR-100* és a *miR-181b*, ha egyszerre felülexpresszáltak, 78%-os szenzitivitással és 100%-os specificitással különítik el az ACC-eket az ACA-któl [175]. Egy következő tanulmányban, tudomásunk szerint kutatócsoportunk vizsgálta először az extracelluláris vezikulum eredetű miRNS-ek kifejeződését mellékvesekéreg-daganatokban. A már korábban több alkalommal leírt, exoszomális *miR-483-5p* és a mellékvesekéreg-rák tekintetében eddig ismeretlen *miR-101* szignifikánsan magasabb szintjét mutattuk ki ACC-ben ACA-hoz képest [177]. Kutatócsoportunk vizsgálta a kortizol-termelő mellékvesekéreg-daganatok exoszomális miRNS-mintázatát is. Azt találtuk, hogy a *miR-22-3p*, *miR-27a*, *miR-320b* és a *miR-210-3p* szignifikánsan magasabb kifejeződésű a kortizol-termelő ACC-ben, mint a nem funkcionáló adenomákban. A *miR-22-3p*, a *miR-27a-3p* és a *miR-320b* szignifikánsan magasabb szintje volt megfigyelhető a kortizol-termelő adenomákban nem funkcionáló adenomákhoz képest is [179].

A mellékvesekéreg-rák kezelési hatékonyságának követésére is alkalmasak lehetnek a keringő miRNS-ek. Kutatócsoportunk egér-xenograftmodellben vizsgálta a keringő miRNS-ek és a mellékvesekéreg-rák kezelésének kapcsolatát. A *miR-483-5p* csökkenését figyeltük meg 9-cisz-retinsavval kezelt NCI-H295R mellékvesekéreg-rák-sejtvonallal létrehozott xenograftmodellen [180]. Emberben műtét utáni a miRNS expressziós csökkenését írták le két alkalommal is, melyet tovább vizsgálva potenciálisan jó prognosztikai marker is lehet [174, 181].

Primer aldosteronismust okozó aldosteron-termelő adenoma és bilaterális adrenális hyperplasia szöveti miRNS mintázatát eddig egyetlen tanulmány vizsgálta. Itt APA, unilaterális adrenális hyperplasia és normális mellékvesekéreg minták miRNS expressziós mintázatát hasonlították össze. A *miR-375* és a *miR-7* szignifikánsan alacsonyabb szintjét találták APA mintákban a másik két csoporthoz viszonyítva [182].

Mellékvesekéreg-daganatok vizelet miRNS expressziós mintázatát eddig nem határozták meg, illetve nem korreláltatták a plazma miRNS expressziós mintázattal.

2. Célkitűzések

A mellékvesekéreg-daganatok diagnózisa gyakran nehéz feladat. Igaz ez a nagyméretű mellékvese incidentalomákra, amikor is az elsődleges feladat a rosszindulatú daganat elkülönítése a jóindulatútól. Az érvényben lévő ajánlások (ESE, ENSAT) a szerzők szerint is gyengék, illetve az esetek nagy részében is csak a jóindulatú adenomákat tudjuk elkülöníteni a rosszindulatú carcinomától. A myelolipoma gyakran nagyméretűre nő, és változó sejttöszetetele miatt összetéveszthető a carcinomával. A myelolipoma miRNS expressziós mintázatát még sem szöveti, sem keringő miRNS szinten nem vizsgálták.

Korábbi kutatások alapján a keringő *miR-483-5p* alkalmas lehet potenciálisan minimálisan invazív biomarkernek az ACC és az ACA elkülönítő kórisméjében. Erre jó eséllyel számítani is lehet, hiszen a vizsgálat szenzitivitása és specificitása is kielégítő értékeket mutat. A vérvétel azonban – ha csak minimálisan is – beavatkozással járó folyamat. Felmerülhet, hogy a vizeletben található miRNS-ek hasznosak lehetnek a mellékvesekéreg-daganatok non-invazív diagnosztikájában.

A primer aldosteronismus differenciáldiagnosztikája is komoly kihívást rejt. Az aldosteron-termelő adenoma és a bilaterális adrenális hyperplasia elkülönítésére a képalkotó vizsgálatok az esetek nagy részében nem nyújtanak megbízható segítséget. A napjainkban arany standardként használt szelektív mellékvesevéna-katéterezés egy általában megbízható, de nem kis beavatkozással járó, és csak korlátozottan elérhető, nagy technikai jártasságot igénylő vizsgálat. A két betegség elkülönítésére nem rendelkezünk jelenleg minimálisan invazív eljárásból nyerhető, vérből meghatározható biomarkerrel, mely alapvetően változtatna a jelenlegi folyamaton. Feltételezésünk szerint, a keringő miRNS expressziós mintázatbeli különbségek alkalmasak lehetnek a két betegség elkülönítésére. E vizsgálatnak nem csak a beteg szempontjából van jelentősége, hanem gazdasági haszna is figyelemreméltó lehetne. Tudomásunk szerint, eddig senki nem tett kísérletet arra, hogy e két betegség keringő miRNS expressziós mintázatát meghatározza.

Kutatásaim céljait három pontba lehet osztani, e beosztás szerint ismertetem a továbbiakban a módszereket, illetve eredményeket is:

1. A mellékvese myelolipoma, mellékvesekéreg-rák és mellékvesekéreg-adenoma miRNS expressziós mintázatának meghatározása és összehasonlítása szöveti és plazmamintákból. A mellékvese myelolipomára jellemző, a mellékvesekéreg-ráktól azt elkülöníteni képes szöveti, illetve minimálisan invazív biomarker keresése és azonosítása.
2. A mellékvesekéreg-rákos betegek plazma és vizelet mintájában a *miR-483-5p* szintjének meghatározása és korrelációjának vizsgálata annak felderítésére, hogy a vizelet *miR-483-5p* alkalmazható-e mint a mellékvesekéreg-rák non-invazív biomarkere.
3. A primer aldosteronismust okozó, két leggyakoribb betegség, az aldoszteron-termelő adenoma és a bilaterális adrenális hyperplasia miRNS expressziós mintázatának meghatározása plazma mintákból a két betegség elkülönítését lehetővé tévő biomarkerek azonosítása céljából.

3. Módszerek

3.1. miRNS profilozás mellékvese myelolipomában, mellékvesekéreg-rákban és mellékvesekéreg-adenomában

3.1.1. Felhasznált minták, betegadatok

Első munkámban az ACC, ACA és mellékvese myelolipoma (AML) betegek szöveti, illetve plazmamintáit vizsgáltam. A vizsgálatba 71 beteg formalinban fixált paraffinba ágyazott (FFPE) szövettani mintáját vontam be (**4. táblázat**). Ebből a felderítő (discovery) kohorszba 30 minta került be (10 ACC, 10 ACA, 10 AML). A validációs kohorszba további 41 független minta került be (15 AML, 14 ACA, 12 ACC). Továbbá, 33 független betegtől preoperatív etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA)-antikoagulált plazmamintát is gyűjtöttem szövettanilag igazolt esetektől (11 minta AML, ACA és ACC-ből egyaránt). A szövettani minták a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetéből, illetve II. sz. Patológiai Intézetéből származtak. A plazmaminták a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikáról, a Padovai Egyetem Endokrinológiai Osztályáról és a Mayo Klinika Endokrinológia, Diabetes, Metabolizmus és Nutrició Osztályáról kerültek bevonásra. A vizsgálatban összesen 41 férfitől és 63 nőtől került minta feldolgozásra. Az átlagéletkor 52 év volt (nőknél 53,5 év, férfiaknál 51,2 év). A mellékvesekéreg-rákok között 22 nem funkcionáló, 8 kortizol-termelő, 2 tesztoszteron-termelő és 1 aldosteron-termelő daganat volt. A mellékvesekéreg-adenomák közül 19 nem funkcionáló, 9 aldosteron-termelő, 7 kortizol-termelő daganat volt. Az ACC daganatok átlagos mérete 99,6 mm volt, AML daganatoké 73,7 mm, míg ACA daganatoké 43,5 mm. A daganatok diagnózisa összes esetben az aktuális szakmai protokollok alapján történt. A szövettani minták egyértelmű diagnózist nyújtottak, a plazmaminták is minden esetben szövettanilag megerősített daganatos betegtől származnak. Preoperatív biokémiai vizsgálatok [(basalis kortizol, ACTH, aldosteron, renin aktivitás, dehidroepiandroszteron-szulfát, vizelet katekolaminok, alacsony dóziszú dexametazon teszt (cut-off: 1,8 µg/dl)] minden esetben

történtek. A vizsgálatokat a Magyar Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta (engedély száma: 24441-2/2016/EKU).

4. táblázat: A vizsgálatba bevont myelolipoma, ACC és ACA mintákhoz tartozó betegadatok

ACA = adrenocorticalis adenoma; ACC = adrenocorticalis carcinoma; aldo: aldoszteron; AML = adrenalis myelolipoma; ENSAT = European Network for the Study of Adrenal Tumors; FFPE = formalinban fixált paraffinba ágyazott (formalin-fixed paraffin embedded); kort: kortizol; n.d: not detectable; n.f.: nem funkcionáló; teszt: tesztoszteron; tumorméret mm-ben kifejezve

Minta	Tumor típus	Kohorsz	Minta típusa	Nem	Életkor	Hormonális aktivitás	Tumor-méret	Ki-67 (%)	Weiss score	ENSAT stádium
1	ACA	Felfedező szöveti	FFPE	N	55	N.f.	25			
2	ACA	Felfedező szöveti	FFPE	F	62	N.f.	40			
3	ACA	Felfedező szöveti	FFPE	F	44	Kort	85			
4	ACA	Felfedező szöveti	FFPE	F	62	N.f.	40			
5	ACA	Felfedező szöveti	FFPE	F	50	N.f.	40			
6	ACA	Felfedező szöveti	FFPE	N	57	N.f.	3			
7	ACA	Felfedező szöveti	FFPE	N	64	N.f.	38			

Minta	Tumor típus	Kohorsz	Minta típusa	Nem	Életkor	Hormonális aktivitás	Tumor-méret	Ki-67 (%)	Weiss score	ENSAT stádium
8	ACA	Felfedező szöveti	FFPE	F	55	N.f.	60			
9	ACA	Felfedező szöveti	FFPE	F	44	Kort	85			
10	ACA	Felfedező szöveti	FFPE	N	36	Aldo	30			
11	ACC	Felfedező szöveti	FFPE	N	70	N.f.	120	<20%	n.d.	4
12	ACC	Felfedező szöveti	FFPE	F	43	N.f.	120	n.d.	6	4
13	ACC	Felfedező szöveti	FFPE	N	39	Kort	90	10%	7	2
14	ACC	Felfedező szöveti	FFPE	N	58	N.f.	115	n.d.	n.d.	2
15	ACC	Felfedező szöveti	FFPE	N	53	Aldo, Kort	90	40-50%	6	2
16	ACC	Felfedező szöveti	FFPE	N	72	N.f.	10	4-5%	n.d.	3
17	ACC	Felfedező szöveti	FFPE	N	46	N.f.	200	42%	7	4
18	ACC	Felfedező szöveti	FFPE	N	50	N.f.	n.d.	n.d.	5	2
19	ACC	Felfedező szöveti	FFPE	N	54	N.f.	70	20%	3	4
20	ACC	Felfedező szöveti	FFPE	N	55	N.f.	60	20-30%	5	4
21	AML	Felfedező szöveti	FFPE	F	68	N.f.	80			

Minta	Tumor típus	Kohorsz	Minta típusa	Nem	Életkor	Hormonális aktivitás	Tumor-méret	Ki-67 (%)	Weiss score	ENSAT stádium
22	AML	Felfedező szöveti	FFPE	N	66	N.f.	70			
23	AML	Felfedező szöveti	FFPE	N	66	N.f.	35			
24	AML	Felfedező szöveti	FFPE	F	35	N.f.	60			
25	AML	Felfedező szöveti	FFPE	N	55	N.f.	60			
26	AML	Felfedező szöveti	FFPE	N	58	N.f.	80			
27	AML	Felfedező szöveti	FFPE	F	70	N.f.	90			
28	AML	Felfedező szöveti	FFPE	N	37	N.f.	80			
29	AML	Felfedező szöveti	FFPE	F	42	N.f.	80			
30	AML	Felfedező szöveti	FFPE	F	61	N.f.	50			
31	ACA	Validációs szöveti	FFPE	N	55	N.f.	90			
32	ACA	Validációs szöveti	FFPE	F	60	N.f.	30			
33	ACA	Validációs szöveti	FFPE	N	52	Aldo	20			
34	ACA	Validációs szöveti	FFPE	F	59	N.f.	35			
35	ACA	Validációs szöveti	FFPE	F	41	Aldo	30			

Minta	Tumor típus	Kohorsz	Minta típusa	Nem	Életkor	Hormonális aktivitás	Tumor-méret	Ki-67 (%)	Weiss score	ENSAT stádium
36	ACA	Validációs szöveti	FFPE	F	51	Aldo	45			
37	ACA	Validációs szöveti	FFPE	N	48	Aldo	10			
38	ACA	Validációs szöveti	FFPE	N	68	Aldo	20			
39	ACA	Validációs szöveti	FFPE	N	43	Aldo	15			
40	ACA	Validációs szöveti	FFPE	N	84	N.f.	90			
41	ACA	Validációs szöveti	FFPE	N	58	N.f.	40			
42	ACA	Validációs szöveti	FFPE	N	56	Kort	25			
43	ACA	Validációs szöveti	FFPE	F	25	N.f.	70			
44	ACA	Validációs szöveti	FFPE	F	64	N.f.	100			
45	ACC	Validációs szöveti	FFPE	N	57	N.f.	60	20-30%	5	4
46	ACC	Validációs szöveti	FFPE	N	62	Kort	78	5%	5	2
47	ACC	Validációs szöveti	FFPE	N	61	N.f.	100	20%	5	4
48	ACC	Validációs szöveti	FFPE	N	48	N.f.	120	30%	6	4
49	ACC	Validációs szöveti	FFPE	N	69	N.f.	110	10-20%	6	3

Minta	Tumor típus	Kohorsz	Minta típusa	Nem	Életkor	Hormonális aktivitás	Tumor-méret	Ki-67 (%)	Weiss score	ENSAT stádium
50	ACC	Validációs szöveti	FFPE	F	25	Kort	120	10%	6	4
51	ACC	Validációs szöveti	FFPE	F	79	N.f.	86	10%	5	3
52	ACC	Validációs szöveti	FFPE	N	71	N.f.	80	n.d.	n.d.	4
53	ACC	Validációs szöveti	FFPE	F	17	N.f.	110	10-15%	3	2
54	ACC	Validációs szöveti	FFPE	N	61	Kort	80	20-30%	5	4
55	ACC	Validációs szöveti	FFPE	F	28	N.f.	n.d.	n.d.	n.d.	4
56	ACC	Validációs szöveti	FFPE	N	47	N.f.	140	20-25%	4	4
57	AML	Validációs szöveti	FFPE	N	36	N.f.	100			
58	AML	Validációs szöveti	FFPE	N	55	N.f.	135			
59	AML	Validációs szöveti	FFPE	F	51	N.f.	30			
60	AML	Validációs szöveti	FFPE	N	62	N.f.	40			
61	AML	Validációs szöveti	FFPE	N	54	N.f.	60			
62	AML	Validációs szöveti	FFPE	N	35	N.f.	50			
63	AML	Validációs szöveti	FFPE	F	46	N.f.	60			

Minta	Tumor típus	Kohorsz	Minta típusa	Nem	Életkor	Hormonális aktivitás	Tumor-méret	Ki-67 (%)	Weiss score	ENSAT stádium
64	AML	Validációs szöveti	FFPE	N	54	N.f.	45			
65	AML	Validációs szöveti	FFPE	N	38	N.f.	110			
66	AML	Validációs szöveti	FFPE	F	60	N.f.	80			
67	AML	Validációs szöveti	FFPE	N	29	N.f.	50			
68	AML	Validációs szöveti	FFPE	N	42	N.f.	110			
69	AML	Validációs szöveti	FFPE	N	44	N.f.	40			
70	AML	Validációs szöveti	FFPE	N	71	N.f.	50			
71	AML	Validációs szöveti	FFPE	F	60	N.f.	45			
72	ACA	Keringő miRNS	Plazma	F	62	Kort	40			
73	ACA	Keringő miRNS	Plazma	N	37	Kort	51			
74	ACA	Keringő miRNS	Plazma	N	77	N.f.	75			
75	ACA	Keringő miRNS	Plazma	F	66	N.f.	50			
76	ACA	Keringő miRNS	Plazma	F	68	N.f.	50			
77	ACA	Keringő miRNS	Plazma	N	69	N.f.	35			

Minta	Tumor típus	Kohorsz	Minta típusa	Nem	Életkor	Hormonális aktivitás	Tumor-méret	Ki-67 (%)	Weiss score	ENSAT stádium
78	ACA	Keringő miRNS	Plazma	N	39	Kort	50			
79	ACA	Keringő miRNS	Plazma	N	22	Kort	35			
80	ACA	Keringő miRNS	Plazma	N	73	N.f.	45			
81	ACA	Keringő miRNS	Plazma	N	64	Aldo	16			
82	ACA	Keringő miRNS	Plazma	F	47	Aldo	12			
83	ACC	Keringő miRNS	Plazma	N	36	Kort	80	n.d.	n.d.	4
84	ACC	Keringő miRNS	Plazma	N	58	N.f.	180	n.d.	5	4
85	ACC	Keringő miRNS	Plazma	F	56	N.f.	65	20%	5	2
86	ACC	Keringő miRNS	Plazma	F	39	Kort	90	5- 10%	5	2
87	ACC	Keringő miRNS	Plazma	F	51	N.f.	170	2%	n.d.	3
88	ACC	Keringő miRNS	Plazma	F	26	Kort	185	10- 20%	6	3
89	ACC	Keringő miRNS	Plazma	N	51	Kort	10	25%	9	3
90	ACC	Keringő miRNS	Plazma	F	80	N.f.	100	40%	10	3
91	ACC	Keringő miRNS	Plazma	N	56	Teszt	60	70%	6	2

Minta	Tumor típus	Kohorsz	Minta típusa	Nem	Életkor	Hormonális aktivitás	Tumor-méret	Ki-67 (%)	Weiss score	ENSAT stádium
92	ACC	Keringő miRNS	Plazma	N	62	Teszt	90	n.d.	7	3
93	ACC	Keringő miRNS	Plazma	F	53	N.f.	n.d.	n.d.	10	3
94	AML	Keringő miRNS	Plazma	N	35	N.f.	100			
95	AML	Keringő miRNS	Plazma	N	59	N.f.	30			
96	AML	Keringő miRNS	Plazma	N	50	N.f.	45			
97	AML	Keringő miRNS	Plazma	N	43	N.f.	95			
98	AML	Keringő miRNS	Plazma	F	39	N.f.	60			
99	AML	Keringő miRNS	Plazma	F	41	N.f.	110			
100	AML	Keringő miRNS	Plazma	N	44	N.f.	100			
101	AML	Keringő miRNS	Plazma	F	49	N.f.	80			
102	AML	Keringő miRNS	Plazma	N	43	N.f.	120			
103	AML	Keringő miRNS	Plazma	F	79	N.f.	97			
104	AML	Keringő miRNS	Plazma	F	42	N.f.	127			

3.1.2. A minták feldolgozása és miRNS izolálása szövetből és plazmából

A szöveti mintákból teljes/totál RNS-t izoláltam a RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével. Az izolálás a gyári protokoll szerint valósult meg.

Az EDTA-antikoagulált mintákból minden esetben 4 °C-on 10 percen keresztül 3000-es fordulatszámom (kb. 1000 x g) centrifugálva nyertük a plazmát. Ezt további felhasználásig -80 °C-on tároltuk. A miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) használatával nyertünk teljes RNS-t a plazmából. A gyári protokoll lépései közé - az acid-fenol/kloroform adása elé – beiktattunk egy lépést. Itt 5 µl 5 nM/L koncentrációjú *syn-cel-miR-39*-et (miSript miRNA Mimic, Qiagen GmbH) adtunk hozzá normalizálási célból.

Az izolált totál RNS-t további felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

3.1.3. Szöveti miRNS expressziós profilozás újgenerációs szekvenálás segítségével

A teljes RNS-ből kiindulva cDNS könyvtárat készítettem a QIAseq miRNA Library Kit (Qiagen GmbH) segítségével, a gyártó előírása szerint. Szekvenáláshoz a könyvtárat előkészítettem a MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina, San Diego, CA, USA) előírásai szerint. Az újgenerációs szekvenálás (next-generation sequencing, NGS) elvégzéséhez az Illumina MiSeq készüléket használtam. A szekvenálási adatokat tartalmazó, nyers FASTQ fájlokat az elsődleges adatelemzésben dolgoztam fel a Qiagen online szoftverét használva (<https://www.qiagen.com/hu/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>). Az elsődleges adatelemzésben a cutadapt (Marcel Martin, Technical University, Dortmund, Németország) segítségével az adapterszekvenciákat eltávolítottuk. A read-eket, melyek inzerciószekvenciája 16 bázispárnál rövidebb, vagy unique molecular index-e (UMI) 10 bázispárnál rövidebb, kizártuk. A read-eket a miRbase 21-es verziójára bowtie (John Hopkins University, Baltimore, MD, USA) használatával illesztettük. A különböző daganatokban szignifikánsan eltérően

kifejeződő miRNS-eket DESeq2 normalizálás után [183] a másodlagos adatelemzéskor találtam.

