

DOI:10.14753/SE.2018.2190

A glukokortikoid érzékenységet befolyásoló genetikai eltérések

Doktori értekezés

dr. Molnár Ágnes

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Patócs Attila, Ph.D, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Dénes Judit, Ph.D, klinikai orvos
Dr. Medvecz Márta, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Buzás Edit, MTA doktora, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Hubina Erika, Ph.D, főorvos
Dr. Nagy Bálint, az MTA doktora,
tudományos főmunkatárs

Budapest
2018

Tartalomjegyzék

Ábrák és táblázatok jegyzéke	4
Rövidítések jegyzéke	7
I. Bevezetés	11
Irodalmi áttekintés	13
1. A glukokortikoidok	13
2. A glukokortikoid receptor (GR) és jelátviteli útvonala	14
2.1. A GR-t kódoló gén	15
2.2. GR gén polimorfizmusok	16
a. BcII. (rs41423247) variáns	17
b. N363S (rs6195) variáns	17
c. A3669G (rs6198) variáns	18
2.3. A GR gén polimorfizmusok hatásai a fenotípusra	18
2.4. Chrousos szindróma és a GR gén mutációihoz társuló kórképek	23
2.5. GR mutációk hatása a GR jelátviteli útvonalaira	26
2.6. Az R714Q mutáció	28
3. A 11- β -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim	29
3.1. A 11- β -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzimet kódoló gén (HSD11B1 gén) 31	31
3.2. <i>HSD11B1</i> gén polimorfizmusok és klinikai vonatkozásuk	31
4. Addison kór	32
4.1. Az Addison kór etiológiája és tünetei	32
4.2. Az Addison kór diagnózisa	34
4.3. Az Addison kór kezelése	35
II. Célkitűzések	38
III. Módszerek	40
1. Vizsgált beteg- és kontroll csoport	40
2. Klinikai és laboratóriumi paraméterek	42
3. Csontsűrűség mérés	43
4. Molekuláris biológiai módszerek	43
4.1. DNS izolálás	43
4.2. Allél specifikus PCR reakció	44

4.3.	Valós idejű (real time) PCR reakció.....	45
4.4.	Direkt DNS szekvenálás.....	46
5.	Statisztikai módszerek.....	48
6.	Három dimenziós protein modellezés.....	48
IV.	Eredmények.....	49
1.	GR polimorfizmusok hatásai.....	52
a.	BclI. polimorfizmus.....	52
b.	N363S polimorfizmus.....	52
c.	A3669G polimorfizmus.....	54
2.	HSD11B1 polimorfizmusok hatásai.....	54
a.	rs12086634 polimorfizmus.....	54
b.	rs4844880 polimorfizmus.....	54
3.	Esetismerterés – R714Q mutáció következtében kialakult Chrousos szindróma	59
V.	Megbeszélés.....	63
1.	A GR és HSD11B1 polimorfizmusok vizsgálati eredményei.....	63
2.	Esetismertetés megbeszélése.....	67
VI.	Következtetések.....	70
VII.	Összefoglalás.....	72
VIII.	Summary.....	73
IX.	Irodalomjegyzék.....	74
X.	Saját publikációk jegyzéke.....	94
1.	A dolgozat témájában megjelent közlemények.....	94
2.	A dolgozat témájától független publikációk.....	94
XI.	Köszönetnyilvánítás.....	95

Ábrák és táblázatok jegyzéke

- 1. Táblázat.** Az eddig publikált glukokortikoid rezisztenciával járó eseteknél észlelt klinikai tünetek illetve a kórokozó mutációk
- 2. Táblázat.** A vizsgált Addison kóros betegek illetve egészséges kontroll csoportok klinikai jellemzői
- 3. Táblázat.** A *GR* és *HSD11B1* polimorfizmusok illetve az antropometriai, laboratóriumi paraméterek és a hormonpótló dózis közötti összefüggés vizsgálata során nyert p értékek egy utas ANOVA segítségével, Addison kóros betegekben
- 4. Táblázat.** A vizsgált *GR* és *HSD11B1* polimorfizmusok genotípus megoszlása és allélgyakorisága Addison kóros betegekben és a kontroll csoportokban.
- 5. Táblázat.** Az rs12086634 és rs4844880 polimorfizmusokat hordozó és nem hordozó Addison kóros betegek klinikai paraméterei közötti különbségeket reprezentáló p értékek dexamethasont szedő és nem szedő betegcsoportokban
- 6. Táblázat.** A vizsgált *GR* és *HSD11B1* polimorfizmusok genotípus megoszlása és allélgyakorisága Addison kóros betegekben, dexamethasont szedő és nem szedő alcsoportokban
- 7. Táblázat.** Az rs4844880 polimorfizmus illetve a BMI, hydrocortisone ekvivalens hormonpótló dózis és csontsűrűség értékek közötti összefüggést reprezentáló p értékek 50 év feletti és alatti, Addison kóros betegcsoportokban
- 8. Táblázat.** Glukokortikoid rezisztenciában szenvedő, 31 éves nőbeteg és tünetmentes testvére esetében mért laboratóriumi paraméterek