3.1.4. A szekvenálás során szignifikánsan eltérő kifejeződésű miRNS-ek validálása

Az RNS reverz transzkripciója mind szöveti, mind plazma mintáknál a TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) és egyedi TaqMan miRNS assay-k (Thermo Fisher Scientific, katalógusszám: 4427975) segítségével valósult meg. A felhasznált miRNS assay-k a következők voltak: *hsa-miR-451a* (ID: 001141), *hsa-miR-486-5p* (ID: 001278), *hsa-miR-363-3p* (ID: 001271), *hsa-miR-150-5p* (ID: 000473), *hsa-miR-184* (ID: 000485), *hsa-miR-483-5p* (ID: 002338), *hsa-miR-483-3p* (002339), *hsa-miR-183-5p* (ID: 002269). A belső kontroll a miRNS szöveti minták esetén az *RNU48* (ID: 001006), míg plazma mintáknál a *cel-miR-39* (ID: 000200) volt. Kvantitatív valós idejű PCR vizsgálatot TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x) (KSZ: 4352042; Thermo Fisher Scientific) használatával egy Quantstudio 7 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) készüléken végeztük a TaqMan miRNS assay-k gyártói előírásainak megfelelően minimális módosítással (a reakció végtérfogata 15 µl volt, a PCR programja a következő volt: 1. lépés: 20 perc 95 °C-on, majd 40 ciklus 95 °C 3 másodpercig és 60 °C 30 másodpercig). A negatív kontroll reakciók nem tartalmaztak cDNS-t. A vizsgálatot minden esetben három technikai párhuzamos méréssel végeztük. Az adatfeldolgozásban a dCt módszert alkalmaztuk [delta Ct (cycle threshold) érték egyenlő a cél miRNS Ct és belső kontroll miRNS Ct különbségével].

3.1.5. Statisztikai analízis

Statisztikai power analízist számoltunk power és mintaszám kalkulátorral (Tempest Technologies, Helena, MT, USA). A valós idejű PCR adatokat GraphPad Prism 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) program segítségével dolgoztuk fel. Az egyes daganatcsoportok közötti differenciáláshoz egyutas ANOVA vagy Kruskal-Wallis

tesztet alkalmaztunk a Shapiro-Wilks normalitási vizsgálat eredménye alapján. Receiver Operating Characteristic (ROC) analízist (hatásfokmérő karakterisztikát) végeztünk a diagnosztikai hatékonyság megállapítására azon miRNS-eknél, melyeket az eredmények alapján potenciálisan biomarkernek lehet használni. A statisztikai tesztekénél $p < 0,05$ értékeket vettük szignifikánsnak.

3.1.6. Útvonalelemzés

A miRNS-ek lehetséges célmolekuláit vizsgáltuk Diana mirPath v.3 (Diana Lab Tools, university of Thessaly, Thessaly, Greece) használatával. A célmolekulák felismeréséhez Targetscan-t (Whitehead Institute, Cambridge, MA, USA) használtuk.

3.2. A *hsa-miR-483-5p* expressziójának összehasonlítása ACC és ACA betegek plazma és vizeletmintáiban

3.2.1. Felhasznált minták, betegadatok

E vizsgálatba összesen 46 beteg mintái kerültek bevonásra. 23 mellékvesekéreg-rák és 23 mellékvesekéreg-adenoma betegről gyűjtöttünk EDTA-antikoagulált plazmamintát és random vizeletmintát (**5. táblázat**). Minden ACC minta szövettanilag igazolt volt. A nem operált adenomák diagnózisa képalkotó eredményeken és a betegek követésén alapul. Az ACC mintákat a terápia megkezdése előtt gyűjtöttük. Összesen 34 nő és 12 férfi mintái szerepelnek a vizsgálatban. Az átlagéletkor 52,13 év volt (férfiaknál 54 év, nőknél 51,47 év). Az ACC minták közül 16 nem funkcionáló tumor volt és 7 volt kortizol-termelő. ACA minták közül 9 nem funkcionáló és 14 kortizol-termelő volt. Az ACC daganatok átlagos mérete 88 mm, míg az adenomák átlagos mérete 32 mm volt. Preoperatív biokémiai vizsgálatok minden esetben történtek [bazális kortizol, adrenokortikotrop hormon (ACTH), dehidroepiandroszteron-szulfát (DHEAS), vizelet szabad kortizol, alacsony dóziszú dexametazon teszt (cut-off: 1,8 µg/dl). A vizelet kreatinin szintjét Beckmann Coulter AU5800 (Beckmann Coulter Inc. 92821, Brea, CA, USA) segítségével vizsgáltuk. A vizsgálatokat a Magyar Egészségügyi Tudományos

Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta (engedély száma: 55106-2/2017/EKU).

5. táblázat: A vizsgálatba bevont ACC és ACA mintákhoz tartozó betegadatok

ACA = adrenocorticalis adenoma; ACC = adrenocorticalis carcinoma, ENSAT = European Network for the Study of Adrenal Tumors; n.d. = not determined; tumorméret mm-ben kifejezve

Minta	Tumor típus	Minta típusa	Nem	Kor	Hormonális aktivitás	Tumor-méret	Ki-67 (%)	ENSAT stádium
1	ACC	Plazma/vizelet	Nő	22	Nem funkcionáló	39	10	1
2	ACC	Plazma/vizelet	Férfi	59	Kortizol	128	60	4
3	ACC	Plazma/vizelet	Nő	63	Nem funkcionáló	30	50	4
4	ACC	Plazma/vizelet	Nő	46	Nem funkcionáló	52	5	1
5	ACC	Plazma/vizelet	Nő	65	Nem funkcionáló	79	15	2
6	ACC	Plazma/vizelet	Nő	68	Kortizol	173	n.d.	4
7	ACC	Plazma/vizelet	Férfi	52	Nem funkcionáló	180	30	4
8	ACC	Plazma/vizelet	Nő	30	Nem funkcionáló	75	5	2
9	ACC	Plazma/vizelet	Férfi	44	Nem funkcionáló	64	70	4
10	ACC	Plazma/vizelet	Nő	71	Nem funkcionáló	150	70	4
11	ACC	Plazma/vizelet	Nő	63	Nem funkcionáló	14	15	4
12	ACC	Plazma/vizelet	Nő	39	Nem funkcionáló	43	15	1
13	ACC	Plazma/vizelet	Nő	54	Nem funkcionáló	15	50	4
14	ACC	Plazma/vizelet	Férfi	60	Kortizol	71	n.d.	4
15	ACC	Plazma/vizelet	Nő	61	Nem funkcionáló	105	40	4
16	ACC	Plazma/vizelet	Férfi	58	Kortizol	110	30	4
17	ACC	Plazma/vizelet	Nő	34	Nem funkcionáló	100	n.d.	4
18	ACC	Plazma/vizelet	Nő	39	Nem funkcionáló	90	10	4
19	ACC	Plazma/vizelet	Férfi	26	Kortizol	115	10-20	3

Minta	Tumor típus	Minta típusa	Nem	Kor	Hormonális aktivitás	Tumor-méret	Ki-67 (%)	ENSAT stádium
20	ACC	Plazma/vizelet	Nő	75	Kortizol	75	40-50	4
21	ACC	Plazma/vizelet	Férfi	56	Nem funkcionáló	65	20	2
22	ACC	Plazma/vizelet	Nő	58	Nem funkcionáló	180	n.d.	4
23	ACC	Plazma/vizelet	Nő	64	Kortizol	80	20-30	4
24	ACA	Plazma/vizelet	Férfi	73	Nem funkcionáló	19		
25	ACA	Plazma/vizelet	Nő	38	Nem funkcionáló	45		
26	ACA	Plazma/vizelet	Nő	59	Nem funkcionáló	32		
27	ACA	Plazma/vizelet	Férfi	71	Nem funkcionáló	45		
28	ACA	Plazma/vizelet	Nő	67	Nem funkcionáló	38		
29	ACA	Plazma/vizelet	Nő	55	Nem funkcionáló	26		
30	ACA	Plazma/vizelet	Férfi	31	Nem funkcionáló	34		
31	ACA	Plazma/vizelet	Nő	51	Nem funkcionáló	4		
32	ACA	Plazma/vizelet	Nő	29	Nem funkcionáló	20		
33	ACA	Plazma/vizelet	Nő	59	Kortizol	37		
34	ACA	Plazma/vizelet	Nő	45	Kortizol	19		
35	ACA	Plazma/vizelet	Nő	43	Kortizol	22		
36	ACA	Plazma/vizelet	Nő	68	Kortizol	12		
37	ACA	Plazma/vizelet	Nő	72	Kortizol	50		
38	ACA	Plazma/vizelet	Férfi	68	Kortizol	62		
39	ACA	Plazma/vizelet	Nő	55	Kortizol	32		
40	ACA	Plazma/vizelet	Nő	26	Kortizol	42		
41	ACA	Plazma/vizelet	Nő	44	Kortizol	36		
42	ACA	Plazma/vizelet	Nő	60	Kortizol	46		
43	ACA	Plazma/vizelet	Nő	28	Kortizol	16		
44	ACA	Plazma/vizelet	Férfi	50	Kortizol	30		
45	ACA	Plazma/vizelet	Nő	48	Kortizol	40		
46	ACA	Plazma/vizelet	Nő	51	Kortizol	29		

3.2.2. A minták feldolgozása és RNS izolálás

Minden mintából teljes RNS-t izoláltunk a miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen) segítségével a gyártó előírásainak megfelelően. Normalizálási célból az acid-fenol/kloroform adása előtt hozzáadtunk a mintához 5 µl 5 nM *syn-cel-miR-39* miScript miRNA mimic-et (Qiagen). További felhasználásig a minta -80 °C-on tároltuk.

3.2.3. A *miR-483-5p* expresszió mérése valós idejű PCR-rel

Az RNS-ek reverz transzkripciója TaqMan Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) és egyedi TaqMan MicroRNA Assay (KSZ: 4427975) segítségével valósult meg. A *hsa-miR-483-5p* (ID: 002338) expresszióját vizsgáltuk, belső kontrollként a *cel-miR-39*-et (ID: 000200) használtuk. Kvantitatív valós idejű PCR mérést végeztünk 3.1.4. fejezetben leírtaknak megfelelően.

3.2.4. Statisztikai analízis

Annak céljából, hogy a miRNS expresszió igazodjon a vizelet sűrűségéhez, a relatív miRNS expresszió ($2^{-\text{dCT}}$) értékeket a vizelet kreatinin szintjére normalizáltuk. A valós idejű PCR adatokat GraphPad Prism 7.00 programmal dolgoztuk fel. ACA és ACC csoportok közötti elkülönítésre Student-féle t-tesztet vagy Mann-Whitney-tesztet alkalmaztunk a Shapiro-Wilks normalitási teszt eredményei alapján. Spearman korrelációs tesztet használtunk a plazma és vizelet *miR-483-5p* korrelációjának vizsgálatára. ROC-analízist végeztünk a *miR-483-5p* diagnosztikus hatékonyságának megbecslésére. Szignifikánsnak tekintettük a statisztikai próbák során a 0,05-nél kisebb p-értékeket.

3.3. miRNS profilozás primer aldosteronismusban

3.3.1. Felhasznált minták, betegadatok

A harmadik vizsgálatba 123 beteg EDTA-antikoagulált plazmamintája került bevonásra. Összesen 61 APA és 62 BAH mintát vizsgáltunk (**6. táblázat**) A primer aldosteronismus diagnózisát az aktuálisan érvényes iránymutatásnak megfelelően alkalmaztuk [107]. APA és BAH diagnózisok ACTH stimulációs vagy stimuláció nélküli AVS vizsgálaton alapultak (**7.táblázat**). APA esetében a minták műtét előtt kerültek levételre. Az átlagéletkor 52,2 év volt.

6. táblázat: A vizsgálatba bevont APA és BAH plazmamintákhoz tartozó betegadatok

Aldo: Aldoszteron; APA Aldoszteron-termelő adenoma; AVS: Adrenal vein sampling (szelektív mellékvesevéne-katéterezés); BAH: Bilaterális adrenális hyperplasia; LI: Lateralization index; NGS: Next-generation sequencing (újgenerációs szekvenálás); PCR: Polimeráz láncreakció (validációs kohorsz); Aldoszteron- és kortizolértékek a szelektív mellékvese-katéterezés során mért értékek. Kortizolértékek µg/dl-ben kifejezve

Minta	Minta típusa	Kohorsz	Nem	Kor	Tumor-méret (mm)	Aldo jobb (pg/ml)	Aldo bal (pg/ml)	Kortizol jobb	Kortizol bal	LI
1	BAH	NGS	F	41	15, jobb	8029	15725	172	352	1,04
2	BAH	NGS	F	65	normális	6013	4573	490	335	0,90
3	BAH	NGS	F	34	12, bal	8837	3413	187	63	0,87
4	BAH	NGS	F	58	10, jobb	5370	3370	208	144	1,10
5	BAH	NGS	F	37	normális	5518	4386	483	273	0,71
6	BAH	NGS	F	38	normális	19867	19704	349	318	0,92
7	BAH	NGS	F	44	normális	9524	7497	937	434	0,59
8	BAH	NGS	N	58	normális	8425	5377	442	234	0,83
9	BAH	NGS	F	67	normális	2820	2569	275	232	0,92
10	BAH	NGS	F	49	10/19, jobb/bal	37400	15300	901	622	1,69

Minta	Minta típusa	Kohorsz	Nem	Kor	Tumor-méret (mm)	Aldo jobb (pg/ml)	Aldo bal (pg/ml)	Kortizol jobb	Kortizol bal	LI
11	BAH	NGS	N	63	9/7, jobb/bal	16000	17000	487	399	0,77
12	BAH	NGS	F	70	5/15, jobb/bal	301000	318000	1070	689	0,61
13	BAH	NGS	N	67	5/5, jobb/bal	63000	24000	707	254	0,94
14	BAH	NGS	N	55	16, bal	3464	2303	611	462	1,14
15	APA	NGS	F	74	normális	490	8769	98	48	0,03
16	APA	NGS	F	87	15, jobb	11296	474	19	18	22,5
17	APA	NGS	F	45	12, bal	141	14021	676	762	0,01
18	APA	NGS	F	58	12, bal	20632	1903	235	535	24,6
19	APA	NGS	F	48	15, jobb	7317	1585	298	442	6,85
20	APA	NGS	N	42	10, bal	450	81101	19	34	0,01
21	APA	NGS	F	55	normális	1834	85066	1296	1332	0,02
22	APA	NGS	F	59	8, jobb	422000	3580	904	686	89,4
23	APA	NGS	N	32	14, jobb	39000	720	268	76	15,3
24	APA	NGS	N	58	29, jobb	28300	950	749	225	8,95
25	APA	NGS	F	47	5/5, jobb/bal	12000	61000	1150	442	0,08
26	APA	NGS	F	44	10, jobb	700000	2500	1020	494	135
27	APA	NGS	F	54	5/10, jobb/bal	140	112000	15	573	0,05
28	APA	NGS	F	48	7/9, jobb/bal	22000	1700	869	337	5,02
29	APA	NGS	F	57	6/7, jobb/bal	20000	45000	589	244	0,18
30	APA	NGS	N	65	12, bal	11000	23000	605	266	0,21
31	BAH	PCR	F	43	normális	14804	4935	1487	592	1,19

Minta	Minta típusa	Kohorsz	Nem	Kor	Tumor-méret (mm)	Aldo jobb (pg/ml)	Aldo bal (pg/ml)	Kortizol jobb	Kortizol bal	LI
32	BAH	PCR	F	35	normális	17479	7568	1078	502	1,08
33	BAH	PCR	N	41	normális	13623	4901	530	281	1,47
34	APA	PCR	F	65	13, bal	45409	764	982	1207	73,0
35	APA	PCR	N	54	20, bal	1737	9240	913	478	0,10
36	BAH	PCR	F	73	26, bal	23785	6336	1528	533	1,31
37	APA	PCR	N	20	7, bal	9082	17082	2229	751	0,18
38	APA	PCR	N	51	18, bal	2595	7496	658	170	0,09
39	BAH	PCR	F	62	23, bal	1820	13731	62	469	1,00
40	APA	PCR	N	48	23/23, jobb/bal	303	17241	109	544	0,09
41	APA	PCR	F	65	10, bal	2133	17371	483	192	0,05
42	BAH	PCR	F	48	normális	12145	14343	907	445	0,42
43	BAH	PCR	N	37	normális	18091	14884	648	863	1,62
44	APA	PCR	F	56	10, bal	6091	5334	1047	233	0,25
45	APA	PCR	F	55	normális	6955	14848	1738	936	0,25
46	BAH	PCR	F	63	2, bal	6595	5244	480	289	0,76
47	APA	PCR	N	35	15, jobb	6612	94144	323	195	0,04
48	APA	PCR	N	44	20, bal	2391	35231	529	405	0,05
49	APA	PCR	F	59	15, jobb	142000	6260	509	491	21,8
50	APA	PCR	F	57	6/8, jobb/bal	3700	10000 0	533	877	0,06
51	APA	PCR	F	41	10, jobb	59000	1440	455	339	30,5
52	APA	PCR	N	32	14, jobb	39000	720	268	76	15,3
53	APA	PCR	F	48	10/15, jobb/bal	610	32000	353	343	0,02
54	APA	PCR	F	67	12, jobb	2000	12000	531	349	0,11
55	APA	PCR	F	58	13, bal	3100	88000	388	263	0,02

Minta	Minta típusa	Kohorsz	Nem	Kor	Tumor-méret (mm)	Aldo jobb (pg/ml)	Aldo bal (pg/ml)	Kortizol jobb	Kortizol bal	LI
56	APA	PCR	F	56	10/5, jobb/bal	64000	4300	867	792	13,6
57	APA	PCR	F	50	normális	228,5	2381	157	40	0,02
58	APA	PCR	F	51	normális	18245	2136	223	734	28,1
59	APA	PCR	N	58	16, jobb	23285	602	480	740	59,6
60	APA	PCR	N	48	15, jobb	57672	559	34	99	303
61	BAH	PCR	F	51	20, jobb	2338	1406	260	294	1,88
62	BAH	PCR	N	36	20, jobb	117,5	389,6	12	20	0,52
63	BAH	PCR	F	67	7, bal	1184	2046	134	101	0,44
64	BAH	PCR	F	65	normális	180	6260	42	549	0,38
65	BAH	PCR	F	47	normális	375	1220	53	157	0,91
66	BAH	PCR	N	58	normális	23800	2010	1482	153	1,22
67	BAH	PCR	N	53	15, bal	1720	4710	56	246	1,60
68	BAH	PCR	N	40	10, bal	249	8240	47	1964	1,26
69	BAH	PCR	N	58	normális	518	562	59	56	0,87
70	BAH	PCR	F	47	normális	1340	38640	185	3464	0,65
71	BAH	PCR	F	54	normális	6130	11150	488	951	1,07
72	BAH	PCR	N	55	normális	949	1430	19	31	1,08
73	BAH	PCR	F	43	normális	3506	2790	30	47	1,97
74	BAH	PCR	F	42	normális	1010	1534	111	263	1,56
75	BAH	PCR	N	36	normális	2228	374	643	77	0,71
76	BAH	PCR	N	59	7, jobb	1596	4374	323	576	0,65
77	BAH	PCR	N	53	normális	1738	5616	549	1000	0,56
78	APA	PCR	F	37	13, bal	1920	22350	606	483	0,07
79	APA	PCR	N	65	normális	5760	407	44	289	92,9
80	APA	PCR	F	34	13, jobb	5160	474	79	238	32,8
81	APA	PCR	F	52	normális	83840	223	22	16	273
82	APA	PCR	N	62	normális	9200	471	49	176	70,1

Minta	Minta típusa	Kohorsz	Nem	Kor	Tumor-méret (mm)	Aldo jobb (pg/ml)	Aldo bal (pg/ml)	Kortizol jobb	Kortizol bal	LI
83	BAH	PCR	N	33	normális	2329	410	229	54	1,35
84	BAH	PCR	F	45	bal1,3cm	585	13200	112	958	0,38
85	BAH	PCR	F	63	normális	5425	3588	132	170	1,94
86	APA	PCR	N	63	20, bal	402,6	13880	35	67	0,05
87	APA	PCR	F	60	hyperplasia	3147	2694	1455	48	0,04
88	BAH	PCR	F	45	10, bal	1901	19400	32	668	2,04
89	BAH	PCR	F	48	normális	1325	880	568	674	1,79
90	BAH	PCR	N	39	normális	4346	702	30	13	2,73
91	BAH	PCR	F	58	10, jobb	3825	3911	3815	2835	0,73
92	APA	PCR	N	60	20/15, jobb/bal	15054	2986	1580	24	0,08
93	APA	PCR	N	37	hyperplasia	537	2283	29	27	0,21
94	APA	PCR	N	51	40, bal	486	17687	216	330	0,04
95	APA	PCR	N	60	normális	299	35300	966	579	0,01
96	BAH	PCR	N	51	normális	900	1990	144	193	0,60
97	APA	PCR	N	48	20, bal	404	16120	511	582	0,03
98	BAH	PCR	F	73	normális	960	819	21	28	1,58
99	BAH	PCR	N	54	22/11, jobb/bal	1915	6099	18	20	0,35
100	BAH	PCR	F	43	normális	3506	2790	30	47	1,95
101	BAH	PCR	F	51	normális	4890	3080	124	91	1,17
102	APA	PCR	N	39	16, jobb	47982	125	497	118	91
103	APA	PCR	N	27	16, bal	1138	7538	1922	1217	0,10
104	BAH	PCR	F	69	5, bal	33449	32152	1921	647	0,35
105	BAH	PCR	F	62	7, bal	12832	6567	1150	551	0,94

Minta	Minta típusa	Kohorsz	Nem	Kor	Tumor-méret (mm)	Aldo jobb (pg/ml)	Aldo bal (pg/ml)	Kortizol jobb	Kortizol bal	LI
106	BAH	PCR	N	39	14/20, jobb/bal	30097	4758	1404	501	2,26
107	BAH	PCR	F	68	15/10, jobb/bal	1586	613	1134	650	1,48
108	BAH	PCR	N	69	normális	15626	7642	1135	499	0,90
109	BAH	PCR	N	67	7, jobb	19645	15571	875	235	0,34
110	BAH	PCR	N	68	normális	36000	21000	1410	805	0,98
111	APA	PCR	F	60	12/5, jobb/bal	101000	3860	701	567	21,1
112	BAH	PCR	N	40	normális	65000	7600	2520	819	2,78
113	APA	PCR	N	46	14, bal	3050	13424 0	1098	1048	0,02
114	APA	PCR	F	38	6/11, jobb/bal	3600	36000	622	564	0,09
115	APA	PCR	F	65	5/12, jobb/bal	7100	20000	732	451	0,22
116	BAH	PCR	N	40	5, bal	16000	8300	317	257	1,56
117	APA	PCR	F	55	14/13, jobb/bal	22000	81000	496	232	0,13
118	APA	PCR	N	56	9/5, jobb/bal	511000	1380	625	227	134
119	APA	PCR	N	49	18, bal	8280	15036	246	92	0,21
120	APA	PCR	F	68	21, jobb	20123	482	195	87	18,5
121	APA	PCR	F	60	normális	41985	6997	539	371	4,13
122	BAH	PCR	F	45	11, bal	3994	4350	279	354	1,16
123	BAH	PCR	F	54	15, jobb	15889	5437	683	496	2,12

7.táblázat: A mintákat szolgáltató centrumok, illetve az AVS alkalmazási módja

ACTH: Adrenokortikotrop hormon; AVS: Adrenal vein sampling (szelektív mellékvesevéna-katéterezés)

Ország/Centrum	Minták száma	AVS protokoll
USA/Rochester	30	ACTH stimulált
Olaszország/Torino	17	ACTH stimulált
Olaszország/Padova	13	ACTH stimulált
Horvátország/Zágráb	22	ACTH stimulált
Németország/München	41	Nem stimulált

Az APA és a BAH elkülönítésére az AVS eredmények alapján lateralizációs indexet (LI) alkalmaztunk [(kortizol bo./aldoszteron bo.)/(kortizol jo./aldoszteron jo.)]. Ha a lateralizációs index 0,33 és 3 közötti értéket mutatott, a diagnózis BAH lett, ha nagyobb, mint 4 vagy kisebb, mint 0,25, akkor APA volt a diagnózis. Ha a LI 0,25-0,33 vagy 3-4 közötti értékeket vett fel – korábbi megfigyelések alapján – szürke zónába soroltuk, így a vizsgálatból kizártuk [114]. A vizsgálatba bevont minták összesen 72 F- és 51 nőbetegtől származtak. A vizsgálatokat a Magyar Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta (engedély száma: 34736-2/2018/EKU).