1. **Ábra.** Glukokortikoid vegyületek hatásmódja (Glu: glukokortikoid; R: receptor; CBG: kortikoszteroidkötő fehérje; GRE: glukokortikoid reszponzív elemek; Hsp: hőshock fehérje; DNS: deoxiribonukleinsav; mRNS: messenger ribonukleinsav)
2. **Ábra.** A GR gén egyszerűsített felépítése és leggyakoribb funkcionális polimorfizmusainak sematikus ábrázolása a GR génben, az SNP-k elnevezései és az okozott változás fehérjeszinten
3. **Ábra.** A 11- β -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim 1-es és 2-es altípusainak szerepe a kortizol-kortizon átalakulásban
4. **Ábra.** Sémás ábra a *HSD11B1* gén szerkezetéről, a szürke négyzetek (1-6) a kódoló exonokat jelölik, a számok pedig az exonok közötti intronok méretét.
5. **Ábra.** Hiperpigmentáció Addison-kórban
6. **Ábra.** A szérum kortizol szint cirkadián ritmusa egészségesekben (telt vonal) és szérum kortizol koncentráció hormonpótló terápia során (szaggatott vonal)
7. **Ábra.** A BclI. polimorfizmus vizsgálata, allél-specifikus PCR reakciót követően az eredmények gélektroforetikus értékelése: a marker mellett (1.oszlop) pozitív kontrollként egy homozigóta mutáns (GG) minta, mellette negatív kontrollként egy homozigóta vad (AA) genotípusú minta látható. Mellette balról jobbra két heterozigóta minta (AG) látható, melyek esetében a vad és mutáns allélokat jelölő mindkét sáv megtalálható. Ezt követően a felvitt minták genotípusa: GG-AG-AA-AG-AG-AA-AA-GG-AG-AA-AG
8. **Ábra.** Az A3669G polimorfizmus vizsgálata real-time PCR segítségével. Az első ábrán egy heterozigóta hordozó minta látható, a vizsgálat során a FAM-mal és VIC-kel jelölt vad és mutáns allélek egyaránt és egy időben adtak jelintenzitást. A jobb oldali ábrán egy homozigóta vad genotípusú minta mérési eredménye látható, csak a FAM-mal jelölt vad típusú allél adott érdemi jelintenzitást.
9. **Ábra.** A *GR* gén direkt DNS szekvenálása során a PCR reakciót követően az eredmények gélektroforetikus értékelése (bal oldali kép, 5-9 exonok), a PCR termék kivágása (középső kép), majd tisztítást követően a PCR termékek ismételt gélektroforetikus ellenőrzése (jobb oldali kép).
10. **Ábra.** Direkt DNS szekvenálás sorány nyert kromatogram képe
11. **Ábra.** Az átlagos testtömeg-index (BMI, kg/m²) (Panel A) és össz. hydrocortisone ekvivalens szubsztitúciós dózis (mg/nap) (Panel B) ábrázolása homozigóta vad

(CC), heterozigóta (CG) és homozigóta mutáns (GG) BclI polimorfizmust hordozók esetében, Addison-kóros betegekben

12. Ábra. BMI (kg/m^2) (panel A) és testtömegre korrigált hormon-szubsztitúciós dózis (mg/kg/nap) (panel B) az rs4844880 polimorfizmust hordozók és nem hordozók esetében, Addison-kóros betegcsoportban

13. Ábra. Sanger szekvenálással nyert kromatogram, melyen a heterozigóta c.2141G→A mutáció ábrázolódik a GR gén 8.exonjának régiójában, az index beteg és a klinikailag egészséges testvérében (**A**); három dimenziós modell a 714-es aminosav pozícióban elhelyezkedő argininről (**B**) illetve glutaminról (**C**): a 714-es pozícióban eredetileg elhelyezkedő arginin a ligand kötő domén felszínén található, nagy pozitív töltéssel rendelkezik. A glutaminra történő aminosavcsere szerkezeti- és töltésbeli változásokat hoz létre (a domén gerince szalagként jelenik meg, a 714-es és környező aminosavakat gömbök jelölik, az arginint világoskék, a glutamint zöld szín jelöli).

Rövidítések jegyzéke

11HSD / 11 β -HSD - 11-beta-hidroxiszteroid dehidrogenáz (11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase)

2DM - 2-es típusú diabétesz mellitusz (diabetes mellitus type 2)

ACTH - adrenokortikotrop hormon (adrenocorticotropic hormone)

AF-1 és AF-2 – transzaktivációs felszín (transactivation funktion)

AIRE – autoimmun regulátor gén (autoimmune regulator)

ALL – akut limfoid leukémia

AMI – akut miokardiális infarktus

APECED - autoimmun poliendokrinopátia-kandidiázis-ektodermális disztrófia (autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy)

BMD - csontsűrűség (bone mineral density)

BMI – testtömeg index (body mass index)

CAH – kongenitális adrenális hiperplázia

CBG - kortizol kötő globulin (cortisol binding globulin)

CRH - corticotropi releasing hormone

DBD – DNS kötő domén (DNA binding domain)

DEXA - kettős röntgen foton-abszorpciometria (dual-energy x-ray absorptiometry)

DHEA – dehidroepiandroszteron (dehydroepiandrosterone)

DHEAS - dehidroepiandroszteron-szulfát (dehydroepiandrosterone sulfate)

DOC - deoxikortikoszteron

DM – diabétesz mellitusz

E - kortizon (cortisone)

EPO – eritropoetin gén

F - kortizol (cortisol)

FSH – follikuluszstimuláló hormon

fT4 – szabad tiroxin (free thyroxin)

G6PD – glukóz-6-foszfát dehidrogenáz

GH - növekedési hormon (growth hormone)

GR - glukokortikoid receptor (glucocorticoid receptor)

GRE – glukokortikoid reszponzív szakasz (glucocorticoid responsive element)

GRIP1 - glucocorticoid receptor interacting protein 1

HDL – magas denzitású lipoprotein (high density lipoprotein)

HPA - hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely (hypothalamo-pituitary-adrenal axis)

HSD11B1 - 11-beta-hidroxiszteroid dehidrogenáz enzimet kódoló gén

HSP90 – hő sokk-fehérje 90 (heat shock protein 90)

IGF-1 - inzulinszerű növekedési faktor 1 (insulin-like growth factor-1)

IGT – csökkent glukóz tolerancia (impaired glucose tolerance)

IRDS - infantilis típusú respirációs distressz szindróma

LBD – ligandkötő domén (ligand binding domain)

LDL – alacsony denzitású lipoprotein (low density lipoprotein)

LH – luteotrop hormon

MR - mineralokortikoid receptor (mineralocorticoid receptor)

NAD - nikotinsavamid-adenin-dinukleotid (nicotinamide adenine dinucleotide)

NADP - nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

NTD – N-terminális transzaktivációs domén (N-terminal transactivation domain)

OGTT – orális glükóz tolerancia teszt

PCOS - policisztás ovárium szindróma (polycystic ovary syndrome)

PCR - polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)

PEG – polietilén glikol (polyethylene glycol)

PRA – plazma renin aktivitás

Real Time (RT) PCR - valós idejű polimeráz láncreakció (real-time polymerase chain reaction)

RFLP – restrikciós fragmens hossz polimorfizmus (restriction fragment length polymorphism)

RR - vérnyomás

SAME – syndrome of mineralocorticoid excess

SDRs – rövid láncú dehidrogenáz/reduktáz szupercsalád (Short-Chain Dehydrogenase/Reductase superfamily)

SHBG – nemi hormont kötő fehérje (sex hormone binding globulin)

SLE – szisztémás lupus erythematosus

SMR – standardizált halálozási ráta (standard mortality rate)

SNP - egyponos nukleotidvariáció (single nucleotide polymorphism)