3.3.2. A minták feldolgozása

Teljes RNS-t izoláltunk az összes plazmamintából a miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen) segítségével a gyártó előírásainak megfelelően. Normalizálási célból az acid-fenol/kloroform adása előtt hozzáadtunk a mintához 5 µl 5 nM *syn-cel-miR-39* miScript miRNA mimic-et (Qiagen). További felhasználásig a minta -80 °C-on tároltuk.

3.3.3. miRNS expresszió profilozás plazmamintákból újgenerációs szekvenálással

Összesen 30 minta került (16 APA és 14 BAH) NGS vizsgálatra. A könyvtárkészítés és a szekvenálás minden esetben a gyártók előírásai szerint történtek. A mérések leírása megegyezik a **3.1.3.** fejezetben leírtakkal.

3.3.4. Egyedi miRNS-ek validálása

Az NGS során az APA és BAH minták között szignifikáns különbséget mutató miRNS-ek valós idejű PCR validálásra kerültek egy 93 független mintából álló kohorszban. Az RNS reverz transzkripciója a TaqMan Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) és egyedi TaqMan miRNA Assay-k (Thermo Fisher Scientific, KSZ: 4427975, 4440886) segítségével valósult meg. A szekvenálás során kiválasztott miRNS-ek a következők voltak: *hsa-miR-30e-5p* (ID: 002223), *hsa-miR-223-3p* (ID: 002295), *hsa-miR-30d-5p* (ID: 000420) és a *hsa-miR-7-5p* (ID: 005723_mat) voltak. Belső kontrollnak a *cel-miR-39*-et (ID: 000200) használtuk. A PCR validálás a gyártó előírásait figyelembe véve és követve valósultak meg hasonlóan a **3.1.4.** fejezetben leírtakkal.

3.3.5. Statisztikai elemzés

Statisztikai power analízist számoltunk power és mintaszám kalkulátorral (HyLown Consulting LLC, Atlanta, GA, USA) [184]. Valós idejű PCR adatokat GraphPad Prism 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) program segítségével dolgoztuk fel. Többcentrumos vizsgálat lévén, az eltérő centrumokból érkező, de azonos minták között összehasonlító vizsgálatokat végeztünk annak érdekében, hogy az esetleges különbségeket felfedjük. E célból egyutas ANOVA vagy Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk a Shapiro-Wilks normalitási teszt alapján. Annak érdekében, hogy az eredményeinket ne befolyásolja az eltérő centrumokhoz köthető eltérés, a $-dCt$

értékeket standard score segítségével standardizáltuk (z-score vagy z-érték: $z = \frac{x-\mu}{\sigma}$, ahol μ és σ az adott centrumhoz tartozó értékek átlaga és szórása). Az APA és BAH minták közötti elkülönítésre t-tesztet vagy Kruskal-Wallis-tesztek alkalmaztunk a Shapiro-Wilks normalitási teszt eredménye alapján. ROC-analízist is végeztünk, a minták diagnosztikai alkalmazhatóságának vizsgálata céljából. A statisztikai próbák során a szignifikanciaszint $p < 0,05$ volt.

4. Eredmények

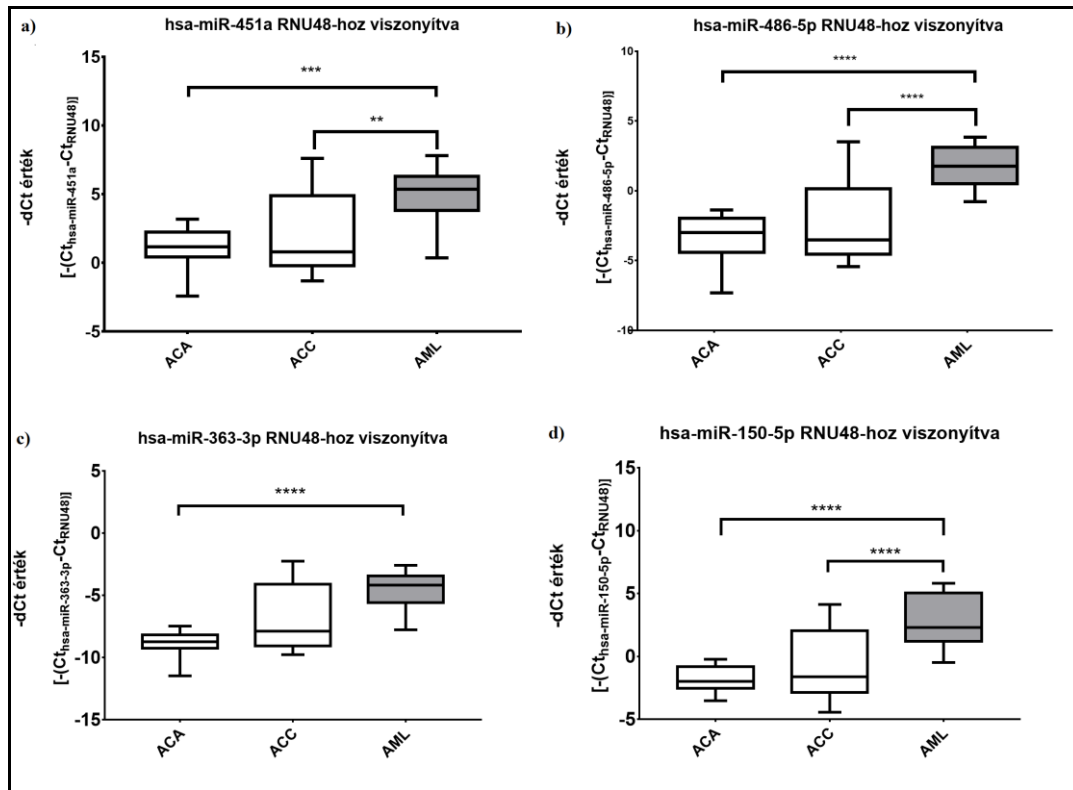
4.1. miRNS profilozás mellékvese myelolipomában, mellékvesekéreg-rákban és mellékvesekéreg-adenomában

4.1.1. Szöveti miRNS expressziós profilozás újgenerációs szekvenálás segítségével

A 30 mintán elvégzett újgenerációs szekvenálás során összesen 256 szignifikánsan eltérően expresszálódó miRNS-t találtunk. A myelolipomában a másik két daganathoz képest legnagyobb különbséget mutató a *hsa-miR-451a* [fold change (FC) ACC-hez viszonyítva: 14,7; $p < 0,0001$], *hsa-miR-486-5p* (FC: 14,1; $p < 0,0001$), *hsa-miR-363-3p* (FC: 6; $p < 0,0001$) és a *hsa-miR-150-5p* (FC: 6,7; $p < 0,0001$) miRNS-eket jelöltük ki validálásra. Mellékvesekéreg-rákban a másik két daganattól leginkább eltérő kifejeződést a *hsa-miR-483-3p* (FC: 47,3; $p < 0,0001$), *hsa-miR-184* (FC: 14,5; $p < 0,0001$), *hsa-miR-483-5p* (FC: 18,2; $p < 0,0001$) és a *hsa-miR-183-5p* (FC: 9,5; $p < 0,0001$) miRNS-ek mutatták (FC és p értékek AML-lel összehasonlítva). Az NGS adatok a Gene Expression Omnibus (GEO) publikus adatbázisban találhatóak a GSE112804 azonosítószám alatt.

4.1.2. A szekvenálás során szignifikánsan eltérő kifejeződésű miRNS-ek validálása

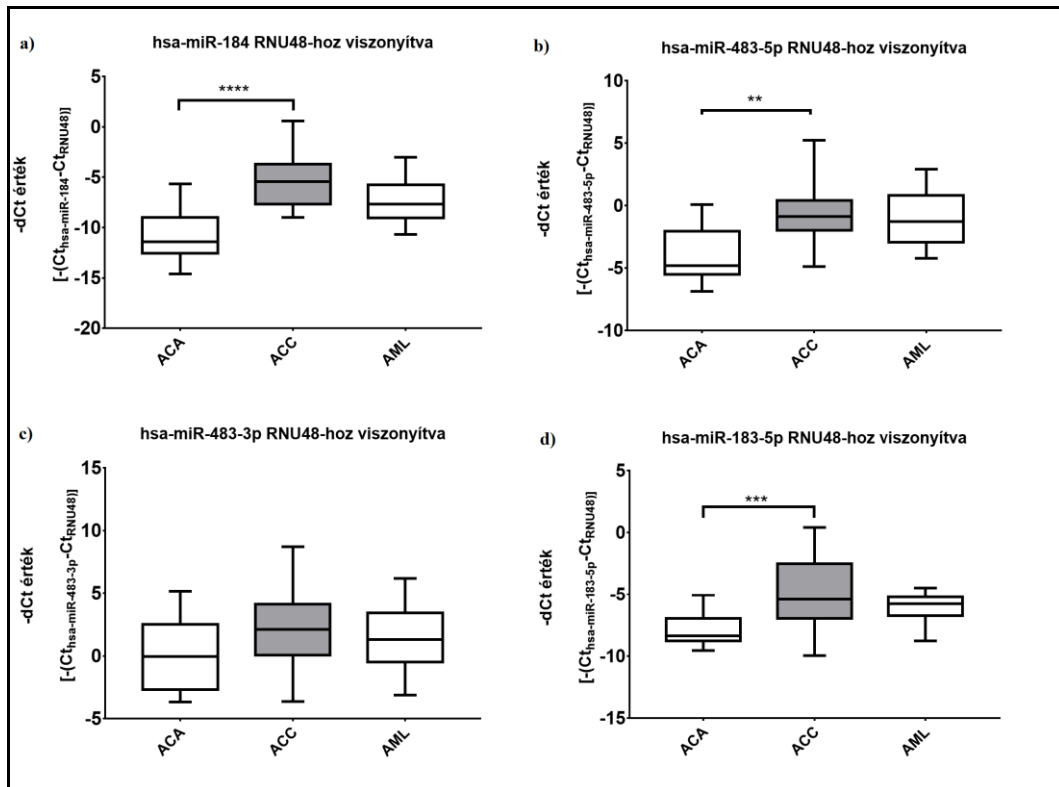
41 független FFPE minta alkotta a validációs kohorszot. Az NGS során szignifikáns eltérést mutató miRNS validálása sikeresnek bizonyult a szöveti mintákon. Az NGS során kiválasztott miRNS-ek szignifikánsan magasabb expresszióját tudtuk kimutatni AML-ben a másik két daganathoz képest valós idejű PCR-rel is. A *hsa-miR-451a*, *hsa-miR-486-5p* és a *hsa-miR-150-5p* szignifikáns felülexpresszióját figyeltük meg AML-ben ACA és ACC-hez képest. A *hsa-miR-363-3p* AML-ben szignifikánsan csak ACA mintákhoz képest volt felülexpresszált, az ACC mintákhoz képest csak tendencia volt megfigyelhető (5. ábra).



5. ábra: AML-ben a másik két daganathoz képest szignifikánsan felülexpresszáldott miRNS-ek validálása

A kiválasztott miRNS-ek $-dCt$ értékeinek átlaga \pm szórás: a) *hsa-miR-451a*, b) *hsa-miR-486-5p*, c) *hsa-miR-363-3p*, d) *hsa-miR-150-5p*. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Egyutas ANOVA vagy Kruskal-Wallis és Tukey vagy Dunn tesztek alkalmaztunk a Shapiro-Wilks normalitási teszt alapján. ACA: mellékvesekéregadenoma; ACC: mellékvesekéreg-rák; AML: mellékvese myelolipoma.

Az ACC-t a másik két daganattal összehasonlító validálás részben erősítette csak meg a szekvenáláskor kapott eredményeket. Szignifikáns felülexpressziót figyeltünk meg a *hsa-miR-184*, a *hsa-miR-483-5p* és a *hsa-miR-183-5p* esetében ACA mintákhoz képest, de AML mintákhoz képest nem kaptunk megerősítő eredményt (6. ábra). A *hsa-miR-483-3p* vizsgálata nem mutatott szignifikáns eltérést a vizsgált csoportok között. A power analízis a 41 mintát vizsgálva megmutatta, hogy a vizsgálat erőssége >99%.



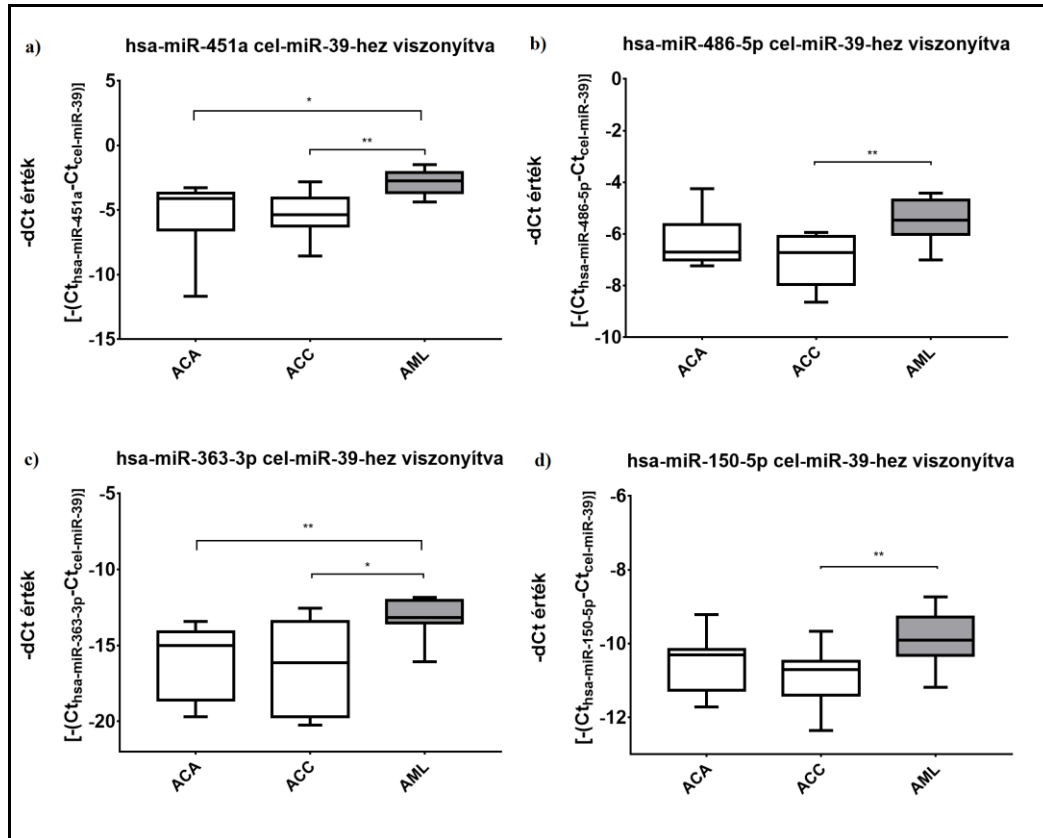
6. ábra: ACC-ben a másik két daganathoz képest szignifikánsan felülexpresszáldott miRNS-ek validálása valós idejű PCR-rel

A kiválasztott miRNS-ek $-dCt$ értékeinek átlaga \pm szórás: a) *hsa-miR-184*, b) *hsa-miR-483-5p*, c) *hsa-miR-483-3p*, d) *hsa-miR-183-5p*. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Egyutas ANOVA vagy Kruskal-Wallis és Tukey vagy Dunn tesztek alkalmaztunk a Shapiro-Wilks normalitási teszt alapján. ACA: mellékvesekéregadenoma; ACC: mellékvesekéreg-rák; AML: mellékvese myelolipoma.

4.1.3. miRNS expresszió vizsgálata plazmamintában

A szöveti eredmények biztató volta után plazmamintákon is megvizsgáltuk a kiválasztott miRNS-ek kifejeződését, hogy a keringő miRNS-ek között potenciálisan használható minimálisan invazív biomarkert találjunk. AML mintákban a *hsa-miR-451a* és a *hsa-miR-363-3p* miRNS-ek mutattak szignifikáns felülexpressziót a másik két

daganathoz képest (7. ábra). A *hsa-miR-486-5p* és a *hsa-miR-150-5p* szignifikáns felülexpressziót AML-ben csak ACC mintákhoz képest mutatott, ACA mintákhoz képest nem.

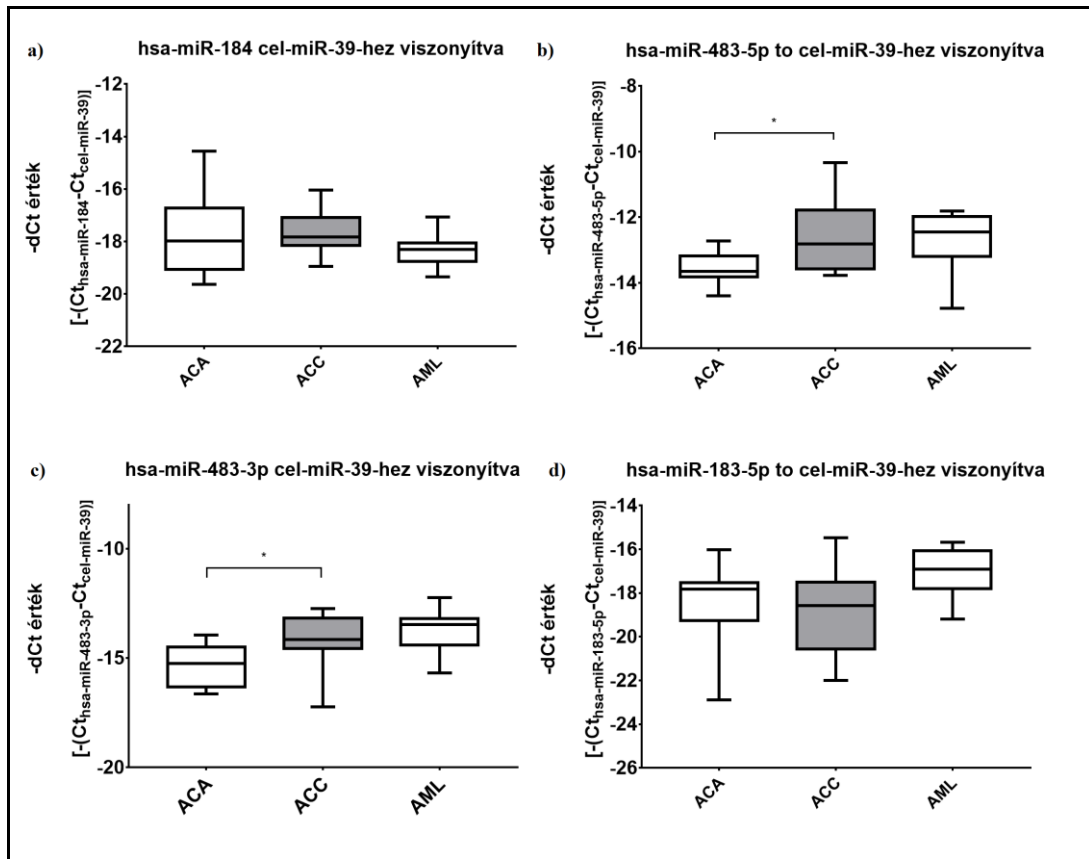


7. ábra: Felülexpresszáldott keringő miRNS-ek valós idejű PCR-rel AML-ben a másik két daganathoz képest

A kiválasztott miRNS-ek $-dCt$ értékeinek átlaga \pm szórás: a) *hsa-miR-451a*, b) *hsa-miR-486-5p*, c) *hsa-miR-363-3p*, d) *hsa-miR-150-5p*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Egyutas ANOVA vagy Kruskal-Wallis és Tukey vagy Dunn tesztek alkalmaztunk a Shapiro-Wilks normalitási teszt alapján. ACA: mellékvesekéreg-adenoma; ACC: mellékvesekéreg-rák; AML: mellékvese myelolipoma.