TSH – tiroidea stimuláló hormon

UFC – vizelet szabad kortizol (urinary free cortisol)

I. Bevezetés

A glukokortikoidok a stresszre adott válaszáért felelős szteroid hormonok, melyeknek jelentős hatása van a szénhidrát-, fehérje-, zsír-, kalcium- és csontanyagcserére, az immunrendszer működésére, a növekedésre és a viselkedés szabályozására. Jelentőségük van számos betegség gyógyszeres terápiájában, például az autoimmun megbetegedések, súlyos infekció, nefrózis szindróma, egyes bőrgyógyászati kórképek, allergiás betegségek, légzőszervi és hematológiai betegségek, gyermekkori akut leukémia, idegrendszeri elváltozások kezelésében, és pl. a szervtranszplantációt követő kilökődés gátlásában. Hiánya esetén, például Addison kórban vagy hipopituitarizmusban, a betegeknek akár életre szóló hormonpótló terápiára lehet szükségük, melynek pontos beállítása elengedhetetlen a mellékhatások minimalizálása érdekében. Egészségesekben a szérumban a kortizol szint diurnális ritmust mutat, melyet a mai rendelkezésre álló terápiás lehetőségekkel gyakorlatilag lehetetlen reprodukálni. A ritmust befolyásolja a kor, a nem, a kortizolt kötő fehérje (cortisol binding globulin, CBG) szintje, a testtömeg, az egyéni glukokortikoid érzékenység és metabolizmus.

A glukokortikoidok intracellulárisan elhelyezkedő receptorhoz kötődve fejtik ki hatásukat. A glukokortikoid receptor génje (GR) az 5. kromoszóma hosszú karján helyezkedik el. Napjainkban több mint 3000 GR génpolimorfizmust (single nucleotide polymorphism; SNP) azonosítottak. A leggyakrabban vizsgált GR SNP-k (N363S, BcII., ER22/23EK és A3669G) összefüggéseket mutattak a csökkent vagy fokozott glukokortikoidok iránti érzékenységgel.

A glukokortikoidok szövet-specifikus, lokális hatását prereceptorális szinten a 11- β -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim (11HSD) modulálja. Ennek 2-es típusa a biológiailag aktív kortizolt inaktív kortizonná alakítja, ezzel védve a mineralokortikoid receptort a túlzott glukokortikoidok általi aktiválástól. Az enzim 1-es típusa egy NADPH dependens, bidirekcionális enzim, melynek mind dehidrogenáz, mind pedig reduktáz aktivitása van. A reduktáz hatás dominál, a kortizol átalakításáért felelős a biológiailag inaktív kortizonból, ezáltal fokozva a GR aktivációját. Az enzim szövet szintű expressziója és az enzimaktivitás lokális regulációjának szerepe lehet egyes betegségek patomechanizmusában, úgy mint elhízás és metabolikus szindróma, policisztás ovárium szindróma, glukokortikoid indukálta oszteoporózis és reumatoid artritisz. A HSD11B1

gén polimorfizmusai befolyásolhatják az enzim aktivitását, ezáltal prereceptoriálisan szabályozhatják a GR-hoz hozzáférhető hormon mennyiségét, amelynek végeredményeként módosulhat a szöveti glukokortikoid érzékenység. A HSD11B1 gén variánsai a receptor különböző mértékű ellátottságának, a GR gén polimorfizmusok pedig a receptor érzékenységének modulálásával befolyásolhatják a hormonhatás mértékét, amelyeknek fontos szerepe lehet az egyéni hormonigény kialakításában. Az optimális dozírozás elengedhetetlen a mellékhatások megelőzése mellett a szükséglet biztosítása érdekében.

Irodalmi áttekintés

1. A glukokortikoidok

A glukokortikoidok a szervezet egyik fő stresszhormonjai. Jelentős szerepük van a szénhidrát-, fehérje-, zsír-, kalcium- és csontanyagcserében, az immunrendszer működésében, a növekedésben és a viselkedés szabályozásában¹. Elengedhetetlen részei számos betegség gyógyszeres terápiájának; autoimmun betegségek (reumatoid arthritisz, SLE, dermatomiozitisz, gyulladós bélbetegségek, tireoiditisz, spondilitisz, vaszkulitiszek, pemfigusz), akut infekció (H.influenzae meningitisz), nefrózis szindróma, egyes bőrgyógyászati kórképek, például súlyos pszoriázis, allergiás betegségek (asthma bronchiale, kontakt dermatitisz, allergiás kötőhártya- ill. szaruhártya-gyulladás), légzőszervi (COPD egyes esetei), hematológiai betegségek (egyes trombocitopéniák), gyermekkori akut leukémia, idegrendszeri elváltozások (sklerózis multiplex akut exacerbációja, intrakraniális tumorhoz társuló agnyomás-fokozódás), illetve rutinszerűen alkalmazzák a szervtranszplantációt követő kilökődés gátlásában, koraszülés esetén az anyának adagolva pedig csökkenti az újszülött kori IRDS kockázatát.