ACC-ben a másik két daganathoz képest nem mutattak szignifikáns eltérést a *hsa-miR-184* és a *hsa-miR-183-5p* miRNS-ek. A *hsa-miR-483-3p* és *hsa-miR-483-5p* miRNS-ek

szignifikánsan magasabb szintje volt megfigyelhető ACA mintákhoz képest (**8. ábra**). A power analízis alapján a vizsgálat - 11 mintával csoportonként - power értéke 99,85%.



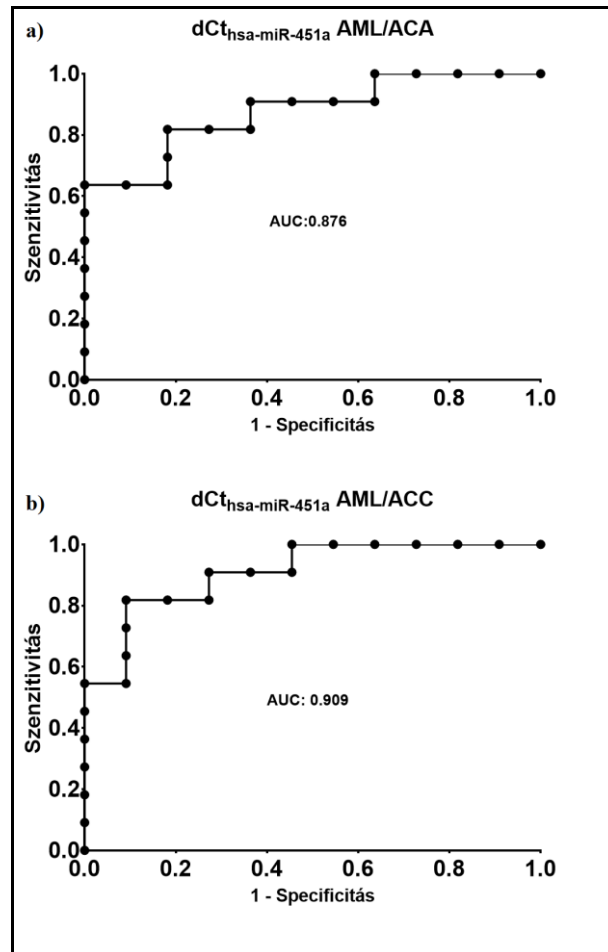
8. ábra: Felülexpresszáldott keringő miRNS-ek valós idejű PCR-rel ACC-ben a másik két daganathoz képest

Kiválasztott miRNS-ek $-dCt$ értékeinek átlaga \pm szórás: a) *hsa-miR-184*, b) *hsa-miR-483-5p*, c) *hsa-miR-483-3p*, d) *hsa-miR-183-5p*. * $p < 0,05$. Egyutas ANOVA vagy Kruskal-Wallis és Tukey vagy Dunn tesztek alkalmaztunk a Shapiro-Wilks normalitási teszt alapján. ACA: mellékvesekéreg-adenoma; ACC: mellékvesekéreg-rák; AML: mellékvese myelolipoma.

4.1.4. A miRNS-ek diagnosztikus hatékonyságának vizsgálata

A szöveti, illetve keringő miRNS-ek PCR vizsgálata után a legjobb eredményt mutató miRNS-ek diagnosztikus hatékonyságát is megvizsgáltuk. E miRNS-eket ROC-analízisnek vetettük alá. A *hsa-miR-451a* és a *hsa-miR-483-3p* keringő miRNS-ek vizsgálata mutatta a legnagyobb görbe alatti területet (area under curve, AUC). Ha AML mintákat ACC mintáktól akartuk elkülöníteni, az AUC 0.91 volt, ha ACA mintáktól, az AUC 0.88 volt (**9. ábra**). Ha AML-t ACC mintáktól különítettük el, a szenzitivitás 90,91%, a specificitás pedig 81,82% volt, ha a cut-off érték 3,994 volt. ACA mintáktól való elkülönítés esetén a szenzitivitás és a specificitás is egyaránt 81,82% volt, ha 3,676-ot vettük cut-off értéknek. Ha ACC kizárása a cél, a felülexpresszáldott *hsa-miR-451a* negatív prediktív értéke 83,33%, ha AML megerősítése cél, a pozitív prediktív érték 90% volt.

Vizsgálatunkban az ACC és ACA elkülönítésére legalkalmasabb keringő miRNS a *hsa-miR-483-3p* volt. 0.88-as AUC érték mellett 81,82%-os szenzitivitás és 90,91%-os specificitás volt elérhető, ha a cut-off értéket -14,42-re állítottuk.



9. ábra: A *hsa-miR-451a* diagnosztikus hatékonyságának felmérése ROC-analízis segítségével

AML-ben ACC és ACA mintákhoz viszonyított hsa-miR-451a ROC-görbéje: a) AML ACA mintákhoz viszonyítva; b) AML ACC mintákhoz viszonyítva. ACA: mellékvesekéreg-adenoma; ACC: mellékvesekéreg-carcinoma; AML: mellékvese myelolipoma

4.1.5. Útvonal-elemzés

A myelolipomában felülexpresszáldott négy miRNS (*hsa-miR-451a*, *hsa-miR-486-5p*, *hsa-miR-363-3p* és *hsa-miR-150-5p*) olyan mRNS-eket céloznak, melyek a zsírsavszintézisben, zsírsavlebontásban, illetve a zsírsavmetabolizmusban szerepelnek (8. táblázat: AML-ben felülexpresszáldott miRNS-ek útvonal-elemzésének

eredménye **8. táblázat** (8. táblázat). A gének, melyekről a mRNS-ek átíródnak (3-oxoacyl-ACP synthase, mitochondrial; enoyl-CoA, hydratase/3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase; cytochrome P450, family 4, subfamily A, member 22) p <0,0001 értéket mutattak.

8. táblázat: AML-ben felülexpresszáldott miRNS-ek útvonal-elemzésének eredménye

CYP4A22: Cytochrome P450, family 4, subfamily A, member 22; EHHADH: Enoyl-CoA and 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase; GABA: Gamma-aminobutyric acid; GABRA4: Gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha 4 subunit; GABRB3: Gamma-aminobutyric acid type A receptor beta 3 subunit; KEGG: Kyoto Encyclopaedia of Genes and Ganomes; NSF: N-ethylmaleimide sensitive factor, vesicle fusing ATPase; OXSM: 3-oxoacyl-ACP synthase, mitochondrial; PNPO: pyridoxamine 5,-phosphate oxidase; SLC12A5: Solute carrier, family 12, member 5; SLC38A1: Solute carrier, family 38, member 1.

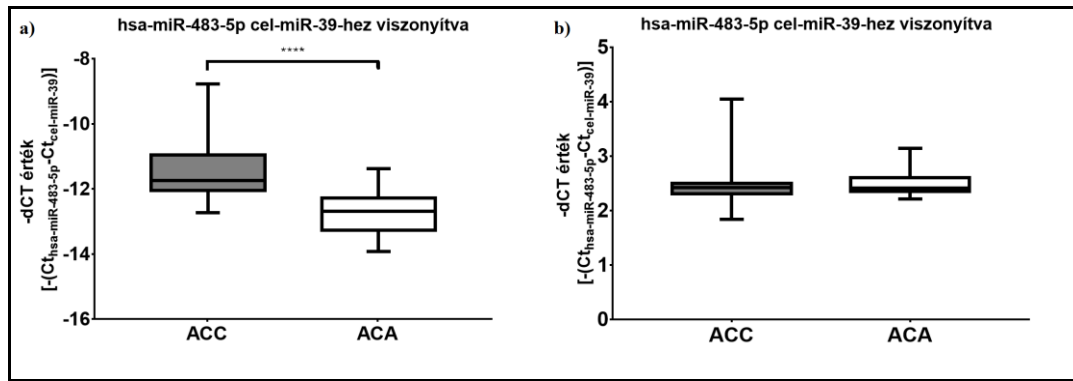
KEGG útvonal	p-érték	Gén
Zsírsv metabolizmus (hsa01212)	<0.0001	OXSM, EHHADH
Zsírsv lebontás (hsa00071)	<0.0001	CYP4A22, EHHADH
GABAerg szinapszis (hsa04727)	<0.0001	SLC38A1, GABRB3, NSF, GABRA4, SLC12A5
Zsírsv bioszintézis (hsa00061)	<0.0001	OXSM
B6 vitamin metabolizmus (hsa00750)	<0.001	PNPO

4.2. A *hsa-miR-483-5p* expressziójának összehasonlítása ACC és ACA betegek plazma és vizeletmintáiban

4.2.1. *hsa-miR-483-5p* expresszió analízis valós idejű PCR-rel plazma és vizeletmintákon

23-23 plazma- és vizeletminta került a vizsgálatba mellékvesekéreg-rákban és mellékvesekéreg-adenomában szenvedő betegektől. A plazmamintákat vizsgálva, a keringő *hsa-miR-483-5p* szignifikánsan magasabb szintjét találtuk ACC mintákban ACA mintákhoz képest ($p < 0,0001$) (**10. ábra**), ami a korábbi eredményeknek megfelel. Vizeletmintákban nem találtunk szignifikáns különbséget ACC és ACA minták között a *hsa-miR-483-5p* expresszióban.

A keringő és vizelet *hsa-miR-483-5p* szintek között nem figyeltünk meg korrelációt. A *hsa-miR-483-5p* szintje és a betegek egyes laborparaméterei között sem találtunk szignifikáns összefüggést (bazális kortizol, vizelet szabad kortizol, kortizol dexametazon teszt után). Továbbá, nem találtunk különbséget a *hsa-miR-483-5p* expresszióban akkor sem, ha hormontermelés szerint felosztottuk a daganatokat, sem plazma-, sem vizeletmintákban.

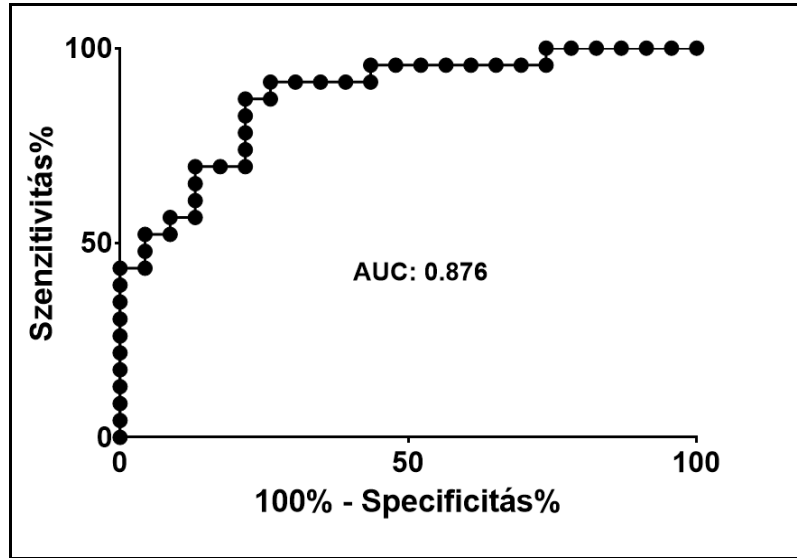


10. ábra: *hsa-miR-483-5p* expressziója ACC és ACA betegekben

a) plazmamintákban; b) vizeletmintákban. *Hsa-miR-483-5p* $-dCt$ értékeinek átlaga \pm szórása. **** $p < 0,0001$. Student-féle t -teszt vagy Mann-Whitney-tesztet alkalmaztunk a Shapiro-Wilks normalitási teszt eredménye alapján. ACA: mellékvesekéreg-adenoma; ACC: mellékvesekéreg-rák.

4.2.2. A plazma *hsa-miR-483-5p* diagnosztikus hatékonysága

ROC-analízist végeztünk a plazma *hsa-miR-483-5p* minimálisan invazív biomarkerként való használhatóságának felmérésére. Carcinoma és adenoma minták elkülönítésekor az AUC 0.88 volt, illetve 12,05-ös cut-off érték mellett a specificitás 78,3%, a szenzitivitás 87% volt (**11. ábra**).



11. ábra: A *hsa-miR-483-5p* diagnosztikus hatékonyságának vizsgálata ROC-analízissel

Diagnosztikus hatékonyság vizsgálat, mely megmutatja, hogy milyen hatékonysággal különíti el az ACC-t ACA-tól az adott miRNS vizsgálata. ACA: mellékvesekéreg-adenoma; ACC: mellékvesekéreg-rák; AUC: area under curve (görbe alatti terület).

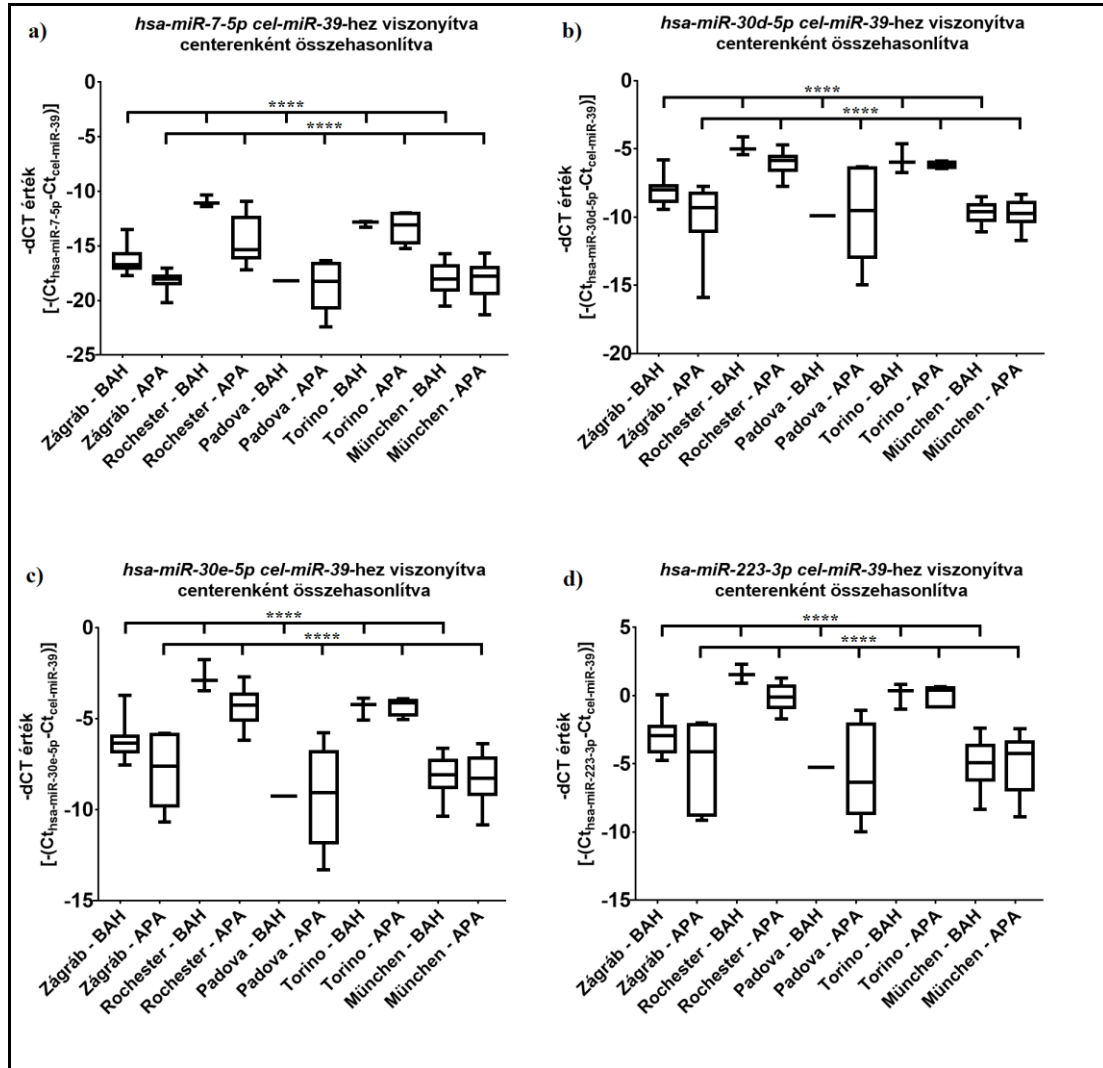
4.3. miRNS profilozás primer aldosteronismusban

4.3.1. miRNS expresszió profilozás plazmamintákból NGS-sel

A 30 mintán elvégzett újgenerációs szekvenálás során összesen 50 szignifikánsan eltérően expresszálódó miRNS-t találtunk APA és BAH mintákban NGS-sel. Az elsődleges adatelemzés során többszörös statisztikai analízist végeztünk és azon miRNS-ek, melyek legnagyobb különbséget mutatták APA és BAH betegek között [*hsa-miR-30e-5p* ($p = 0,0005$), *hsa-miR-223-3p* ($p = 0,0039$), *hsa-miR-30d-5p* ($p = 0,0091$) és a *hsa-miR-7-5p* ($p = 0,0134$)] valós idejű PCR validálásra kerültek egy független mintákból álló kohorszon. Az újgenerációs szekvenálási adatok a Gene Expression Omnibus (GEO) publikus adatbázisban található a GSE126386 azonosítószám alatt. Statisztikai power elemzés azt mutatta, hogy a vizsgálat power értéke > 0.99 .

4.3.2. A kiválasztott miRNS-ek valós idejű PCR validálása

A szekvenálás során kiválasztott négy miRNS-t (*hsa-miR-7-5p*, *hsa-miR-30d-5p*, *hsa-miR-30e-5p* és *hsa-miR-223-3p*) 93 mintából álló független validációs kohorszon vizsgáltuk RT-qPCR segítségével. A különböző centrumokból származó, de azonos minták között szignifikáns különbséget tudtunk kimutatni (**12. ábra**).

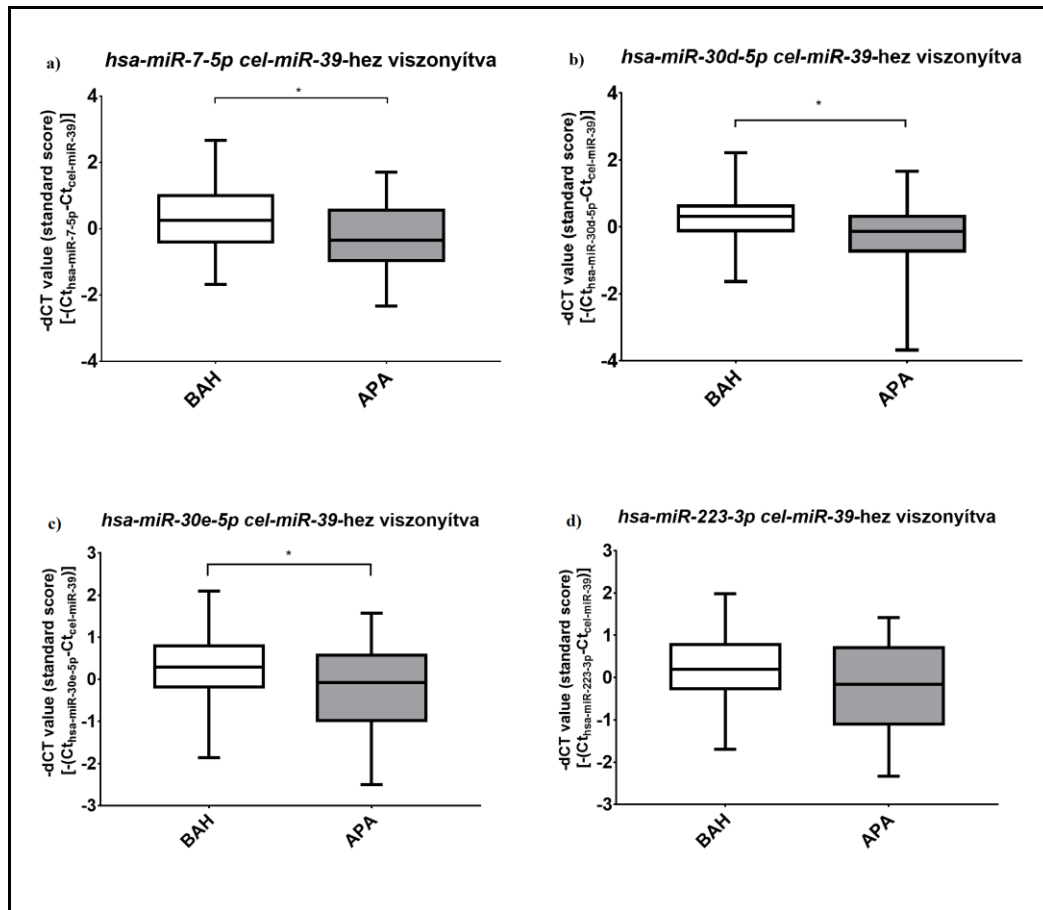


12. ábra: Az azonos minták összehasonlítása különböző centrumokból

A kiválasztott miRNS-ek $-dCt$ értékeinek átlaga és szórása. a) $hsa-miR-7-5p$, b) $hsa-miR-30d-5p$, c) $hsa-miR-30e-5p$, d) $hsa-miR-223-3p$. Szignifikáns különbségek láthatók a az APA és BAH minták között, ha centrumonkénti összehasonlítást vizsgálunk. Egyúttal ANOVA vagy Kruskal-Wallis teszt a Shapiro-Wilks normalitási teszt alapján. **** $< 0,0001$. APA: aldosteron-termelő adenoma; BAH: bilaterális adrenális hyperplasia.

A BAH magasabb expressziója APA csoportokhoz viszonyítva a legtöbb esetben látható. A különböző centrumokból érkezés miatti eltéréseket kiküszöbölendő, a $-dCt$ értékek standard score-jait hasonlítottuk össze (13. ábra). A szekvenálás során

kiválasztott négy szignifikánsan eltérő expressziójú miRNS-ből három validálása sikeres volt. BAH mintákban a *hsa-miR-30e-5p* ($p=0,04$), a *hsa-miR-30d-5p* ($p=0,02$) és a *hsa-miR-7-5p* ($p=0,016$) mutatott szignifikáns felülexpressziót APA mintákhoz viszonyítva. A *hsa-miR-223-3p* tendenciózan magasabb szintjét figyeltük meg BAH mintákban APA mintákhoz képest ($p=0,15$). A 12. ábra a mintacsoportok szórásai között nem elhanyagolható különbséget mutat. A BAH minták miRNS expresszió szintjét relatív homogenitást mutatnak az APA heterogénebb megjelenéséhez képest. Vizsgáltunk még további esetleges összefüggéseket is, de a miRNS expresszióval nem találtunk összefüggésbe hozható klinikai paramétert (tumorméret, lateralizációs index, két oldali aldosteron szint aránya, bazális aldosteron szint).



13. ábra: A kiválasztott miRNS-ek expressziója APA és BAH mintákban

A kiválasztott miRNS-ek $-dCt$ értékeinek átlaga és szórása. a) *hsa-miR-7-5p*, b) *hsa-miR-30d-5p*, c) *hsa-miR-30e-5p*, d) *hsa-miR-223-3p*. Student féle *t*-teszt Welch

korrekcióval vagy Mann Whitney teszt a Shapiro-Wilks normalitási teszt alapján. * $<0,05$. APA :aldoszteron-termelő adenoma; BAH: bilaterális adrenális hyperplasia.

4.3.3. A keringő miRNS-ek diagnosztikus hatékonysága

A szekvenálás és validálás után is, az APA és BAH minták között szignifikáns különbséget mutató miRNS-ek (*hsa-miR-7-5p*, *hsa-miR-30e-5p*, *hsa-miR-30d-5p*) diagnosztikus hatékonyságát vizsgáltuk ROC-analízis segítségével. A *hsa-miR-7-5p* 0,64-es görbe alatti területet (AUC) mutatott és 61,7%, illetve 58,7%-os specificitás és szenzitivitás értékeket, ha a cut-off 0,13 volt. A *hsa-miR-30d-5p* hasonlóképpen 0,64-es AUC-t mutatott és a szenzitivitás és specificitás értékek is megegyeztek (58,7% és 61,7%), ha a cut-off 0,05 volt. A *hsa-miR-30e-5p* valamivel gyengébb AUC értéket mutatott (0,61), szenzitivitás és specificitás értékek ugyanúgy 58,7% és 61,7% volt, ha a cut-off érték 0,06 volt.

5. Megbeszélés

5.1. miRNS expresszió profilozás mellékvese myelolipomában, mellékvesekéreg-rákban és mellékvesekéreg-adenomában

Legjobb tudomásunk szerint ez az első olyan munka, mely a mellékvese myelolipoma miRNS expressziós mintázatát vizsgálta. NGS során észlelt 256 szignifikánsan eltérő kifejeződést mutató miRNS közül a 8 legnagyobb eltérést mutató miRNS-t választottunk ki validálásra, melyek szignifikánsan eltérő kifejeződésűek voltak a három daganatban. AML-ben szignifikánsan magasabb szintje volt a *hsa-miR-451a*, a *hsa-miR-486-5p*, a *hsa-miR-363-3p* és a *hsa-miR-150-5p* miRNS-eknek a másik két daganatban mértékhez képest. Hasonlóan, a *hsa-miR-184*, a *hsa-miR-483-3p*, a *hsa-miR-483-5p* és a *hsa-miR-183-5p* szignifikánsan magasabb szintjét találtuk ACC-ben a másik két daganathoz viszonyítva. A *hsa-miR-184* [136, 175], *hsa-miR-483-3p* [170] és a *hsa-miR-483-5p* [166, 170, 176, 177] miRNS-eket már korábban is leírták, mint mellékveserákban megváltozott kifejeződésű miRNS-eket. A *hsa-miR-183-5p* expresszióját eddig csak pheochromocytomában vizsgálták, így tudomásunk szerint mi vizsgáltuk először szintjének különbözőségét ACC, ACA és AML mintákban [185].

AML-ben a másik két daganathoz képest szekvenálás során szignifikánsan felülexpresszáldó négy miRNS közül hármat megerősített a valós idejű PCR validálás (*hsa-miR-451a*, *hsa-miR-486-5p* és *hsa-miR-150-5p*). Az ACC-ben ACA-hoz és AML-hez képest szignifikánsan magasabb szintet mutató miRNS-ek közül a *hsa-miR-483-5p*, *hsa-miR-184* és a *hsa-miR-183-5p* szignifikáns felülexpresszióját tudtuk megerősíteni PCR validálással ACA mintákhoz viszonyítva, míg AML mintákhoz viszonyítva nem. A keringő *hsa-miR-483-5p* esetében ez egybevág korábbi megfigyelésekkel is [35, 36, 167]. A *hsa-miR-483-3p* szignifikánsan magasabb szintjét nem tudtuk kimutatni ACC-ben, csupán tendenciózus felülexpressziót. A miRNS-ek szignifikánsan magasabb szintje ACC-ben csak ACA-hoz – de nem AML-hez – képest érdekes. Az ACC és AML patogenezise is eddig ismeretlen, tehát hipotézis szintjén felvethető, hogy a két daganat kialakulásának lehetnek közös elemei is.

AML-ben mind ACA-hoz, mind ACC-hez képest szignifikánsan magasabb volt a *hsa-miR-451a* és a *hsa-miR-363-3p* plazmában található keringő miRNS-ek szintje. A másik két miRNS (*hsa-miR-486-5p* és *hsa-miR-150-5p*) szintje is szignifikánsan magasabb volt AML-ben ACC-hez képest, de ACA mintákhoz képest nem. Megerősítettük a korábbi megfigyeléseket, miszerint a *hsa-miR-483-5p* és *hsa-miR-483-3p* miRNS-ek szignifikánsan felülexpresszálnak ACC mintában ACA mintákhoz képest [174–177]. A korábbi kutatások szerint is, a mellékvesekéreg-rák eddigi legjobb markere a *hsa-miR-483-5p* [174, 176, 177]. Klinikailag releváns megfigyelés, hogy jelen vizsgálatunkban a *hsa-miR-483-5p* szignifikánsan magasabb szintje ACC mintákban csak ACA mintákhoz képest volt látható, AML mintákhoz viszonyítva nem. Ez a *hsa-miR-483-5p* keringő miRNS biomarker klinikai alkalmazhatóságának korlátját jelentheti a jövőben.

A myelolipomában szignifikánsan felülexpresszáldott miRNS-ek együttes útvonal-elemzése megmutatta, hogy ezek a miRNS-ek a zsírsavmetabolizmushoz köthetők, mely egyértelmű kapcsolat tudva, hogy a myelolipoma egyik alkotóeleme zsírszövet. Az általunk leírt miRNS-ek egyéb daganatokban betöltött szerepéről is lehet olvasni egyéb közleményekben. A *hsa-miR-451a* szignifikánsan alacsonyabb szintjét leírták tüdő adenocarcinomájában [186] és melanomában is [187]. Ugyanakkor szignifikáns felülexpresszióját találták hasnyálmirigy ductalis adenocarcinomájában [188] és papilláris pajzsmirigyrákban [189]. Ezt magyarázza a miRNS-ek szövetspecifitása és azon tulajdonsága, hogy akár az egyik sejtben tumorszuppresszorként, míg egy másik szövetben onkogénként is funkcionálhatnak [134]. A *hsa-miR-486-5p* a legtöbb daganatban alulexpresszált (pl. colorectalis carcinoma, tüdőrák, emlőrák) és így tumorszuppresszorként említik [190–194]. A *hsa-miR-363-3p* és a *hsa-miR-150-5p* is szintén alulexpresszált egyéb daganatokban [195–198]. Myelolipomában az előbb említett daganatokhoz képest vizsgálatunkban felülexpresszálnak találtuk az említett miRNS-eket. A *hsa-miR-451a* és a *hsa-miR-486-5p* miRNS-eket magas arányban tartalmazzák vörösvértetek. A *hsa-miR-451* szerepét a vérképzésben is jelentősnek tartják [199, 200]. Említettek megerősíti és kiegészíti azon megfigyelés is, mely szerint e két miRNS egészséges emberek vérében is viszonylag nagy arányban fordul elő [201]. A *hsa-miR-363* az adipogenezis szabályozásában játszik szerepet egy

tanulmány szerint [202]. E mikroRNS-ek eltérő kifejeződése a zsír és vérképzőszervi elemek myelolipomában ismert jelenlétével összefügghet.

A vizsgált miRNS-ek közül a *hsa-miR-451a* tűnik a legalkalmasabbnak az AML minimálisan invazív biomarkereként. A mellékvesekéreg-rák diagnosztikájának fontos eszköze lehet, további validálás után a klinikai gyakorlatba történő bevezetése is szóba jöhet.

A vizsgálatunk korlátját jelentheti az elemszám szűkössége. A mellékvesekéreg-rák nagyon ritka betegség, és a myelolipomákat az esetek nagy részében nem műtik meg. Így a szöveti minták gyűjtése nehézkes. Plazmamintákból 11-11 mintát tudtunk bevinni a vizsgálatba daganatcsoportonként. Bár az elemszám kicsinek tűnhet, a statisztikai power analízis eredményeként mind szöveti, mind plazmamintákon >99% a vizsgálatunk erőssége. A mintaszám bővítésével a prediktív értékek várhatóan tovább növelhetők lehetnének.

5.2. A *hsa-miR-483-5p* expressziójának összehasonlítása ACC és ACA betegek plazma és vizeletmintáiban

A mellékvesekéreg-rák egy rossz prognózisú daganat, mely differenciáldiagnosztikai kihívásokat rejt. Sajnos jelenleg nem áll rendelkezésre olyan testfolyadékából vizsgálható marker, amivel a daganatok dignitása még a műtét előtt elkülöníthető lenne. Több vizsgálat alapján a keringő miRNS-ek erre alkalmasak lehetnek. Az utóbbi időkben több kutatás is vizsgálta a miRNS-eket az ACC diagnosztikájában. Több közlemény is a minimálisan invazív keringő *hsa-miR-483-5p* miRNS-t találta a legalkalmasabbnak az ACC és ACA elkülönítésére. Vizsgálatunkban – tudomásunk szerint először - kísérletet tettünk a vizeletben található *hsa-miR-483-5p* vizsgálatára és annak felmérésére, hogy e non-invazív mérés is alkalmas lehet-e a két daganat megkülönböztetésére.

A plazmaminták vizsgálatakor a korábbi közléseknek megfelelő eredményt kaptunk, azaz a *hsa-miR-483-5p* szignifikánsan felülexpresszált volt ACC mintákban az ACA mintákhoz képest [176]. A vizeletmintákban a *hsa-miR-483-5p*-t ki tudtuk mutatni, azonban nem találtunk szignifikáns eltérést a két daganatcsoport között. Korrelációt sem

tudtunk megfigyelni a fenti két csoport között. Az irodalomban az urológiai példaktól eltekintve nagyon ritkán található korreláció plazma és vizelet miRNS expresszióban. Példaként szolgálhat a gyomorrákos betegek vizeletében megfigyelt felülexpresszált *hsa-miR-21-5p*, mely plazmamintákat vizsgálva 40 közleményből kilencben hasonló kifejeződésű [156]. Emlőrákos betegek vizeletében a *hsa-miR-155* magasabb szintjét találták, ám e miRNS szintjét plazmamintákban egyaránt találták már emelkedettnek és csökkentnek is [158, 203, 204]. További, nem-urológiai daganatokban semmilyen korrelációt nem találtak vizelet és plazma miRNS expresszió között. Ennek magyarázata egyelőre nem ismert, amihez hozzájárul, hogy a miRNS-ek testfolyadékba való kiáramlásának mechanizmusa alig ismert, és a miRNS-ek vérből vizeletbe jutásának mechanizmusait ismereteink szerint még nem is vizsgálták [178]. A *hsa-miR-483-5p* diagnosztikus alkalmazhatóságát ROC-analízissel vizsgáltuk és hasonló eredményeket kaptunk korábbi vizsgálatainkhoz (korábban: szenzitivitás 88,9% specificitás 75%; itt: szenzitivitás 87%, specificitás 78,3%) [175]. Korábban, extracelluláris vezikula-asszociált miRNS-eket vizsgálva 94,4%-os specificitást írt le kutatócsoportunk [177]. Extracelluláris vezikula asszociált miRNS-eket jelen tanulmányban nem vizsgáltunk, mert a vizeletben található vezikulák nagyrészt a vizeletelvezető rendszer csatornáinak falából származnak irodalmi adatok szerint [205].

5.3. miRNS expressziós profilozás primer aldosteronismusban

Az aldosteron-termelő adenoma kialakulásáról számos ismeret rendelkezésre áll, több gén eltéréseit írták le patogenezisében, ugyanakkor a bilaterális adrenális hyperplasia eredete jóformán ismeretlen. [206].

Vizsgálatunkban a szekvenálást követő adatelemzés során 50 szignifikánsan eltérő expressziót mutató miRNS-t találtunk, melyek közül a négy legígéretesebbet választottuk ki validálásra. Ezek közül három miRNS (*hsa-miR-7-5p*, *hsa-miR-30e-5p* és *hsa-miR-30d-5p*) szignifikánsan magasabb kifejeződését találtuk BAH mintákban APA mintákhoz képest. A *hsa-miR-223-3p* nem szignifikáns, de tendenciózan magasabb kifejeződését találtuk a BAH betegcsoportban APA mintákhoz képest. Patogenetikai relevanciájuk primer aldosteronismusban nem ismert. Ahogy az irodalmi

bevezetőben már szerepel, egy vizsgálat szerint a szöveti *hsa-miR-7* és *hsa-miR-375* szignifikánsan alulexpresszálódik APA mintákban unilaterális adrenális hyperplasia és egészséges mellékvesekéreg mintákhoz képest [182]. A másik három miRNS egészséges emberek plazmamintáihoz képest alacsonyabb arányban fordult elő primer hypertoniás betegekében [207]. E szórványos megfigyelések alapján nem kizárt, hogy ezek a miRNS-ek a vérnyomás szabályozásában szerepet játszhatnak.

A miRNS-ek –dCt értékben kifejezett expressziója a mintákat küldő centrumokban eltéréseket mutatott. A 12. ábra jól illusztrálja ezt a különbséget, illetve hogy a centrumok többségében a BAH mintákban felülexpresszió figyelhető meg APA mintákhoz képest. Az eltérés legvalószínűbb oka a centrumok közötti preanalitikai különbségekben (minta vétele és tárolása) rejtőzhet.

Mind a négy miRNS expressziójának szórása APA mintákban nagyobb, mint BAH mintákban. Erre magyarázatul szolgálhat az, hogy az APA egy genetikailag heterogénebb betegség, mint a BAH [104, 105]. Az sem kizárható jelenlegi tudásunk alapján, hogy a primer aldosteronismus formái egy ugyanazon spektrum különböző súlyosságú és megjelenésű betegségeit jelentik [208, 209].

Az általunk vizsgált miRNS-ek egyéb betegségek kapcsán is leírásra kerültek. A *hsa-miR-7-5p* alulexpresszált idiopathiás gyulladással myopathiában és nyelvcső laphámsejtes rákjában egészséges egyénekhez viszonyítva [210, 211]. A miRNS felülexpresszióját találták akut hasnyálmirigy-gyulladásban, neuroendokrin tumorokban és 2-es típusú cukorbetegségben is egészséges egyénekhez viszonyítva [212–214]. Tumorsuppresszor miRNS-ként említik hasnyálmirigy ductalis adenocarcinómában és húgyhólyagrákban is, illetve a melanoma sejtek proliferációját is gátolja [215–217]. A keringő *hsa-miR-30e-5p* szisztémás lupus erythematosusban felülexpresszált, míg alulexpresszált olyan betegekben, akik mitrális billentyű rupturán estek át egészséges kontrollokhoz viszonyítva [218, 219]. A szöveti *hsa-miR-30d-5p* kissejtes tüdőrákban tumorsuppresszor miRNS-ként funkcionálhat [220].

A szelektív mellékvesevéna-katéterezés szenzitivitás és specificitás értékei 95,2% és 100%, ha 4-es lateralizációs indexet vesszük cutoff pontnak [114]. Ezzel szemben az általunk leírt miRNS-ek - melyek szignifikáns felülexpressziót mutattak BAH mintákban APA mintákhoz képest – diagnosztikus hatékonysága ettől messze elmarad,

így nem teszi lehetővé klinikai alkalmazásukat, azonban utalhat a két entitás patogenetikai különbségeire.

6. Következtetések

Vizsgálatainkkal egyes mellékvesekéreg-daganatok és betegségek differenciál diagnosztikájának könnyítésére tettünk kísérletet. Mi vizsgáltuk először a szöveti és keringő miRNS expressziót mellékvese myelolipomában, a keringő miRNS-ek kifejeződését aldosteron-termelő adenomában és bilaterális adrenális hyperplasiában. Továbbá mi vizsgáltuk először a vizelet miRNS-eket mellékvesekéreg-rákban és adenomában. A vizsgálataink eredményeinek fő következtetései az alábbiak:

- 1.1. A mellékvesekéreg-rák, mellékvesekéreg adenoma és a mellékvese myelolipoma szöveti miRNS expressziója szignifikáns mértékben különbözik egymástól. Ezt újgenerációs szekvenálással és RT-qPCR segítségével bizonyítottuk. Mellékvesekéreg-rákban szignifikánsan felülexpresszálódik a szöveti *hsa-miR-183-5p*, a *hsa-miR-184* és a *hsa-miR-483-5p* mellékvesekéreg adenomához képest, míg mellékvese myelolipomában a *hsa-miR-150-5p*, a *hsa-miR-451a* és a *hsa-miR-486-5p* expresszálódott szignifikánsan magasabb arányban a másik két daganathoz képest.
- 1.2. Keringő miRNS-ek vizsgálatakor mellékvesekéreg-rákban a *hsa-miR-483-3p* és a *hsa-miR-483-5p* szignifikáns felülexpresszióját mutattuk ki mellékvesekéreg-adenomához képest. Mellékvese myelolipomában a *hsa-miR-451a* és a *hsa-miR-363-3p* szignifikáns felülexpresszióját találtuk a másik két daganathoz képest.
- 1.3. A *hsa-miR-483-5p* szignifikáns felülexpressziója csak mellékvesekéreg-adenomához képest volt kimutatható, myelolipomához képest nem. E miRNS-t eddig a mellékvesekéreg-rák legjobb biomarkerének tartják, azonban e megfigyelés klinikai alkalmazhatóságát korlátozhatja.
- 1.4. A *hsa-miR-451a* szignifikáns felülexpressziót mutatott myelolipomában a másik két daganathoz képest. Meggyőző szenzitivitás és specificitás értékeket (adenomától való elkülönítés esetén szenzitivitás és specificitás is egyaránt 81,82% volt; carcinomától való elkülönítés esetén a szenzitivitás 90,91%, a specificitás 81,82% volt) elérvén további vizsgálatok után a klinikai gyakorlatba is bevezethető lehet e miRNS, mint a mellékvese myelolipoma minimálisan invazív biomarkere.

- 2.1. Vizsgálatunkban megerősítettük a keringő *hsa-miR-483-5p* szignifikánsan magasabb kifejeződését mellékvesekéreg-rákban mellékvesekéreg-adenomához képest.
- 2.2. A vizeletben a *hsa-miR-483-5p* kimutatható, azonban a mellékvesekéreg-rák és mellékvesekéreg-adenoma betegek vizeletmintáiban expressziójában nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni. Így megállapítható, hogy e betegségek elkülönítésére a vizelet *hsa-miR-483-5p*, mint non-invazív biomarker nem alkalmas.
- 3.1. A keringő *hsa-miR-7-5p*, a *hsa-miR-30d-5p* és a *hsa-miR-30e-5p* szignifikánsan magasabb szintjét tudtuk kimutatni bilaterális adrenális hyperplasiában aldoszteron-termelő adenomához képest mind újgenerációs szekvenálással, mind RT-qPCR-rel. A nem kielégítően magas szenzitivitás és specificitás értékek következtében e miRNS-ek jelen tudásunk szerint nem tűnnek használhatónak a klinikai gyakorlatban.
- 3.2. A miRNS expresszió bilaterális adrenális hyperplasiában homogénebb képet nyújtott, mint aldoszteron-termelő adenomában, mely az irodalom alapján is egy genetikailag heterogénebb betegség. Eredményeink is alátámasztani látszanak azt a feltételezést, hogy e két primer aldosteronismust okozó betegség egy ugyanazon spektrum két különböző súlyosságú és megjelenésű betegségét jelentik.

7. Összefoglalás

Vizsgálatainkban, a kutatócsoportunk által már korábban is sokrétűen tanulmányozott mikroRNS-ek alkalmazhatóságát vizsgáltuk több kérdésben: 1. a szöveti és keringő mikroRNS-ek kifejeződésének különbségeit mellékvese myelolipomában (AML), mellékvesekéreg-adenomában (ACA) és carcinomában (ACC); 2. a keringő és vizelet *hsa-miR-483-5p* eltéréseit ACA és ACC között; valamint 3. a primer aldosteronismust okozó egyoldali adenoma (APA) és kétoldali hyperplasia (BAH) esetleges elkülönítését lehetővé tévő keringő mikroRNS-eket. Eredményeink alapján AML-ben a szöveti és a keringő *hsa-miR-451a* kifejeződése szignifikánsan magasabb, mint ACC-ben és ACA-ban. A miRNS ROC-analízissel vizsgált diagnosztikus hatékonysága ACA-tól (szenzitivitás és specificitás egyaránt 81,8%) és ACC-től (szenzitivitás 90,9%, specificitás 81,8%) való elkülönítés esetén is magas volt. A korábbi megfigyelésekkel egyezően a *hsa-miR-483-5p* szignifikánsan magasabb expresszióját tudtuk kimutatni ACC-ben ACA-hoz képest szöveti és plazmamintákban is. A miRNS expressziójában AML és ACC között nem tudunk kimutatni szignifikáns különbséget. A vizelet *hsa-miR-483-5p* kifejeződésében a két daganat között szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk. A primer aldosteronismust okozó két legfőbb betegség keringő miRNS expressziós mintázatának összehasonlításakor három miRNS is szignifikáns felülexpressziót mutatott BAH-ban APA-hoz képest (*hsa-miR-7-5p*, *hsa-miR-30d-5p* és *hsa-miR-30e-5p*). A BAH homogénebb csoportnak tűnik a miRNS expresszió alapján, mint az APA. Diagnosztikus hatékonyságot vizsgálva a miRNS-ek egyaránt 58,7%-os szenzitivitást és 61,7%-os specificitást mutatott. Következtetésként levonható, hogy a *hsa-miR-451a* a AML minimálisan invazív biomarkere lehet a jövőben, mely az ACC diagnosztikájában is szerepet kaphat. Az ACC eddigi legjobb biomarkerének tartott *hsa-miR-483-5p* AML-hez képest nem mutatott szignifikáns eltérést, így ez a továbbiakban klinikai alkalmazhatóságának korlátját jelentheti. A vizelet *hsa-miR-483-5p* nem alkalmas az ACC non-invazív biomarkerének. A BAH-ban APA-hoz képest felülexpresszáldott három miRNS diagnosztikus hatékonysága klinikai alkalmazásukat nem teszi lehetővé, de utalhat a két entitás patogenetikai különbségeire.