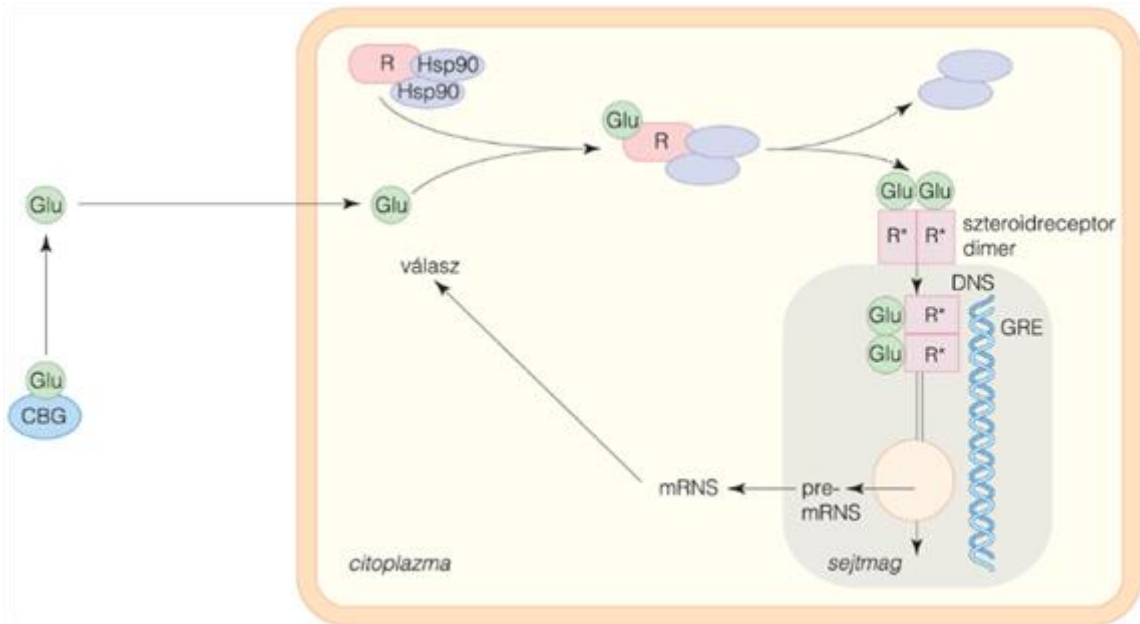
A glukokortikoidok hiánya esetén, például mellékvesekéreg-elégtelenségben, Addison kórban vagy hipopituitarizmusban, a betegeknek akár életre szóló hormonpótló terápiára lehet szükségük. Glukokortikoid hormonpótló terápia során fontos a terápiás dózisok pontos, a szervezet igényének megfelelő beállítása. Az egészségesekben megfigyelhető szérum kortizol koncentrációjának napszaki ingadozásához történő igazítással lehet talán a lehető legjobban optimalizálni a glukokortikoid hormonpótlást, amivel az esetleges mellékhatások csökkenthetők.

Egészségesekben a szérum kortizol szint diurnális ritmust mutat, melyet a mai rendelkezésre álló terápiás lehetőségekkel gyakorlatilag lehetetlen reprodukálni. A ritmust a hipotalamusz nucleus suprachiasmaticusban elhelyezkedő centrális óra szabályozza, mely a retinából kapott jelek alapján szinkronizálódik a környezethez, és ez alapján vezérli a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengelyt. Működésének zavara fáradtsághoz, alvási és étkezési zavarokhoz, metabolikus abnormalitásokhoz vezethet². A normál ritmus során a szérum kortizol szint a hajnali órákban kezd emelkedni, ébredéskor éri el a legmagasabb szintet, majd a nap folyamán folyamatos csökken, a legalacsonyabb

szintet éjjél körül éri el, majd újra növekedni kezd. A ritmust befolyásolja a kor, a nem, a kortizolt kötőfehérje (cortisol binding globulin, CBG) szintje, a testtömeg, a glukokortikoid érzékenység és metabolizmus³. *Idősebbekben* magasabb az átlagos kortizol szint. *Étkezéskor* szérumban szintbeli emelkedés figyelhető meg. *Nőkben* alacsonyabb az átlagos kortizol szint, a változások amplitúdója kisebb. *Terhességben* a CBG szintje nő a szérumban, a szabad kortizol szint is magasabb⁴.

2. A glukokortikoid receptor (GR) és jelátviteli útvonala

A glukokortikoidok intracellulárisan elhelyezkedő receptorokhoz kötődve fejtik ki hatásukat. A glukokortikoid receptor (GR) a nukleáris hormon receptorok családjába tartozik. Ligand nélküli, inaktív formája a citoplazmában helyezkedik el egy multiprotein komplexben, melynek fő komponensei a hőstok fehérjék^{5,6}. A ligand kötődését követően a receptor konformáció változáson megy keresztül, majd a sejtmagba transzlokálódik, ahol homodimereket alkotva a genom glukokortikoid válaszáért felelős specifikus DNS szekvenciáihoz, vagy transzkripciós faktorokhoz kapcsolódik, és így serkenti vagy gátolja azon cél (target) gének transzkripcióját, amelyek az ún. Glucocorticoid Responsiv Elementet (GRE) tartalmaznak⁷⁻¹¹ (**1.Ábra**).



1.Ábra. Glukokortikoid vegyületek hatásmódja (Glu: glukokortikoid; R: receptor; CBG: kortikoszteroidkötő fehérje; GRE: glukokortikoid reszponzív elemek; Hsp: hőshock fehérje; DNS: deoxiribonukleinsav; mRNS: messenger ribonukleinsav)¹²

2.1. A GR-t kódoló gén

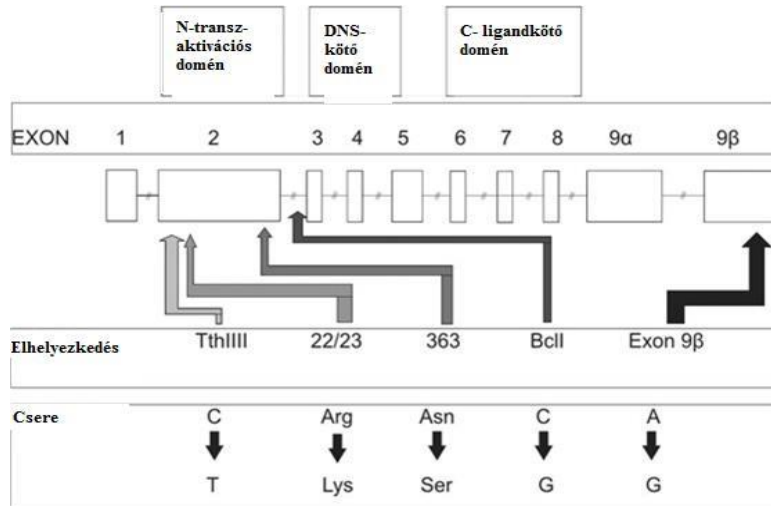
A glukokortikoid receptor génje (génazonosító: NR3C1, GenBank accession number: NM_000176, AY436590, NT_029289) az 5. kromoszóma hosszú karján helyezkedik el (5q31). Hollenberg és munkatársai klónozták 1985-ben¹³, genom szerkezetét Encio és munkatársai írták le 1991-ben¹⁴. A GR kb. 150 kB nagyságú, 9 exonból áll. A fehérjét kódoló rész a 2. exon kezdődik. A fehérjét 3 domén alkotja: az N-terminális transzaktivációs domént a 2. exon kódolja, a DNS-kötő két Zn-ujj domén, ami DNS nagy árkába illeszkedik és a 3.-4. exon kódolja, és a C-terminális ligand kötő domén, ami egy 3 rétegű, antiparallel, alfa hélix szendvics szerkezet és az 5. exontól kezdődően kódolódik. A több promóter régióknak, splicing variánsoknak, majd a transzláció során használt alternatív start kodonoknak, illetve poszttranszlációs módosításoknak (szerin, threonin foszforiláció) köszönhetően változatos receptor variánsok, izoformák jöhetnek létre¹⁵, melyek megoszlása szövettípusonként eltérő