8. Summary

Following our research group's focus, we studied the applicability of miRNAs in three major aspects: 1. Comparison of tissue and circulating miRNA expression between adrenal myelolipoma (AML), adrenocortical adenoma (ACA) and cancer (ACC); 2. Potential differences in circulating and urinary *hsa-miR-483-5p* between ACA and ACC; 3. Circulating miRNA expression profiling of primary aldosteronism subtypes aldosterone producing adenoma (APA) and bilateral adrenal hyperplasia (BAH). Regarding our results, tissue and circulating *hsa-miR-451a* was significantly overexpressed in AML compared to ACA and ACC. For the evaluation of the diagnostic applicability of the miRNA, ROC-analysis was performed that showed 81.8% sensitivity and specificity when differentiating from ACA and 90.9% sensitivity and 81.8% specificity when differentiating from ACC. In concert with previous findings, significant overexpression of tissue and circulating *hsa-miR-483-5p* in ACC could be demonstrated in comparison with ACA. The expression of *hsa-miR-483-5p* didn't show any significant difference between AML and ACC. Regarding urinary miRNA expression, no significant differences could be demonstrated between ACA and ACC. In the miRNA expression profiles of primary aldosteronism subtypes, three significantly differentially expressed miRNAs overexpressed in BAH were discovered (*hsa-miR-7-5p*, *hsa-miR-30d-5p*, *hsa-miR-30e-5p*). Based on the miRNA expression, BAH seems to be more homogenous than APA. The miRNAs showed the same diagnostic applicability with sensitivity of 58.7% and specificity of 61.7%. In conclusion, *hsa-miR-451a* could be a potential minimally invasive biomarker of AML in the future, that might play role in the diagnostics of ACC. *Hsa-miR-483-5p*, the so far best biomarker of ACC didn't differ in tissue or circulating miRNA expression profiles of AML and ACC. This finding might limit its further clinical applicability. Urinary *hsa-miR-483-5p* is not suitable as a non-invasive marker in the diagnostics of ACC. The diagnostic applicability of the three overexpressed miRNAs in BAH compared to APA do not facilitate their clinical application, but might indicate differences in the pathogenesis of these two entities.

9. Irodalomjegyzék

1. Bovio S, Cataldi A, Reimondo G, Sperone P, Novello S, Berruti A, Borasio P, Fava C, Dogliotti L, Scagliotti G V., Angeli A, Terzolo M. (2006) Prevalence of adrenal incidentaloma in a contemporary computerized tomography series. *J Endocrinol Invest*, 29: 298–302.
2. Mantero F, Terzolo M, Arnaldi G, Osella G, Masini AM, Ali A, Giovagnetti M, Opocher G, Angeli A. (2000) A Survey on Adrenal Incidentaloma in Italy ¹. *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 637–644.
3. Kloss RT, Gross MD, Francis IR, Korobkin M, Shapiro B. (1995) Incidentally Discovered Adrenal Masses. *Endocr Rev*, 16: 460–484.
4. Mansmann G, Lau J, Balk E, Rothberg M, Miyachi Y, Bornstein SR. (2004) The clinically inapparent adrenal mass: Update in diagnosis and management. *Endocr Rev*, 25: 309–340.
5. Fassnacht M, Allolio B. (2009) Clinical management of adrenocortical carcinoma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 23: 273–289.
6. Else T, Kim AC, Sabolch A, Raymond VM, Kandathil A, Caoili EM, Jolly S, Miller BS, Giordano TJ, Hammer GD. (2014) Adrenocortical carcinoma. *Endocr Rev*, 35: 282–326.
7. Wasserman JD, Zambetti GP, Malkin D. (2012) Towards an understanding of the role of p53 in adrenocortical carcinogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, 351: 101–110.
8. Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, Latronico AC, Campos Carneiro P, Alves VA, Zerbini MC, Liberman B, Carlos Gomes G, Kirschner MA. (2000) Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer*, 88: 711–736.
9. Figueiredo BC, Sandrini R, Zambetti GP, Pereira RM, Cheng C, Liu W, Lacerda L, Pianovski MA, Michalkiewicz E, Jenkins J, Rodriguez-Galindo C, Mastellaro MJ, Vianna S, Watanabe F, Sandrini F, Arram SBI, Boffetta P, Ribeiro RC. (2006) Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. *J Med Genet*, 43: 91–96.
10. Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, Olivier M, Martel-Planche G, Calvez-Kelm F Le, Brugières L, Vargas FR, Brentani RR, Ashton-Prolla P, Landi S,

- Tavtigian S V., Hainaut P, Achatz MIW. (2010) Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: Evidence for a founder effect. *Hum Mutat*, 31: 143–150.
11. Pinto EM, Billerbeck AEC, Villares MCBF, Domenice S, Mendonça BB, Latronico AC. (2004) Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 48: 647–650.
 12. Custódio G, Komechen H, Figueiredo FRO, Fachin ND, Pianovski MAD, Figueiredo BC. (2012) Molecular epidemiology of adrenocortical tumors in southern Brazil. *Mol Cell Endocrinol*, 351: 44–51.
 13. Fassnacht M, Kroiss M, Allolio B. (2013) Update in Adrenocortical Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 98: 4551–4564.
 14. Allolio B, Fassnacht M. (2006) Clinical review: Adrenocortical carcinoma: Clinical update. *J Clin Endocrinol Metab*, 91: 2027–2037.
 15. Luton J-P, Cerdas S, Billaud L, Thomas G, Guilhaume B, Bertagna X, Laudat M-H, Louvel A, Chapuis Y, Blondeau P, Bonnin A, Bricaire H. (1990) Clinical Features of Adrenocortical Carcinoma, Prognostic Factors, and the Effect of Mitotane Therapy. *N Engl J Med*, 322: 1195–1201.
 16. Crucitti F, Bellantone R, Ferrante A, Boscherini M, Crucitti P, Carbone G, Casaccia M, Campisi C, Cavallaro A, Sapienza P, Del Gaudio A, Solidoro G, Dettori G, Marogna P, Di Giovanni V, Colli R, Doglietto G, Gozzetti G, Maldarizzi F. (1996) The italian registry for adrenal cortical carcinoma: Analysis of a multiinstitutional series of 129 patients. *Surgery*, 119: 161–170.
 17. Ng L, Libertino JM. (2003) Adrenocortical carcinoma: diagnosis, evaluation and treatment. *J Urol*, 169: 5–11.
 18. Arlt W, Biehl M, Taylor AE, Hahner S, Libé R, Hughes BA, Schneider P, Smith DJ, Stiekema H, Krone N, Porfiri E, Opocher G, Bertherat J, Mantero F, Allolio B, Terzolo M, Nightingale P, Shackleton CHL, Bertagna X, Fassnacht M, Stewart PM. (2011) Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting malignancy in adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 96: 3775–3784.
 19. Bancos I, Arlt W. (2017) Diagnosis of a malignant adrenal mass: The role of urinary steroid metabolite profiling. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 24:

- 200–207.
20. Fraumeni JF, Miller RW. (1967) Adrenocortical neoplasms with hemihypertrophy, brain tumors, and other disorders. *J Pediatr*, 70: 129–138.
 21. Nader S, Hickey RC, Sellin R V, Samaan NA. (1983) Adrenal cortical carcinoma a study of 77 cases. *Cancer*, 52: 707–711.
 22. Venkatesh S, Hickey RC, Sellin R V, Fernandez JF, Samaan NA. (1989) Adrenal cortical carcinoma. *Cancer*, 64: 765–769.
 23. Weksberg R, Shuman C, Smith AC. (2005) Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet*, 137: 12–23.
 24. Lapunzina P. (2005) Risk of tumorigenesis in overgrowth syndromes: A comprehensive review. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet*, 137C: 53–71.
 25. Gatta-Cherifi B, Chabre O, Murat A, Niccoli P, Cardot-Bauters C, Rohmer V, Young J, Delemer B, Du Boullay H, Verger MF, Kuhn JM, Sadoul JL, Ruzsniowski P, Beckers A, Monsaingeon M, Baudin E, Goudet P, Tabarin A. (2012) Adrenal involvement in MEN1. Analysis of 715 cases from the Groupe d'étude des Tumeurs Endocrines database. *Eur J Endocrinol*, 166: 269–279.
 26. Waldmann J, Bartsch DK, Kann PH, Fendrich V, Rothmund M, Langer P. (2007) Adrenal involvement in multiple endocrine neoplasia type 1: Results of 7 years prospective screening. *Langenbeck's Arch Surg*, 392: 437–443.
 27. Skogseid B, Rastad J, Gobl A, Larsson C, Backlin K, Juhlin C, Åkerström G, Öberg K. (1995) Adrenal lesion in multiple endocrine neoplasia type 1. *Surgery*, 118: 1077–1082.
 28. Griniatsos JE, Dimitriou N, Zilos A, Sakellariou S, Evangelou K, Kamakari S, Korkolopoulou P, Kaltsas G. (2011) Bilateral adrenocortical carcinoma in a patient with multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) and a novel mutation in the MEN1 gene. *World J Surg Oncol*, 9: 6.
 29. Langer P, Cupisti K, Bartsch DK, Nies C, Goretzki PE, Rothmund M, Röher HD. (2002) Adrenal involvement in multiple endocrine neoplasia type 1. *World J Surg*, 26: 891–896.
 30. Raymond VM, Everett JN, Furtado L V., Gustafson SL, Jungbluth CR, Gruber SB, Hammer GD, Stoffel EM, Greenson JK, Giordano TJ, Else T. (2013) Adrenocortical carcinoma is a lynch syndrome-associated cancer. *J Clin Oncol*,

- 31: 3012–3018.
31. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. (1994) Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*, 368: 753–756.
 32. Pilon C, Pistorello M, Moscon A, Altavilla G, Pagotto U, Boscaro M, Fallo F. (1999) Inactivation of the p16 tumor suppressor gene in adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 2776–2779.
 33. Ohgaki H, Kleihues P, Heitz PU. (1993) p53 mutations in sporadic adrenocortical tumors. *Int J cancer*, 54: 408–410.
 34. Barzon L, Chilosi M, Fallo F, Martignoni G, Montagna L, Palù G, Boscaro M. (2001) Molecular analysis of CDKN1C and TP53 in sporadic adrenal tumors. *Eur J Endocrinol*, 145: 207–212.
 35. Assié G, Letouzé E, Fassnacht M, Jouinot A, Luscap W, Barreau O, Omeiri H, Rodriguez S, Perlemoine K, René-Corail F, Elarouci N, Sbiera S, Kroiss M, Allolio B, Waldmann J, Quinkler M, Mannelli M, Mantero F, Papatomas T, De Krijger R, Tabarin A, Kerlan V, Baudin E, Tissier F, Dousset B, Groussin L, Amar L, Clauser E, Bertagna X, Ragazzon B, Beuschlein F, Libé R, de Reyniès A, Bertherat J. (2014) Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat Genet*, 46: 607–612.
 36. Zheng S, Cherniack AD, Dewal N, Moffitt RA, Danilova L, Murray BA, Lerario AM, Else T, Knijnenburg TA, Ciriello G, Kim S, Assie G, Morozova O, Akbani R, Shih J, Hoadley KA, Choueiri TK, Waldmann J, Mete O, Robertson AG, Wu H-TT, Raphael BJ, Shao L, Meyerson M, Demeure MJ, Beuschlein F, Gill AJ, Sidhu SB, Almeida MQ, Fragoso MCBVB V, Cope LM, Kebebew E, Habra MA, Whitsett TG, Bussey KJ, Rainey WE, Asa SL, Bertherat J, Fassnacht M, Wheeler DA, Cancer Genome Atlas Research Network TCGAR, Hammer GD, Giordano TJ, Verhaak RGWW, Benz C, Ally A, Balasundaram M, Bowlby R, Brooks D, Butterfield YSN, Carlsen R, Dhalla N, Guin R, Holt RA, Jones SJM, Kasaian K, Lee D, Li HI, Lim L, Ma Y, Marra MA, Mayo M, Moore RA, Mungall AJ, Mungall K, Sadeghi S, Schein JE, Sipahimalani P, Tam A, Thiessen N, Park PJ, Kroiss M, Gao J, Sander C, Schultz N, Jones CD, Kucherlapati R, Mieczkowski PA, Parker JS, Perou CM, Tan D, Veluvolu U, Wilkerson MD, Hayes DN,

- Ladanyi M, Quinkler M, Auman JT, Latronico AC, Mendonca BB, Sibony M, Sanborn Z, Bellair M, Buhay C, Covington K, Dahdouli M, Dinh H, Doddapaneni H, Downs B, Drummond J, Gibbs R, Hale W, Han Y, Hawes A, Hu J, Kakkar N, Kalra D, Khan Z, Kovar C, Lee S, Lewis L, Morgan M, Morton D, Muzny D, Santibanez J, Xi L, Dousset B, Groussin L, Libé R, Chin L, Reynolds S, Shmulevich I, Chudamani S, Liu J, Lolla L, Wu Y, Yeh JJ, Balu S, Bodenheimer T, Hoyle AP, Jefferys SR, Meng S, Mose LE, Shi Y, Simons J V., Soloway MG, Wu J, Zhang W, Shaw KRM, Demchok JA, Felau I, Sheth M, Tarnuzzer R, Wang Z, Yang L, Zenklusen JC, Zhang J, Davidsen T, Crawford C, Hutter CM, Sofia HJ, Roach J, Bshara W, Gaudioso C, Morrison C, Soon P, Alonso S, Baboud J, Pihl T, Raman R, Sun Q, Wan Y, Naresh R, Arachchi H, Beroukhim R, Carter SL, Cho J, Frazer S, Gabriel SB, Getz G, Heiman DI, Kim J, Lawrence MS, Lin P, Noble MS, Saksena G, Schumacher SE, Sougnez C, Voet D, Zhang H, Bowen J, Coppens S, Gastier-Foster JM, Gerken M, Hessel C, Leraas KM, Lichtenberg TM, Ramirez NC, Wise L, Zmuda E, Baylin S, Herman JG, LoBello J, Watanabe A, Haussler D, Radenbaugh A, Rao A, Zhu J, Bartsch DK, Sbiera S, Allolio B, Deutschbein T, Ronchi C, Raymond VM, Vinco M, Amble L, Bootwalla MS, Lai PH, Van Den Berg DJ, Weisenberger DJ, Robinson B, Ju Z, Kim H, Ling S, Liu W, Lu Y, Mills GB, Sircar K, Wang Q, Yoshihara K, Laird PW, Fan Y, Wang W, Shinbrot E, Reincke M, Weinstein JN, Meier S, Defreitas T. (2016) Comprehensive pan-genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Cancer Cell*, 29: 723–736.
37. Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, Hagneré A-M, René-Corail F, Jullian E, Gicquel C, Bertagna X, Vacher-Lavenu M-C, Perret C, Bertherat J. (2005) Mutations of *β-Catenin* in Adrenocortical Tumors: Activation of the Wnt Signaling Pathway Is a Frequent Event in both Benign and Malignant Adrenocortical Tumors. *Cancer Res*, 65: 7622–7627.
38. Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, Lizyness M, Misek DE, Smith AL, Sanders D, Aljundi RT, Gauger PG, Thompson NW, Taylor JMG, Hanash SM. (2003) Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am J Pathol*, 162: 521–531.
39. Wängberg B, Khorram-Manesh A, Jansson S, Nilsson B, Nilsson O, Jakobsson

- CE, Lindstedt S, Odén A, Ahlman H. (2010) The long-term survival in adrenocortical carcinoma with active surgical management and use of monitored mitotane. *Endocr Relat Cancer*, 17: 265–272.
40. Abiven G, Coste J, Groussin L, Anract P, Tissier F, Legmann P, Dousset B, Bertagna X, Bertherat J. (2006) Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: Poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 91: 2650–2655.
 41. Weiss LM, Medeiros LJ, Vickery AL. (1989) Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 13: 202–206.
 42. Berruti A, Fassnacht M, Baudin E, Hammer G, Haak H, Leboulleux S, Skogseid B, Allolio B, Terzolo M. (2010) Adjuvant therapy in patients with adrenocortical carcinoma: A position of an international panel. *J Clin Oncol*, 28: 401–402.
 43. Morimoto R, Satoh F, Murakami O, Suzuki T, Abe T, Tanemoto M, Abe M, Uruno A, Ishidoya S, Arai Y, Takashi K, Sasano H, Ito S. (2008) Immunohistochemistry of a Proliferation Marker Ki67/MIB1 in Adrenocortical Carcinomas: Ki67/MIB1 Labeling Index Is a Predictor for Recurrence of Adrenocortical Carcinomas. *Endocr J*, 55: 49–55.
 44. Fassnacht M, Berruti A, Baudin E, Demeure MJ, Gilbert J, Haak H, Kroiss M, Quinn DI, Hesseltine E, Ronchi CL, Terzolo M, Choueiri TK, Poondru S, Fleege T, Rorig R, Chen J, Stephens AW, Worden F, Hammer GD. (2015) Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: A double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*, 16: 426–435.
 45. Lam AK. (2017) Update on Adrenal Tumours in 2017 World Health Organization (WHO) of Endocrine Tumours. *Endocr Pathol*, 28: 1–15.
 46. Song JH, Chaudhry FS, Mayo-Smith WW. (2008) The Incidental Adrenal Mass on CT: Prevalence of Adrenal Disease in 1,049 Consecutive Adrenal Masses in Patients with No Known Malignancy. *Am J Roentgenol*, 190: 1163–1168.
 47. Bin X, Qing Y, Linhui W, Li G, Yinghao S. (2011) Adrenal incidentalomas: Experience from a retrospective study in a Chinese population. *URO*, 29: 270–274.
 48. Mantero F, Masini AM, Opocher G, Giovagnetti M, Arnaldi G. (1997) Adrenal

- Incidentaloma: An Overview of Hormonal Data from the National Italian Study Group. *Horm Res*, 47: 284–289.
49. Minamiya Y, Abo S, Kitamura M, Izumi K. (1997) Mediastinal extraadrenal myelolipoma: report of a case. *Surg Today*, 27: 971–972.
 50. Zeng Y, Ma Q, Lin L, Fu P, Shen Y, Luo Q-Y, Zhao L-H, Mou J-H, Xiao H-L. (2016) Giant Myelolipoma in the Spleen: A Rare Case Report and Literature Review. *Int J Surg Pathol*, 24: 177–180.
 51. Ghaouti M, Znati K, Jahid A, Zouaidia F, Bernoussi Z, Mahassini N. (2013) Renal myelolipoma: a rare extra-adrenal tumor in a rare site: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep*, 7: 92.
 52. Sundaram M, Bauer T, von Hochstetter A, Ilaslan H, Joyce M. (2007) Intraosseous myelolipoma. *Skeletal Radiol*, 36: 1181–1184.
 53. Krismann M, Reichle G, Müller KM. (1993) [Thoracic bilateral myelolipoma]. *Pneumologie*, 47: 501–503.
 54. George SA, Manipadam MT, Thomas R. (2012) Primary myelolipoma presenting as a nasal cavity polyp: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep*, 6: 127.
 55. Stein SH, Latour F, Frost SS. (1986) Myelolipoma arising from ectopic adrenal cortex: case report and review of the literature. *Am J Gastroenterol*, 81: 999–1001.
 56. Cina SJ, Gordon BM, Curry NS. (1995) Ectopic adrenal myelolipoma presenting as a splenic mass. *Arch Pathol Lab Med*, 119: 561–563.
 57. Storms G, Janssens G. (2013) Intraocular myelolipoma in a dog. *Vet Ophthalmol*, 16: 183–187.
 58. Newman SJ, Inzana K, Chickering W. (2000) Extradural Myelolipoma in a Dog. *J Vet Diagnostic Investig*, 12: 71–74.
 59. Taher A, Vichinsky E, Musallam K, Cappellini MD, Viprakasit V. Extramedullary hematopoiesis. In: Weatherall SD (szerk.), *Guidelines for the Management of Non Transfusion Dependent Thalassaemia (NTDT)*. Thalassaemia International Federation, Nicosia, 2013: 90.
 60. Fowler MR, Williams RB, Alba JM, Byrd CR. (1982) Extra-adrenal myelolipomas compared with extramedullary hematopoietic tumors: a case of

- presacral myelolipoma. *Am J Surg Pathol*, 6: 363–374.
61. Sanders R, Bissada N, Curry N, Gordon B. (1995) Clinical Spectrum of Adrenal Myelolipoma: Analysis of 8 Tumors in 7 Patients. *J Urol*, 153: 1791–1793.
 62. Shenoy VG, Thota A, Shankar R, Desai MG. (2015) Adrenal myelolipoma: Controversies in its management. *Indian J Urol*, 31: 94–101.
 63. De Navasquez S. (1935) Case of myelo-lipoma (bone-marrow, heterotopia) of suprarenal gland. *Guys Hosp Rep*, 88: 237–240.
 64. Chang K-C, Chen P-I, Huang Z-H, Lin Y-M, Kuo P-L. (2002) Adrenal myelolipoma with translocation (3;21)(q25;p11). *Cancer Genet Cytogenet*, 134: 77–80.
 65. Feng C, Jiang H, Ding Q, Wen H. (2013) Adrenal myelolipoma: A mingle of progenitor cells? *Med Hypotheses*, 80: 819–822.
 66. Bishop E, Eble JN, Cheng L, Wang M, Chase DR, Orazi A, Malley DP. (2006) Adrenal Myelolipomas Show Nonrandom X-chromosome Inactivation in Hematopoietic Elements and Fat: Support for a Clonal Origin of Myelolipomas. *Am J Surg Pathol*, 30: 838–843.
 67. Selye H, Stone H. (1950) Hormonally induced transformation of adrenal into myeloid tissue. *Am J Pathol*, 26: 211–233.
 68. Sieber SC, Gelfman NA, Dandurand R, Braza F. (1989) Ectopic ACTH and adrenal myelolipoma. *Conn Med*, 53: 7–10.
 69. Hagiwara H, Usui T, Kimura T, Tagami T, Naruse M, Minamiguchi S, Kato T, Okuno H, Shimatsu A. (2008) Lack of ACTH and Androgen Receptor Expression in a Giant Adrenal Myelolipoma Associated with 21-hydroxylase Deficiency. *Endocr Pathol*, 19: 122–127.
 70. Motta I, Boiocchi L, Delbini P, Migone De Amicis M, Cassinerio E, Dondossola D, Rossi G, Cappellini MD. (2016) A giant adrenal myelolipoma in a beta-thalassemia major patient: Does ineffective erythropoiesis play a role? *Am J Hematol*, 91: 1281–1282.
 71. Cardinalli IA, de Oliveira-Filho AG, Mastellaro MJ, Ribeiro RC, Aguiar SS. (2012) A unique case of synchronous functional adrenocortical adenoma and myelolipoma within the ectopic adrenal cortex in a child with Beckwith–Wiedemann syndrome. *Pathol - Res Pract*, 208: 189–194.