lehet¹⁶. A 9. exonon alternatív splicing eredményeként két receptor variáns jöhet létre; a 9- α (AUG-1 translációs start kodon) ill. 9- β (AUG-27) variánsok¹⁷. A két izoforma fehérje szerkezetében az 1-727 aminosavak azonosak, míg a 9-es exonnak megfelelő karboxi-terminális szakasz különböző, a 777 aminosavból álló GR α a hormonhatás közvetítéséért felelős, aktív receptor, míg a 742 aminosavból álló GR β izoforma a hormon megkötésére és a géntranszkripció aktiválására alkalmatlan¹⁸. A GR β splicing variáns jelentősége, hogy az alfa izoformával heterodimert alkothat és arra domináns negatív hatást gyakorolhat, így a jelátvitelt gátolhatja¹⁹. A jelátvitel erőssége a két GR izoforma megoszlási arányától (is) függhet az adott szövettípusban²⁰.

A receptor két transzaktivációs felszín képez: AF-1 és AF-2 (transactivation function), amelyek a p160 típusú nukleáris receptor koaktivátorokkal, mint például a GRIP1-el (glucocorticoid receptor interacting protein 1) lépnek interakcióba. Az AF-1 gyakorlatilag megfelel az N-terminális transzaktivációs doménnek, míg az AF-2 az LBD-ben helyezkedik el. Az AF-2 a koaktivátorok LXXLL motívumaihoz kötődik ligand-dependens módon, míg az AF-1 a GRIP1 másik, 1121 és 1250 számú aminosavak közötti oldalához, ligand-independens módon^{21,22}.

2.2. GR gén polimorfizmusok

Napjainkban a megismert SNP-k száma rohamosan növekszik, ami az új generációs szekvenálási technológiák rohamos terjedésének is köszönhető. Míg 2003-ban még csak 17 polimorfizmust dokumentáltak²³, mára már több mint 3000 SNP-t azonosítottak⁷. Többsége intronikusan helyezkedik el, allélgyakoriságuk igen alacsony. A leggyakrabban vizsgált GR SNP-k (N363S, BcII., ER22/23EK és A3669G) azonban fontos klinikai asszociációkkal bírnak, amelyek mind a csökkent, mind pedig az emelkedett glukokortikoidok iránti érzékenységgel mutattak összefüggéseket.



2.Ábra. A GR gén egyszerűsített felépítése és leggyakoribb funkcionális polimorfizmusainak sematikus ábrázolása a GR génben, az SNP-k elnevezései és az okozott változás fehérjeszinten²⁴

a. *BclI. (rs41423247) variáns*

A polimorfizmust kezdetben egy RFLP-ként (restriction fragment length polymorphism) írták le, mivel a BclI enzimmel történő emésztés után egy rövid (2.3kb) és egy hosszú (4.5kb) fragmenst eredményez²⁵. A restrikciós enzim hasítóhelyén létrejövő C→G csere a GR 2. intronikus régióban, 647 bázispárnnyira helyezkedik el az exon/intron junkciótól⁸. Ennek az SNP-nek az eredményeként klinikailag fokozott glukokortikoid érzékenység észlelhető²⁶, de ennek hátterében álló molekuláris mechanizmusa ismeretlen. Allélgyakorisága átlagosan 27.7%⁷ a különböző populációkban, munkacsoportunk korábbi vizsgálatai alapján a magyar egészséges kontrollcsoportban 35%²⁷.

b. *N363S (rs6195) variáns*

1997-ben Koper és munkatársai írták le a polimorfizmust, amely az 1220-as nukleotid pozícióban egy AAT→AGT cseréből áll²⁸. Az SNP eredménye egy aszparagin→szerin csere a fehérje 363-as kodonján. A szerin hiperfoszforilációja csendesítheti a glukokortikoidok által regulált génexpressziót⁸. A polimorfizmus

befolyásolhatja a GR gén és koaktivátorok-korepresszorok kölcsönhatását⁷. A polimorfizmus allélgyakorisága átlagosan 3%, a magyar egészséges átlagpopulációban 1.5%²⁷. A homozigóta mutáns génvariáns extrém ritka²⁹, az eddigi kutatások többségében nem fordult elő^{8,30}. Klinikai hatás az emelkedett glukokortikoid érzékenységgel hozható összefüggésbe.

c. A3669G (rs6198) variáns

Az SNP egy A→G nukleotid cseréből áll a 9β exon 3'-UTR részén. Ez a szubsztitúció egy ATTTA motívumban található (ATTTA→GTTTA), amelynek igazolták in vitro kísérletekben az mRNS destabilizáló és receptor fehérje expresszió csökkentő hatását^{31,32}. A GR-9β polimorfizmus egy stabilabb GRβ mRNS-t eredményez. A receptor β izoformája az α izoformával heterodimert alkotva, domináns negatív hatáson keresztül gátolja annak működését³³, így relatív glukokortikoid rezisztenciát okoz³⁴. A polimorfizmus allélgyakorisága átlagosan 9.2%⁷, a magyar átlagpopulációban 22%²⁷.

2.3. A GR gén polimorfizmusok hatásai a fenotípusra

A fokozott glukokortikoid iránti érzékenységgel járó polimorfizmusok (BclI., N363S) kedvezőtlenül, míg a relatív glukokortikoid rezisztenciát okozó SNP-k (A3669G) kedvezően befolyásolhatják a metabolikus státuszt. Emellett hatással lehetnek a glukokortikoid hormonpótló dózisingényre, a terápia során esetlegesen fellépő mellékhatások megjelenésére, ill. egyes polimorfizmusok esetében, bizonyos megbetegedések gyakoribb előfordulását dokumentálták.

Az N363S polimorfizmust korábban összefüggésbe hozták a magasabb BMI-vel (Body Mass Index)^{7,8,29,35,36}, egyes tanulmányokban obesekben a polimorfizmus allélfrekvenciáját a normál populáció duplájának találták³⁷. Egyéb tanulmányok összefüggésbe hozták a nagyobb haskörfogattal³⁵. Ezzel ellentétben egyes vizsgálatokban az N363S polimorfizmus nem mutatott összefüggést **metabolikus eltérésekkel**³⁸.

A BclI. polimorfizmus összefüggését igazolták az abdominális obezitással⁸, magasabb BMI-vel³⁹. Az eddigi eredmények néhol ellentmondásosak, mivel egyes

tanulmányokban csak a homozigóta mutáns (GG) allélhordozók esetében találtak eltérést³⁸, másokban a BclI. polimorfizmus nem befolyásolta a metabolikus státuszt^{7,36}.

A glukokortikoidok iránti érzékenységet csökkentő A3669G polimorfizmus esetében a hordozóknál alacsonyabb BMI értékeket³⁰ és kisebb haskörfogatot mértek³⁰.

Korábbi vizsgálatokban az N363S polimorfizmust hordozók esetében az orális kis dózisú dexamethasonra adott emelkedett inzulin választ észleltek⁸, alacsonyabb HDL koleszterin szintet³⁷, magasabb **koleszterin**³⁵ és magasabb triglicerid szintet³⁵, ill. magasabb össz-koleszterin/HDL arányt mértek³⁵. Más vizsgálatokban az N363S és BclI SNP-eket együttesen hordozók esetében figyeltek meg magasabb koleszterin és LDL-koleszterin értékeket³⁶.

A BclI. polimorfizmus összefüggését figyelték meg az inzulin rezisztenciával⁸ és magasabb **éhomni vércukor** szinttel³⁰. A BclI polimorfizmust homozigóta formában hordozók esetében magasabb OGGT során mért vércukor szinteket, ill. magasabb koleszterin és triglicerid értékeket mértek³⁸. Ezzel ellentétben az A3669G hordozók esetében alacsonyabb éhomni vércukor szinteket figyeltek meg³⁰, ill. alacsonyabb volt a diabétesz mellitusz (DM) előfordulási aránya is⁴⁰.

A **vérnyomást és kardiovaszkuláris rendszert** vizsgálva, akut miokardiális infarktuson (AMI) átesett betegek esetében magasabbnak találták az N363S polimorfizmus előfordulását, mint az egészséges kontrollcsoportban³⁵. Egyes vizsgálatok az N363S polimorfizmust hordozók esetében magasabb vérnyomás értékeket mértek³⁷, illetve az N363S és BclI SNP-eket együttesen hordozókban magasabbnak találták a szisztolés és a diasztolés vérnyomás értékeket³⁶. A BclI. polimorfizmust önmagában is összefüggésbe hozták a magasabb vérnyomással^{30,39,41}. Egy másik vizsgálat csak férfiak esetében állapított meg összefüggést az egyes polimorfizmusok hordozói státusza és az emelkedett kardiovaszkuláris rizikó között, BclI. esetében 34%-kal, míg A3669G esetében 41%-kal emelkedett rizikót vélelmeztek⁴². Szívelégtelen betegcsoport vizsgálatokor a kamrai diszfunkcióval az általunk vizsgált SNP-vel nem, csak az ER22/23EK-val mutatkozott összefüggés⁴³. Addison kóros betegek esetében az A3669G polimorfizmus nem mutatott összefüggést a kardiovaszkuláris rizikóval⁴⁴.

A *GR* SNP-k összefüggései a glukokortikoid érzékenységgel képezi munkám fő témáját. *Irodalmi adatok alapján a BclI.* polimorfizmust hordozóknál magasabbnak találták a reggeli⁴⁰, illetve dexamethason szuppressziós teszt során mért **szérum kortizol** szinteket, míg a plazma ACTH szintek nem különböztek a hordozók és nem-hordozók között³⁰. Egy másik vizsgálat nők esetében szintén magasabbnak találta a szérum kortizol szintet homozigóta BclI. hordozók esetében⁴⁵. Egy további, Addison kóros betegek körében végzett vizsgálat, a polimorfizmust hordozók körében alacsonyabb ACTH szinteket véleményezett a hormonpótló dózistól függetlenül, ami az SNP érzékenyítő hatása miatti fokozott negatív feedback mechanizmusra utalhat³⁸. N363S SNP hordozóknál magasabb szérum kortizol szintet mértek⁴⁶, illetve 0.25mg dexamethason hatására nagyobb mértékű szuppresszió volt elérhető a kortizol szintekben⁴⁷, ami alátámasztja az SNP összefüggését a fokozott glukokortikoid érzékenységgel. Egyes szerzők az A3669G polimorfizmust hordozók esetében magasabbnak találták a bazális szérum kortizol szintet^{30,40,48} az SNP-t nem hordozókhöz viszonyítva, ami szintén alátámasztja az SNP glukokortikoid érzékenységet csökkentő hatását. Ezt megerősítve alacsonyabb szérum kortizol értékeket mértek kis dózisu dexamethason tesztet követően³⁰, míg más vizsgálatok esetében a hordozóknál kisebb mértékű szérum kortizol szint csökkenés volt elérhető a szuppressziós teszt során⁴⁸.

A glukokortikoid egyik fő célszerve a csont. Számos összefüggés ismert a *GR* SNP-k és a megváltozott ütemű **csontanyagcsere** között. A BclI. polimorfizmust homozigóta formában hordozóknál alacsonyabb BMD és Z-score, illetve magasabb β -crosslaps értékeket mértek, ami a hordozók magasabb oszteoporózisra való hajlamára utal⁴⁹. Egy másik vizsgálat női hordozók esetében szintén alacsonyabb BMD értékeket észlelt⁴⁵. Mások homozigóta BclI. hordozóknál emelkedett β -Crosslaps értékeket mértek, de a BMD nem volt eltérő. Ebben a vizsgálatban a hordozókban alacsonyabb volt a napi szteroid hormonpótló dózis, a csontlebontás ennek ellenére is magasabb volt, amiért főként a fokozottabb oszteoklaszt aktivitás lehet felelős⁵⁰. Az N363S polimorfizmust szintén összefüggésbe hozták az alacsonyabb csontdenzitással⁸. A magasabb oszteoporózis rizikónak azért is kiemelt a jelentősége, mert a glukokortikoid hormonpótló terápia - például Addison kóros betegek esetében – önmagában növeli az oszteoklaszt aktivitás⁵¹.

Egyes glukokortikoid receptor polimorfizmusokat összefüggésbe hoztak néhány **autoimmun megbetegedéssel**. A BclI. SNP előfordulása szignifikánsan magasabb Crohn betegekben⁸, míg az A3669G polimorfizmus összefüggését bizonyították reumatoid artritisszel^{32,52} és sklerózis multiplexxel⁵³. Munkacsoportunk korábbi vizsgálatok során a GR β -t overexpresszáló bélhámsejtben is glukokortikoid rezisztenciát igazolt, de bebizonyosodott, hogy a GR β izoformának a GR α -tól eltérő önálló transzkripció hatása is van⁵⁴.