72. Sebastià MC, Pérez-Molina MO, Alvarez-Castells A, Quiroga S, Pallisa E, Sebastih MC, Alvarez-Castelis A, Quiroga S, Pallisa E. (1997) CT evaluation of underlying cause in spontaneous subcapsular and perirenal hemorrhage. *7*: 686–690.
73. Low G, Dhliwayo H, Lomas DJ. (2012) Adrenal neoplasms. *Clin Radiol*, *67*: 988–1000.
74. Lam KY, Lo CY. (2001) Adrenal lipomatous tumours: a 30 year clinico-pathological experience at a single institution. *J Clin Pathol*, *54*: 707–712.
75. Lam AKY. (2017) Lipomatous tumours in adrenal gland: WHO updates and clinical implications. *Endocr Relat Cancer*, *24*: 65–79.
76. Liu H-P, Chang W-Y, Chien S-T, Hsu C-W, Wu Y-C, Kung W-C, Su C-M, Liu P-H. (2017) Intra-abdominal bleeding with hemorrhagic shock: a case of adrenal myelolipoma and review of literature. *BMC Surg*, *17*: 74.
77. Campbell MJ, Obasi M, Wu B, Corwin MT, Fananapazir G. (2017) The radiographically diagnosed adrenal myelolipoma: what do we really know? *Endocrine*, *58*: 289–294.
78. Han M, Burnett AL, Fishman EK, Marshall FF, Wu Y-C, Kung W-C, Su C-M, Liu P-H. (1997) The Natural History and Treatment of Adrenal Myelolipoma. *J Urol*, *157*: 1213–1216.
79. Reza-Albarrán AA, Gómez-Pérez FJ, López JC, Herrera M, Gamboa-Dominguez A, Keirns C, Aranda A, Rull JA. (1999) Myelolipoma: A new adrenal finding in Carney's complex? *Endocr Pathol*, *10*: 251–257.
80. Kalafatis P. (1999) Bilateral Giant Adrenal Myelolipoma and Polycystic Ovarian Disease. *Urol Int*, *63*: 139–143.
81. Banik S, Hasleton PS, Lyon RL. (1984) An unusual variant of multiple endocrine neoplasia syndrome: a case report. *Histopathology*, *8*: 135–144.
82. Maschler I, Rosenmann E, Ehrenfeld EN. (1979) Ectopic functioning adrenocortico-myelolipoma in longstanding nelson's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*, *10*: 493–497.
83. Yoshioka M, Fujimori K, Wakasugi M, Yamazaki N, Kuroki M, Tsuchida T, Seki H, Sekiya M, Tamura T. (1994) Cushing's disease associated with adrenal myelolipoma, adrenal calcification and thyroid cancer. *Endocr J*, *41*: 461–466.

84. Gemmel F, Bruinsma H, Oomen P, Collins J. (2010) PET/CT Incidental Detection of Bilateral Adrenal Myelolipomas in a Patient With a Huge Maxillary Sinus Carcinoma. *Clin Nucl Med*, 35: 132–133.
85. Ludwig V, Rice MH, Martin WH, Kelley MC, Delbeke D. (2002) 2-Deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose positron emission tomography uptake in a giant adrenal myelolipoma. *Mol Imaging Biol*, 4: 355–358.
86. Fassnacht M, Arlt W, Bancos I, Dralle H, Newell-Price J, Sahdev A, Tabarin A, Terzolo M, Tsagarakis S, Dekkers OM. (2016) Management of adrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur J Endocrinol*, 175: 1–34.
87. Lee J-M, Kim MK, Ko S-H, Koh J-M, Kim B-Y, Kim SW, Kim S-K, Kim HJ, Ryu O-H, Park J, Lim JS, Kim SY, Shong YK, Yoo SJ. (2017) Clinical Guidelines for the Management of Adrenal Incidentaloma. *Endocrinol Metab*, 32: 200.
88. Reincke M, Beuschlein F, Slawik M, Borm K. (2000) Molecular adrenocortical tumourigenesis. *Eur J Clin Invest*, 30 Suppl 3: 63–68.
89. Rossi GP, Bernini G, Caliumi C, Desideri G, Fabris B, Ferri C, Ganzaroli C, Giacchetti G, Letizia C, Maccario M, Mallamaci F, Mannelli M, Mattarello MJ, Moretti A, Palumbo G, Parenti G, Porteri E, Semplicini A, Rizzoni D, Rossi E, Boscaro M, Pessina AC, Mantero F. (2006) A Prospective Study of the Prevalence of Primary Aldosteronism in 1,125 Hypertensive Patients. *J Am Coll Cardiol*, 48: 2293–2300.
90. Loh K-C, Koay ES, Khaw M-C, Emmanuel SC, Young WF. (2000) Prevalence of Primary Aldosteronism among Asian Hypertensive Patients in Singapore 1. *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 2854–2859.
91. Käyser SC, Dekkers T, Groenewoud HJ, Van Der Wilt GJ, Carel Bakx J, Van Der Wel MC, Hermus AR, Lenders JW, Deinum J. (2016) Study heterogeneity and estimation of prevalence of primary aldosteronism: A systematic review and meta-regression analysis. *J Clin Endocrinol Metab*, 101: 2826–2835.
92. Young WF. (2007) Primary aldosteronism: Renaissance of a syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 66: 607–618.

93. Korah H, Scholl U. (2015) An Update on Familial Hyperaldosteronism. *Horm Metab Res*, 47: 941–946.
94. Funder JW. (2012) The Genetics of Primary Aldosteronism. *Hypertension*, 59: 537–538.
95. Azizan EAB, Poulsen H, Tuluc P, Zhou J, Clausen M V, Lieb A, Maniero C, Garg S, Bochukova EG, Zhao W, Shaikh LH, Brighton CA, Teo AED, Davenport AP, Dekkers T, Tops B, Küsters B, Ceral J, Yeo GSH, Neogi SG, McFarlane I, Rosenfeld N, Marass F, Hadfield J, Margas W, Chaggar K, Solar M, Deinum J, Dolphin AC, Farooqi IS, Striessnig J, Nissen P, Brown MJ. (2013) Somatic mutations in *ATP1A1* and *CACNA1D* underlie a common subtype of adrenal hypertension. *Nat Genet*, 45: 1055–1060.
96. Scholl UI, Goh G, Stölting G, de Oliveira RC, Choi M, Overton JD, Fonseca AL, Korah R, Starker LF, Kunstman JW, Prasad ML, Hartung EA, Mauras N, Benson MR, Brady T, Shapiro JR, Loring E, Nelson-Williams C, Libutti SK, Mane S, Hellman P, Westin G, Åkerström G, Björklund P, Carling T, Fahlke C, Hidalgo P, Lifton RP. (2013) Somatic and germline *CACNA1D* calcium channel mutations in aldosterone-producing adenomas and primary aldosteronism. *Nat Genet*, 45: 1050–1054.
97. Burrello J, Monticone S, Tetti M, Rossato D, Versace K, Castellano I, Williams T, Veglio F, Mulatero P. (2015) Subtype Diagnosis of Primary Aldosteronism: Approach to Different Clinical Scenarios. *Horm Metab Res*, 47: 959–966.
98. Monticone S, Else T, Mulatero P, Williams TA, Rainey WE. (2015) Understanding primary aldosteronism: impact of next generation sequencing and expression profiling. *Mol Cell Endocrinol*, 399: 311–320.
99. Boulkroun S, Beuschlein F, Rossi GP, Golib-Dzib JF, Fischer E, Amar L, Mulatero P, Samson-Couterie B, Hahner S, Quinkler M, Fallo F, Letizia C, Allolio B, Ceolotto G, Cicala MV, Lang K, Lefebvre H, Lenzini L, Maniero C, Monticone S, Perrocheau M, Pilon C, Plouin PF, Rayes N, Seccia TM, Veglio F, Williams TA, Zinamosca L, Mantero F, Benecke A, Jeunemaitre X, Reincke M, Zennaro MC. (2012) Prevalence, clinical, and molecular correlates of *KCNJ5* mutations in primary aldosteronism. *Hypertension*, 59: 592–598.
100. Azizan EAB, Murthy M, Stowasser M, Gordon R, Kowalski B, Xu S, Brown MJ,

- O'Shaughnessy KM. (2012) Somatic mutations affecting the selectivity filter of KCNJ5 are frequent in 2 large unselected collections of adrenal aldosteronomas. *Hypertension*, 59: 587–591.
101. Monticone S, Hattangady NG, Nishimoto K, Mantero F, Rubin B, Cicala MV, Pezzani R, Auchus RJ, Ghayee HK, Shibata H, Kurihara I, Williams TA, Giri JG, Bollag RJ, Edwards MA, Isales CM, Rainey WE. (2012) Effect of KCNJ5 mutations on gene expression in aldosterone-producing adenomas and adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 97: 1567–1572.
 102. Åkerström T, Crona J, Delgado Verdugo A, Starker LF, Cupisti K, Willenberg HS, Knoefel WT, Saeger W, Feller A, Ip J, Soon P, Anlauf M, Alesina PF, Schmid KW, Decaussin M, Levillain P, Wängberg B, Peix JL, Robinson B, Zedenius J, Bäckdahl M, Caramuta S, Iwen KA, Botling J, Stålberg P, Kraimps JL, Dralle H, Hellman P, Sidhu S, Westin G, Lehnert H, Walz MK, Åkerström G, Carling T, Choi M, Lifton RP, Björklund P. (2012) Comprehensive re-sequencing of adrenal aldosterone producing lesions reveal three somatic mutations near the KCNJ5 potassium channel selectivity filter. *PLoS One*, 7: 41926.
 103. Williams TA, Monticone S, Mulatero P. (2015) *KCNJ5* Mutations Are the Most Frequent Genetic Alteration in Primary Aldosteronism. *Hypertension*, 65: 507–509.
 104. Beuschlein F, Boulkroun S, Osswald A, Wieland T, Nielsen HN, Lichtenauer UD, Penton D, Schack VR, Amar L, Fischer E, Walther A, Tauber P, Schwarzmayr T, Diener S, Graf E, Allolio B, Samson-Couterie B, Benecke A, Quinkler M, Fallo F, Plouin PF, Mantero F, Meitinger T, Mulatero P, Jeunemaitre X, Warth R, Vilsen B, Zennaro MC, Strom TM, Reincke M. (2013) Somatic mutations in *ATP1A1* and *ATP2B3* lead to aldosterone-producing adenomas and secondary hypertension. *Nat Genet*, 45: 440–444.
 105. El Zein RM, Boulkroun S, Fernandes-Rosa FL, Zennaro M-CC. (2018) Molecular genetics of Conn adenomas in the era of exome analysis. *Press Medicale*, 47: 151–158.
 106. Wisgerhof M, Carpenter PC, Brown RD. (1978) Increased adrenal sensitivity to angiotensin II in idiopathic hyperaldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*, 47:

- 938–943.
107. Funder JW, Carey RM, Mantero F, Murad MH, Reincke M, Shibata H, Stowasser M, Young WF. (2016) The management of primary aldosteronism: Case detection, diagnosis, and treatment: An endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 101: 1889–1916.
 108. Mulatero P, Stowasser M, Loh KC, Fardella CE, Gordon RD, Mosso L, Gomez-Sanchez CE, Veglio F, Young WF. (2004) Increased diagnosis of primary aldosteronism, including surgically correctable forms, in centers from five continents. *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 1045–1050.
 109. Fraser R, Murray GD, Connell JM. (1998) Conn’s syndrome: no longer a needle in a haystack? *Clin Endocrinol (Oxf)*, 49: 709–710.
 110. Blumenfeld JD, Sealey JE, Schluskel Y, Vaughan ED, Sos TA, Atlas SA, Müller FB, Acevedo R, Ulick S, Laragh JH. (1994) Diagnosis and treatment of primary hyperaldosteronism. *Ann Intern Med*, 121: 877–885.
 111. Holland OB, Brown H, Kuhnert L, Fairchild C, Risk M, Gomez-Sanchez CE. Further evaluation of saline infusion for the diagnosis of primary aldosteronism. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)*, 6: 717–723.
 112. Gleason PE, Weinberger MH, Pratt JH, Bihle R, Dugan J, Eller D, Donohue JP. (1993) Evaluation of diagnostic tests in the differential diagnosis of primary aldosteronism: unilateral adenoma versus bilateral micronodular hyperplasia. *J Urol*, 150: 1365–1368.
 113. Lim V, Guo Q, Grant CS, Thompson GB, Richards ML, Farley DR, Young WF. (2014) Accuracy of adrenal imaging and adrenal venous sampling in predicting surgical cure of primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*, 99: 2712–9.
 114. Young WF, Stanson AW, Thompson GB, Grant CS, Farley DR, van Heerden JA. (2004) Role for adrenal venous sampling in primary aldosteronism. *Surgery*, 136: 1227–1235.
 115. Rossi GP, Sacchetto A, Chiesura-Corona M, De Toni R, Gallina M, Feltrin GP, Pessina AC. (2001) Identification of the etiology of primary aldosteronism with adrenal vein sampling in patients with equivocal computed tomography and magnetic resonance findings: results in 104 consecutive cases. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 1083–1090.

116. El Ghorayeb N, Mazzuco TL, Bourdeau I, Mailhot J-P, Zhu PS, Thérasse E, Lacroix A. (2016) Basal and Post-ACTH Aldosterone and Its Ratios Are Useful During Adrenal Vein Sampling in Primary Aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*, 101: 1826–1835.
117. Daunt N. (2005) Adrenal vein sampling: how to make it quick, easy, and successful. *Radiographics*, 25: 143–158.
118. Beuschlein F, Mulatero P, Asbach E, Monticone S, Catena C, Sechi L, Stowasser M. (2017) The SPARTACUS Trial: Controversies and Unresolved Issues. *Horm Metab Res*, 49: 936–942.
119. Malumbres M. (2013) miRNAs and cancer: An epigenetics view. *Mol Aspects Med*, 34: 863–874.
120. Lagos-Quintana M. (2003) New microRNAs from mouse and human. *RNA*, 9: 175–179.
121. Orang AV, Safaralizadeh R, Kazemzadeh-Bavili M, Valinezhad Orang A, Safaralizadeh R, Kazemzadeh-Bavili M. (2014) Mechanisms of miRNA-mediated gene regulation from common downregulation to mRNA-specific upregulation. *Int J Genomics*, 2014: 1–15.
122. Bartel DP. (2004) MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, 116: 281–297.
123. Turchinovich A, Burwinkel B. (2012) Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma. *RNA Biol*, 9: 1066–1075.
124. Axtell MJ, Westholm JO, Lai EC. (2011) Vive la différence: Biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biol*, 12: 221.
125. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, Liu S, Alder H, Costinean S, Fernandez-Cymering C, Volinia S, Guler G, Morrison CD, Chan KK, Marcucci G, Calin GA, Huebner K, Croce CM. (2007) MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 15805–15810.
126. Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, Pasquinelli AE, Shiekhattar R. (2007) MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*, 447: 823–828.
127. Olive V, Minella AC, He L. (2015) Outside the coding genome, mammalian

- microRNAs confer structural and functional complexity. *Sci Signal*, 8: re2.
128. Sonkoly E, Pivarcsi A. (2009) Advances in microRNAs: implications for immunity and inflammatory diseases. *J Cell Mol Med*, 13: 24–38.
 129. Lüningschrör P, Hauser S, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. (2013) MicroRNAs in pluripotency, reprogramming and cell fate induction. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*, 1833: 1894–1903.
 130. Vidigal JA, Ventura A. (2015) The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends Cell Biol*, 25: 137–147.
 131. Alvarez-Garcia I, Miska EA, Hedgecock EM. (2005) MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*, 132: 4653–4662.
 132. Lee H-M, Nguyen DT, Lu L-F. (2014) Progress and challenge of microRNA research in immunity. *Front Genet*, 5: 178.
 133. Iorio M V, Croce CM. (2012) Causes and consequences of microRNA dysregulation. *Cancer J*, 18: 215–222.
 134. Shenouda SK, Alahari SK. (2009) MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev*, 28: 369–378.
 135. Gebeshuber CA, Zatloukal K, Martinez J. (2009) miR-29a suppresses tristetraprolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis. *EMBO Rep*, 10: 400–405.
 136. Tömböl Z, Szabó PM, Molnár V, Wiener Z, Tölgyesi G, Horányi J, Riesz P, Reismann P, Patócs A, Likó I, Gaillard RC, Falus A, Rác K, Igaz P. (2009) Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: MicroRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis. *Endocr Relat Cancer*, 16: 895–906.
 137. Butz H, Likó I, Czirják S, Igaz P, Khan MM, Zivkovic V, Bálint K, Korbonits M, Rác K, Patócs A. (2010) Down-Regulation of Wee1 Kinase by a Specific Subset of microRNA in Human Sporadic Pituitary Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 95: 181–191.
 138. Klopffleisch R, Weiss ATA, Gruber AD. (2011) Excavation of a buried treasure--DNA, mRNA, miRNA and protein analysis in formalin fixed, paraffin embedded tissues. *Histol Histopathol*, 26: 797–810.
 139. Igaz P, Igaz I, Nagy Z, Nyíró G, Szabó PM, Falus A, Patócs A, Rác K, Nyíró G,

- Szabó PM, Falus A, Patócs A, Rácz K. (2015) MicroRNAs in adrenal tumors: Relevance for pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Cell Mol Life Sci*, 72: 417–428.
140. Halkova T, Cuperkova R, Minarik M, Benesova L. (2015) MicroRNAs in Pancreatic Cancer: Involvement in Carcinogenesis and Potential Use for Diagnosis and Prognosis. *Gastroenterol Res Pract*, 2015: 892903.
 141. Del Vescovo V, Grasso M, Barbareschi M, Denti MA. (2014) MicroRNAs as lung cancer biomarkers. *World J Clin Oncol*, 5: 604–620.
 142. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. (2010) The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*, 56: 1733–1741.
 143. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 10513–10518.
 144. Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, Jiao J, Li K, Yu B, Li Z, Wang R, Wang L, Li Q, Wang N, Shan H, Li Z, Yang B. (2010) Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*, 391: 73–77.
 145. Mizuno H, Nakamura A, Aoki Y, Ito N, Kishi S, Yamamoto K, Sekiguchi M, Takeda S, Hashido K. (2011) Identification of muscle-specific microRNAs in serum of muscular dystrophy animal models: promising novel blood-based markers for muscular dystrophy. *PLoS One*, 6: 18388.
 146. Laterza OF, Lim L, Garrett-Engele PW, Vlasakova K, Muniappa N, Tanaka WK, Johnson JM, Sina JF, Fare TL, Sistare FD, Glaab WE. (2009) Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. *Clin Chem*, 55: 1977–1983.
 147. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang YY, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang YY, Wang JJ, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang JJ, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang JJ, Zen K, Zhang JJ, Zhang C-YY. (2008) Characterization of microRNAs in serum: A novel class of

- biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, 18: 997–1006.
148. Moussay E, Wang K, Cho J-H, van Moer K, Pierson S, Paggetti J, Nazarov P V, Palissot V, Hood LE, Berchem G, Galas DJ. (2011) MicroRNA as biomarkers and regulators in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 6573–6578.
 149. Roth P, Wischhusen J, Happold C, Chandran PA, Hofer S, Eisele G, Weller M, Keller A. (2011) A specific miRNA signature in the peripheral blood of glioblastoma patients. *J Neurochem*, 118: 449–457.
 150. Kutwin P, Konecki T, Borkowska EM, Traczyk-Borszyńska M, Jabłonowski Z. (2018) Urine mirna as a potential biomarker for bladder cancer detection – a meta-analysis. *Cent Eur J Urol*, 71: 177–185.
 151. Cheng Y, Wang X, Yang J, Duan X, Yao Y, Shi X, Chen Z, Fan Z, Liu X, Qin S, Tang X, Zhang C. (2012) A translational study of urine miRNAs in acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 53: 668–676.
 152. Gidlöf O, Andersson P, Van Der Pals J, Götberg M, Erlinge D. (2011) Cardiospecific microRNA plasma levels correlate with troponin and cardiac function in patients with ST elevation myocardial infarction, are selectively dependent on renal elimination, and can be detected in urine samples. *Cardiology*, 118: 217–226.
 153. Zhou X, Mao A, Wang X, Duan X, Yao Y, Zhang C. (2013) Urine and Serum MicroRNA-1 as Novel Biomarkers for Myocardial Injury in Open-Heart Surgeries with Cardiopulmonary Bypass. *PLoS One*, 8: 62245.
 154. Bacon S, Engelbrecht B, Schmid J, Pfeiffer S, Gallagher R, McCarthy A, Burke M, Concannon C, Prehn JHM, Byrne MM. (2015) Microrna-224 is readily detectable in urine of individuals with diabetes mellitus and is a potential indicator of beta-cell demise. *Genes (Basel)*, 6: 399–416.
 155. Osipova J, Fischer DC, Dangwal S, Volkmann I, Widera C, Schwarz K, Lorenzen JM, Schreiver C, Jacoby U, Heimhalt M, Thum T, Haffner D. (2014) Diabetes-associated MicroRNAs in pediatric patients with type 1 diabetes mellitus: A cross-sectional cohort study. *J Clin Endocrinol Metab*, 99: 1661–1665.
 156. Kao H-W, Pan C-Y, Lai C-H, Wu C-W, Fang W-L, Huang K-H, Lin W-C.