Tekintettel arra, hogy korábban bizonyítást nyert, hogy a munkamemória függ a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely működésétől, illetve diszregulációjától, feltételezhető, hogy a GR polimorfizmusok hatással vannak a **pszichés státuszra**, illetve a munkamemóriára. A BclI. SNP hatását kimutatták a dorsolateralis prefrontalis kéregre, a hordozókban nagyobb aktiváció és alacsonyabb hatékonyság volt megfigyelhető⁵⁵. Bipoláris depresszióban szenvedő betegeknél megfigyelték a lítiumra adott választ a hordozói státusz függvényében, a BclI polimorfizmust nem hordozóknál kiváló válasz volt kimutatható⁵⁶ a polimorfizmust hordozókhoz viszonyítva. A BclI. SNP hajlamosító szerepét igazolták továbbá poszttraumás stressz szindrómára⁵⁷ és major depresszióra⁵⁸, illetve homozigóta hordozó nők esetében gyakoribb volt a súlyos depresszió előfordulása⁵⁹. Emellett az A366G polimorfizmus összefüggését igazolták étkezési zavarokkal⁶⁰ és major depresszióval⁶¹, viszont a hordozók esetében alacsonyabb volt a hipománia és a mániás epizód előfordulása⁶².

A korábban részletezett szervek mellett a glukokortikoidnak **egyéb** hatásai is vannak, amelyek közül a GR SNP-k összefüggéseit is kimutatták. Az eritropoetin génjén (EPO) elhelyezkedő GRE-nek köszönhetően a glukokortikoidoknak, illetve a GR agonistáknak eritropoesist serkentő hatásuk van.⁶³ Ez a mechanizmus állhat a stressz-eritropoesis hátterében is⁶⁴. Ezzel kapcsolatban a dexamethason proliferációt serkentő hatása is kimutatott⁶⁵, sőt a prenatális dexamethason kezelés szignifikánsan emelte a vörösvértestek számát újszülött patkányokban⁶³.

Más vizsgálatok a mellékvese incidentalómák esetében a BclI. SNP hordozókban nagyobb tumor méretet vélelmeztek³⁰, bilaterális mellékvesekéreg adenómák esetében pedig szignifikánsan magasabbnak találták az N363S polimorfizmus előfordulását, illetve

ebben a betegcsoportban a hordozók 100%-ban igazolódott diabétesz mellitusz vagy IGT, nem-hordozókban ez az arány 57% volt. Egyoldali adenomák esetében nem találtak különbséget⁶⁶. Emellett az N363S polimorfizmus bilaterális mellékvesekéreg adenomák esetében befolyásolhatja a patogenezist és CAH-os betegekben módosíthatja a klinikai fenotípust⁶⁶⁻⁶⁸.

Az A366G polimorfizmus hordozók esetében policisztás ovárium szindrómában magasabb LH trend és alacsonyabb életkor volt megfigyelhető a betegség jelentkezésekor, ezzel szemben a BclI. hordozói státusz esetén ugyanebben a betegcsoportban alacsonyabb LH szintet és magasabb életkort regisztráltak a betegség diagnosztizálásakor⁶⁹.

Perzisztáló nazális *Staphylococcus Aureus* hordozókban szignifikánsan alacsonyabbnak találták az A3669G SNP hordozói arányt, ebből az a következtetés vonható le, hogy a polimorfizmus protektív tényező lehet a kolonizációval szemben, a hordozókban kisebb a kolonizáció rizikójának az esélye⁷⁰. Szintén protektív hatását írták le a BclI. polimorfizmusnak Graves oftalmopátia súlyosabb formáival szemben²⁷.

Munkám során a *GR* SNP-knek a hormonpótló terápiára gyakorolt hatását vizsgáltam. Korábban, az irodalomban is leírt összefüggések alapján a glukokortikoid érzékenységet növelő SNP-k esetében alacsonyabb, míg a relatív glukokortikoid rezisztenciát okozó polimorfizmust hordozóknál magasabb **hormonpótló dózis szükséglet** feltételezhető hipadrénia miatt kezelt betegek esetében. Ennek ellenére az irodalomban eddig kevés adat látott napvilágot a polimorfizmusok hormonpótló terápiát befolyásoló hatását illetően. Addison kóros betegek vizsgálatakor az N363S SNP-t hordozóknál magasabb terápiás dózisokat véleményeztek⁷¹, míg az A3669G polimorfizmus hordozói státusza a terápiás dózist nem módosította⁴⁴.

Számos betegség esetében vizsgálták a *GR* polimorfizmusok hordozói státuszának összefüggését a szteroid terápia sikerességével és a **mellékhatások megjelenésével**. Gyulladásos bélbetegségek esetében a BclI. SNP hordozói között gyakoribbnak találták a jó terápiás választ⁷², míg egy másik vizsgálat nem véleményezett összefüggést egyik SNP esetében sem⁷³, sőt az N363S polimorfizmus esetében, másokkal egyetértésben, megerősítették a terápiát befolyásoló hatás hiányát⁷⁴. Ez utóbbi SNP esetében azonban a

hordozók hajlamosabbak voltak gyógyszertoxicitásra akut limfoid leukémia (ALL) terápiája során, de prednisolon terápiára jól reagáltak, és esetükben jobb volt az 5 éves túlélés⁷⁵. Emellett az N363S polimorfizmus hajlamosító hatását mutatták ki a kontrollálatlan asthma bronchiale kialakulására⁷⁶. Graves oftalmopátia esetében az SNP-knek nem volt hatása a terápiás válaszra.⁷⁷