- (2017) Urine miR-21-5p as a potential non-invasive biomarker for gastric cancer. *Oncotarget*, 8: 56389–56397.
157. Abdalla MAK, Haj-Ahmad Y. (2012) Promising candidate urinary microRNA biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma among high-risk hepatitis C virus Egyptian patients. *J Cancer*, 3: 19–31.
 158. Erbes T, Hirschfeld M, Rücker G, Jaeger M, Boas J, Iborra S, Mayer S, Gitsch G, Stickeler E. (2015) Feasibility of urinary microRNA detection in breast cancer patients and its potential as an innovative non-invasive biomarker. *BMC Cancer*, 15: 193.
 159. Závěský L, Jandáková E, Turyna R, Langmeierová L, Weinberger V, Závěská Drábková L, Hůlková M, Hořínek A, Dušková D, Feyereisl J, Minář L, Kohoutová M. (2015) Evaluation of Cell-Free Urine microRNAs Expression for the Use in Diagnosis of Ovarian and Endometrial Cancers. A Pilot Study. *Pathol Oncol Res*, 21: 1027–1035.
 160. Zhou J, Gong G, Tan H, Dai F, Zhu X, Chen Y, Wang J, Liu Y, Chen P, Wu X, Wen J. (2015) Urinary microRNA-30a-5p is a potential biomarker for ovarian serous adenocarcinoma. *Oncol Rep*, 33: 2915–2923.
 161. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee M-LT, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB. (2008) Detection of microRNA Expression in Human Peripheral Blood Microvesicles. *PLoS One*, 3: 3694.
 162. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M. (2011) Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci*, 108: 5003–5008.
 163. Turchinovich A, Weiz L, Langheinze A, Burwinkel B. (2011) Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*, 39: 7223–7233.
 164. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. (2011) MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*, 13: 423–435.
 165. Wagner J, Riwanto M, Besler C, Knau A, Fichtlscherer S, Röxe T, Zeiher AM, Landmesser U, Dimmeler S. (2013) Characterization of levels and cellular

- transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33: 1392–1400.
166. Soon PSH, Tacon LJ, Gill AJ, Bambach CP, Sywak MS, Campbell PR, Yeh MW, Wong SG, Clifton-Bligh RJ, Robinson BG, Sidhu SB. (2009) miR-195 and miR-483-5p identified as predictors of poor prognosis in adrenocortical cancer. *Clin Cancer Res*, 15: 7684–7692.
 167. Patterson EE, Holloway AK, Weng J, Fojo T, Kebebew E. (2011) MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy. *Cancer*, 117: 1630–1639.
 168. Özata DM, Caramuta S, Velázquez-Fernández D, Akçakaya P, Xie H, Höög A, Zedenius J, Bäckdahl M, Larsson C, Lui W-OO. (2011) The role of microRNA deregulation in the pathogenesis of adrenocortical carcinoma. *Endocr Relat Cancer*, 18: 643–655.
 169. Schmitz KJ, Helwig J, Bertram S, Sheu SY, Suttorp AC, Seggewiß J, Willscher E, Walz MK, Worm K, Schmid KW. (2011) Differential expression of microRNA-675, microRNA-139-3p and microRNA-335 in benign and malignant adrenocortical tumours. *J Clin Pathol*, 64: 529–535.
 170. Duregon E, Rapa I, Votta A, Giorcelli J, Daffara F, Terzolo M, Scagliotti G V., Volante M, Papotti M. (2014) MicroRNA expression patterns in adrenocortical carcinoma variants and clinical pathologic correlations. *Hum Pathol*, 45: 1555–1562.
 171. Feinmesser M, Benbassat C, Meiri E, Benjamin H, Lebanony D, Lebenthal Y, de Vries L, Drozd T, Spector Y. (2015) Specific MicroRNAs Differentiate Adrenocortical Adenomas from Carcinomas and Correlate With Weiss Histopathologic System. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM*, 23: 522–531.
 172. Gara SK, Wang Y, Patel D, Liu-Chittenden Y, Jain M, Boufraquech M, Zhang L, Meltzer PS, Kebebew E. (2015) Integrated genome-wide analysis of genomic changes and gene regulation in human adrenocortical tissue samples. *Nucleic Acids Res*, 43: 9327–9339.
 173. Koperski Ł, Kotlarek M, Świerniak M, Kolanowska M, Kubiak A, Górnicka B, Jażdżewski K, Wójcicka A. (2017) Next-generation sequencing reveals

- microRNA markers of adrenocortical tumors malignancy. *Oncotarget*, 8: 49191–49200.
174. Chabre O, Libé R, Assie G, Barreau O, Bertherat J, Bertagna X, Feige JJ, Cherradi N. (2013) Serum miR-483-5p and miR-195 are predictive of recurrence risk in adrenocortical cancer patients. *Endocr Relat Cancer*, 20: 579–594.
 175. Szabó DR, Luconi M, Szabó PM, Tóth M, Szücs N, Horányi J, Nagy Z, Mannelli M, Patócs A, Rácz K, Igaz P. (2013) Analysis of circulating microRNAs in adrenocortical tumors. *Laboratory Investigation*, 94: 331–339.
 176. Patel D, Boufraǵech M, Jain M, Zhang L, He M, Gesuwan K, Gulati N, Nilubol N, Fojo T, Kebebew E. (2013) MiR-34a and miR-483-5p are candidate serum biomarkers for adrenocortical tumors. *Surg (United States)*, 154: 1224–1229.
 177. Perge P, Butz H, Pezzani R, Bancos I, Nagy Z, Pálóczi K, Nyíró G, Decmann Á, Pap E, Luconi M, Mannelli M, Buzás EI, Tóth M, Boscaro M, Patócs A, Igaz P. (2017) Evaluation and diagnostic potential of circulating extracellular vesicle-associated microRNAs in adrenocortical tumors. *Sci Rep*, 7: 5474.
 178. Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. (2012) Extracellular miRNAs: The mystery of their origin and function. *Trends Biochem Sci*, 37: 460–465.
 179. Perge P, Decmann Á, Pezzani R, Bancos I, Fassina A, Luconi M, Canu L, Tóth M, Boscaro M, Patócs A, Igaz P. (2018) Analysis of circulating extracellular vesicle-associated microRNAs in cortisol-producing adrenocortical tumors. *Endocrine*, 59: 280–287.
 180. Nagy Z, Baghy K, Hunyadi-Gulyás É, Micsik T, Nyíró G, Rácz G, Butz H, Perge P, Kovalszky I, Medzihradzsky KF, Rácz K, Patócs A, Igaz P. (2015) Evaluation of 9-cis retinoic acid and mitotane as antitumoral agents in an adrenocortical xenograft model. *Am J Cancer Res*, 5: 3645–3658.
 181. Salvianti F, Canu L, Poli G, Armignacco R, Scatena C, Cantini G, Di Franco A, Gelmini S, Ercolino T, Pazzagli M, Nesi G, Mannelli M, Pinzani P, Luconi M. (2017) New insights in the clinical and translational relevance of miR483-5p in adrenocortical cancer. *Oncotarget*, 8: 65525–65533.
 182. He J, Cao Y, Su T, Jiang Y, Jiang L, Zhou W, Zhang C, Wang W, Ning G. (2015) Downregulation of miR-375 in aldosterone-producing adenomas promotes tumour cell growth via MTDH. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 83: 581–589.

183. Love MI, Huber W, Anders S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, 15: 550.
184. Chow S-C, Shao J, Wang H. Comparing Means. In: Chow S-CS (szerk.) *Sample Size Calculations in Clinical Research*. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, 2008: 451.
185. Patterson E, Webb R, Weisbrod A, Bian B, He M, Zhang L, Holloway AK, Krishna R, Nilubol N, Pacak K, Kebebew E. (2012) The microRNA expression changes associated with malignancy and SDHB mutation in pheochromocytoma. *Endocr Relat Cancer*, 19: 157–166.
186. Chen Q, Hu H, Jiao D, Yan J, Xu W, Tang X, Chen J, Wang J. (2016) MiR-126-3p and miR-451a correlate with clinicopathological features of lung adenocarcinoma: The underlying molecular mechanisms. *Oncol Rep*, 36: 909–917.
187. Babapoor S, Fleming E, Wu R, Dadras SS. (2014) A novel mir-451a isomir, associated with amelanotypic phenotype, acts as a tumor suppressor in melanoma by retarding cell migration and invasion. *PLoS One*, 9: 120.
188. Takahasi K, Iinuma H, Wada K, Minezaki S, Kawamura S, Kainuma M, Ikeda Y, Shibuya M, Miura F, Sano K. (2018) Usefulness of exosome-encapsulated microRNA-451a as a minimally invasive biomarker for prediction of recurrence and prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 25: 155–161.
189. Li M, Song Q, Li H, Lou Y, Wang L. (2015) Circulating miR-25-3p and miR-451a may be potential biomarkers for the diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *PLoS One*, 10: 0132403.
190. Yang S, Sui J, Liu T, Wu W, Xu S, Yin L, Pu Y, Zhang X, Zhang Y, Shen B, Liang G. (2019) Expression of miR-486-5p and its significance in lung squamous cell carcinoma. *J Cell Biochem*, 120: 13912–13923.
191. Kelley KA, Wieghard N, Chin Y, Potter A, Mori M, Wong MH, Chin K, Tsikitis VL. (2018) MiR-486-5p Downregulation Marks an Early Event in Colorectal Carcinogenesis. *Dis Colon Rectum*, 61: 1290–1296.
192. Mohamed MA, Mohamed EI, El-Kaream SAA, Badawi MI, Darwish SH. (2018) Underexpression of miR-486-5p but not Overexpression of miR-155 is

- Associated with Lung Cancer Stages. *MicroRNA*, 7: 120–127.
193. Tian F, Shen Y, Chen Z, Li R, Lu J, Ge Q. (2016) Aberrant miR-181b-5p and miR-486-5p expression in serum and tissue of non-small cell lung cancer. *Gene*, 591: 338–343.
 194. Tan K, Huang G, Fang Q. (2017) MiR-486-5p prevents migration, invasion and EMT by regulating smad2 in breast cancer. *Int J Clin Exp Med*, 10: 8942–8949.
 195. Lin Y, Xu T, Zhou S, Cui M. (2017) MicroRNA-363 inhibits ovarian cancer progression by inhibiting NOB1. *Oncotarget*, 8: 101649–101658.
 196. Liu J, Li Q, Li R, Ren P, Dong S. (2017) MicroRNA-363-3p inhibits papillary thyroid carcinoma progression by targeting PIK3CA. *Am J Cancer Res*, 7: 148–158.
 197. Wu X, Xia M, Chen D, Wu F, Lv Z, Zhan Q, Jiao Y, Wang W, Chen G, An F. (2016) Profiling of downregulated blood-circulating miR-150-5p as a novel tumor marker for cholangiocarcinoma. *Tumor Biol*, 37: 15019–15029.
 198. Leoncini PPPP, Bertaina A, Papaioannou D, Flotho C, Masetti R, Bresolin S, Menna G, Santoro N, Zecca M, Basso G, Nigita G, Veneziano D, Pagotto S, D'Ovidio K, Rota R, Dorrance A, Croce CMCM, Niemeyer C, Locatelli F, Garzon R. (2016) MicroRNA fingerprints in juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) identified miR-150-5p as a tumor suppressor and potential target for treatment. *Oncotarget*, 7: 55395–55408.
 199. Pritchard CC, Kroh E, Wood B, Arroyo JD, Dougherty KJ, Miyaji MM, Tait JF, Tewari M. (2012) Blood cell origin of circulating microRNAs: A cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res*, 5: 492–497.
 200. Havelange V, Garzon R. (2010) Micrnas: Emerging key regulators of hematopoiesis. *Am J Hematol*, 85: 935–942.
 201. Igaz I, Igaz P. (2014) Tumor surveillance by circulating microRNAs: A hypothesis. *Cell Mol Life Sci*, 71: 4081–4087.
 202. Chen L, Cui J, Hou J, Long J, Li C, Liu L. (2014) A novel negative regulator of adipogenesis: MicroRNA-363. *Stem Cells*, 32: 510–520.
 203. Mar-Aguilar F, Mendoza-Ramírez JA, Malagón-Santiago I, Espino-Silva PK, Santuario-Facio SK, Ruiz-Flores P, Rodríguez-Padilla C, Reséndez-Pérez D. (2013) Serum circulating microRNA profiling for identification of potential

- breast cancer biomarkers. *Dis Markers*, 34: 163–169.
204. Eichelser C, Flesch-Janys D, Chang-Claude J, Pantel K, Schwarzenbach H. (2013) Deregulated serum concentrations of circulating cell-free microRNAs miR-17, miR-34a, miR-155, and miR-373 in human breast cancer development and progression. *Clin Chem*, 59: 1489–1496.
 205. Pisitkun T, Shen R-F, Knepper MA. (2004) Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci*, 101: 13368–13373.
 206. Scholl U. (2017) Unanswered Questions in the Genetic Basis of Primary Aldosteronism. *Horm Metab Res*, 49: 963–968.
 207. Ye Y, Yang J, Lv W, Lu Y, Zhang L, Zhang Y, Musha Z, Fan P, Yang B, Zhou X, Tang B. (2019) Screening of differentially expressed microRNAs of essential hypertension in Uyghur population. *Lipids Health Dis*, 18: 98.
 208. Gomez-Sanchez CE, Rossi GP, Fallo F, Mannelli M. (2010) Progress in primary aldosteronism: present challenges and perspectives. *Horm Metab Res*, 42: 374–81.
 209. Derwahl M, Studer H. (2002) Hyperplasia versus adenoma in endocrine tissues: are they different? *Trends Endocrinol Metab*, 13: 23–28.
 210. Yu L, Li J, Chen Y, Jiang J, Fang Q, Jiang J, Wang D, Liu M. (2018) hsa-miR-7 Is a Potential Biomarker for Idiopathic Inflammatory Myopathies with Interstitial Lung Disease in Humans. *Ann Clin Lab Sci*, 48: 764–769.
 211. Dong W, Li B, Wang J, Song Y, Zhang Z, Fu C, Zhang P. (2016) Diagnostic and predictive significance of serum microRNA-7 in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, 35: 1449–1456.
 212. Lu P, Wang F, Wu J, Wang C, Yan J, Li Z-L, Song J-X, Wang J-J. (2017) Elevated Serum miR-7, miR-9, miR-122, and miR-141 Are Noninvasive Biomarkers of Acute Pancreatitis. *Dis Markers*, 2017: 7293459.
 213. Wan S, Wang J, Wang J, Wu J, Song J, Zhang C-Y, Zhang C, Wang C, Wang J-J. (2017) Increased serum miR-7 is a promising biomarker for type 2 diabetes mellitus and its microvascular complications. *Diabetes Res Clin Pract*, 130: 171–179.
 214. Heverhagen AE, Legrand N, Wagner V, Fendrich V, Bartsch DK, Slater EP. (2018) Overexpression of MicroRNA miR-7-5p Is a Potential Biomarker in

- Neuroendocrine Neoplasms of the Small Intestine. *Neuroendocrinology*, 106: 312–317.
215. Zhu W, Wang Y, Zhang D, Yu X, Leng X. (2018) MiR-7-5p functions as a tumor suppressor by targeting SOX18 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 497: 963–970.
216. Li J, Qiu M, An Y, Huang J, Gong C. (2018) miR-7-5p acts as a tumor suppressor in bladder cancer by regulating the hedgehog pathway factor Gli3. *Biochem Biophys Res Commun*, 503: 2101–2107.
217. Giles KM, Brown RAM, Ganda C, Podgorny MJ, Candy PA, Wintle LC, Richardson KL, Kalinowski FC, Stuart LM, Epis MR, Haass NK, Herlyn M, Leedman PJ. (2016) microRNA-7-5p inhibits melanoma cell proliferation and metastasis by suppressing RelA/NF- κ B. *Oncotarget*, 7: 31663–31680.
218. Bulent Vatan M, Kalaycı Yigin A, Akdemir R, Tarik Agac M, Akif Cakar M, Aksoy M, Tatli E, Kilic H, Gunduz H, Guzel D, Karacan K. (2016) Altered Plasma MicroRNA Expression in Patients with Mitral Chordae Tendineae Rupture. *J Heart Valve Dis*, 25: 580–588.
219. Kim B-S, Jung J-Y, Jeon J-Y, Kim H-A, Suh C-H. (2016) Circulating hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-92a-3p, and hsa-miR-223-3p may be novel biomarkers in systemic lupus erythematosus. *HLA*, 88: 187–193.
220. Hosseini SM, Soltani BM, Tavallaei M, Mowla SJ, Tafsiri E, Bagheri A, Khorshid HRK. (2018) Clinically Significant Dysregulation of hsa-miR-30d-5p and hsa-let-7b Expression in Patients with Surgically Resected Non-Small Cell Lung Cancer. *Avicenna J Med Biotechnol*, 10: 98–104.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1. Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények jegyzéke

1. Decmann A, Perge P, Tóth M, Igaz P. (2018) Adrenal myelolipoma: a comprehensive review. *Endocrine*, 59: 7-15.

Impakt faktor 2018: 3,296

2. Decmann A, Perge P, Nyíró G, Darvasi O, Likó I, Borka K, Micsik T, Tóth Z, Bancos I, Pezzani R, Iacobone M, Patocs A, Igaz P. (2018) MicroRNA expression profiling in adrenal myelolipoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 103: 3522-3530.

Impakt faktor 2018: 5,605

3. Decmann A, Bancos I, Khanna A, Thomas MA, Turai P, Perge P, Pintér JZ, Tóth M, Patócs A, Igaz P. (2019) Comparison of plasma and urinary microRNA-483-5p for the diagnosis of adrenocortical malignancy. *J Biotechnol*, 297: 49-53.

Impakt faktor 2018: 3.163

10.2 Az értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó saját közlemények jegyzéke

1. Perge P, Decmann A, Igaz P, (2015). A neuroendokrin daganatok kezelése szomatosztatinanalógokkal. Magy Belorv Arch, 68: 317-322.

2. Perge P, Butz H, Pezzani R, Bancos I, Nagy Z, Pálóczi K, Nyíró G, Decmann A, Pap E, Luconi M, Mannelli M, Buzas EI, Tóth M, Boscaro M, Patócs A, Igaz P. (2017) Evaluation and diagnostic potential of circulating extracellular vesicle-associated microRNAs in adrenocortical tumors, Sci Rep, 7: 5474.

Impakt faktor 2017: 4,122

3. Perge P, Nagy Z, Decmann A, Igaz I, Igaz P. (2017) Potential relevance of microRNAs in inter-species epigenetic communication, and implications for disease pathogenesis. RNA Biol, 14: 391-401.

Impakt faktor 2017: 5,216

4. Decmann A, Perge P, Nagy Z, Butz H, Patócs A, Igaz P. (2017) Keringő mikroRNS-ek az endokrin daganatok diagnosztikájában. Orv Hetil, 158: 483-491.

Impakt faktor 2017: 0,322

5. Nagy Z, Decmann A, Perge P, Igaz P. (2018) A mikroRNS-ek patogenetikai és diagnosztikai szerepe mellékvesekéreg-carcinomában. Orv Hetil, 159: 245-251.

Impakt faktor 2018: 0,564

6. Perge P, Decmann A, Pezzani R, Bancos I, Fassina A, Luconi M, Canu L, Tóth M, Boscaro M, Patócs A, Igaz P. (2018) Analysis of circulating extracellular vesicle-associated microRNAs in cortisol-producing adrenocortical tumors. Endocrine, 59: 280-287.

Impakt faktor 2018: 3,296

11. Köszönetnyilvánítás

Nagy köszönettel tartozom **Prof. Dr. Igaz Péternek**, a Semmelweis Egyetem II.sz. Belgyógyászati Klinika igazgatójának, témavezetőmnek, hogy kutatócsoportjába fogadott és számomra kimagasló példát nyújtva irányította az eddigi munkámat.

Köszönöm **Dr. Patócs Attila** egyetemi docens úrnak, hogy az Endokrin Genetika Laborban számomra helyet biztosított, és hogy szakmai kérdéseimre mindig a lényegre látva és hatalmas szakmai tudással válaszolt.

Köszönöm továbbá az Endokrin Genetika Labor, illetve a Szteroid és Izotóp Laboratórium minden dolgozójának mindig segítőkész hozzáállását. Különösképpen is **Dr. Perge Pálnak, Dr. Nyíró Gábornak, Fülöpné Németh Kingának, Dr. Kövesdi Annamáriának, Dr. Nagy Zoltánnak, Dr. Sarkadi Balázsnak és Dr. Sumánszki Csabának**. A Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikai Endokrin Osztályának minden dolgozójának segítségéért is hálás vagyok, különösen is **Prof. Dr. Tóth Miklósnak és Tóth Zsuzsannának**.

Hálás vagyok a **Jóistennek**, a **családomnak** és **páromnak**, hogy szeretetükkel és támogatásukkal elősegítették azt, hogy ez a munka elkészüljön.