2.4. Chrousos szindróma és a GR gén mutációihoz társuló kórképek

A glukokortikoid rezisztencia, vagy más néven Chrousos szindróma egy ritka, familiáris vagy sporadikus megbetegedés, melynek fő jellemzője a részleges, szövet specifikus vagy generalizált tünetek, melyek okozója a parciális érzéketlenség a glukokortikoidok iránt. Az inszenzitivitás következtében a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely (HPA) a negatív feedback gátlás alól felszabadul, ami emelkedett ACTH, és ennek következtében emelkedett szérumban a kortizol szintekkel jár. A betegség egyik fő jellemzője a hiperkortizolizmus ellenére a Cushingoid tünetek hiánya. A megnövekedett ACTH szint egyéb mellékvese eredetű szteroidok termelését is serkenti, melyek androgén [úgy mint androsztendion, dehidroepiandroszteron (DHEA) és dehidroepiandroszteron-szulfát (DHEAS)], illetve mineralokortikoid [úgy mint deoxikortikoszteron (DOC) és kortikoszteron] hatásokkal bírhatnak^{78,79}, ezáltal a hormontúlprodukciónak mértékétől függően különböző súlyosságú tünetekkel járó kórképet okozhatnak. A klinikai tünetek spektruma az aszimptomatikus, tünetmentes formától^{80,81} egészen a súlyos, hiperandrogenizmussal (akne, hirsutizmus, infertilitás, nőknél oligo-amenorrhoea, férfiaknál oligospermia, gyerekeknél korai pubertás)⁸² és mineralokortikoid túlprodukciónak (hipertónia, hypokalaemia, alkalózis)⁸³ tüneteivel járó kórképekig terjedhet. A betegség leggyakoribb tünete a fáradtság⁸⁰, ami néhány, rezisztens célszerv (például a központi idegrendszer és vázizmok) emelkedett kortizol szérumban-koncentrációra adott inadekvát kompenzációs válaszában következménye lehet⁸². A változatos klinikai fenotípus több okra vezethető vissza: a mineralokortikoid, glukokortikoid és androgén receptor jelátviteli útvonalainak variációi; a célszövetek mineralokortikoid, glukokortikoid és androgének iránti érzékenységének variációi; a hormonokat aktiváló és inaktiváló enzimek (pl. 11- β -hidroxiszteroid dehidrogenáz, 5- α -

reduktáz) aktivitásbeli variációi; egyéb genetikai és epigenetikai faktorok (pl. inzulin rezisztencia, abdominális elhízás).

A diagnózis alapja a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely (HPA axis) részletes vizsgálata, és magába foglalja a szérumban a kortizol szintek mérését mind reggel, mind éjszakai időpontban, továbbá dexamethason adását követően vett mintákból. A diagnózis további kritériuma a 24 órás szabad vizelet kortizol exkreció mérése. A Cushing szindrómával ellentétben, Chrousos szindróma esetén a magas szérumban és vizeletben a kortizol szintek ellenére a HPA tengely stresszre adott válaszkészsége, illetve cirkadián ritmusa megtartott, de dexamethason adásakor a szérumban a kortizol szint ebben az esetben sem szupprimálódik.⁸⁴ Differenciál diagnosztikai szempontból felmerülhet, illetve lehetősége kizárandó a Cushing kór enyhe formájának, mely normális vagy enyhén emelkedett ACTH koncentrációval jár; a pseudo-Cushing szindrómának, például generalizált szorongás vagy depresszió esetében; az emelkedett szérumban a CBG koncentrációval járó állapotoknak, például terhesség és ösztrogén terápia; a mineralokortikoid-indukálta hipertónia egyéb okainak; illetve a hiperandrogenizmus és virilizáció egyéb okainak, például idiopátiás hirsutizmusnak, policisztás ovárium szindrómának (PCOS) és kongenitális adrenális hiperpláziának (CAH).

A glukokortikoid rezisztencia terápia nagy dózisú glukokortikoid adásából áll, ennek célja a túlzott ACTH szekréció, illetve ennek következtében az emelkedett mineralokortikoid illetve androgén hatású szteroidok termelésének a visszaszorítása.⁸⁴ A terápia során a legmegfelelőbbnek azok a szerek bizonyultak, melyek elenyésző mineralokortikoid hatással bírnak (ilyen például a dexamethason, 1-3mg napi dózisban) és a mutáns illetve vad típusú GR aktiválásán keresztül szupprimálják az ACTH szekréciót^{79,84}. A megfelelő HPA tengely szuppresszió főként azokban az esetekben elengedhetetlen, ahol a glukokortikoid jelátvitel súlyosan károsodott, egy esetben például beszámoltak ACTH termelő hipofízis adenoma kialakulásáról hosszú fennállású kortikotrop hiperstimulációval járó csökkent HPA tengely negatív feedback mechanizmus miatt⁸⁵. A hosszú távú dexamethason kezelés beállítása gondos odafigyelést igényel, különös tekintettel a klinikai tünetekre és a laboratóriumi eredményekre^{78,83}.

A betegség hátterében a GR gén mutáció állnak, amelyek genotípus-fenotípus összefüggéseit az alábbiakban ismertetem. A glukokortikoid rezisztencia molekuláris alapjaként a glukokortikoid receptor génjében megjelenő mutációknak tulajdonítottak jelentőséget. Napjainkig a GR génnek több, mint 15 mutációját azonosították, amik a glukokortikoid rezisztencia esetén kórokozó szerepet játszhatnak. Az eddig publikált génmutációkat, illetve az általuk okozott klinikai tüneteket az **1. Táblázatban** foglaltam össze.

1.Táblázat: Az eddig publikált glukokortikoid rezisztenciával járó eseteknél észlelt klinikai tünetek illetve a kórokozó mutációk

	Életkor (év)	Nem	GR mutáció	Klinikai tünetek
Chrousos és mtsai. 1982 ⁷⁸	58	férfi	c.2054A>T, D641V	hipertónia, hypokalemia
Brönnengard és mtsai. 1986 ⁸⁶	46	nő	NA	fáradtság
Karl és mtsai. 1993 ⁸⁷	26	nő	4bp deléció a 6. exonban	hirsutismus, férfias típusú kopaszodás, irreguláris menstruáció
Malchoff és mtsai. 1993 ⁸⁸	6-7	férfi	c.2317G>A, V729I	korai pubertás, hiperandrogenizmus
Karl és mtsai. 1996 ⁸⁵	33	férfi	c.1808T>A, I559N	infertilitás
Kino és mtsai. 2001 ⁸⁹	38	férfi	c.1808T>A, I559N	ACTH termelő hipofízis adenoma az előbb jellemzett betegben
Ruiz és mtsai. 2001 ⁸⁰	41	nő	c.1430G>A, R477H	hirsutizmus, fáradtság, obezitás
Ruiz és mtsai. 2001 ⁸⁰	31	nő	c.2035G>A, G679S	hirsutizmus
Mendonca és mtsai. 2002 ⁹⁰	1 nap	nő	homozigóta c.1844T>C, V571A	női pseudohermafroditizmus, átmeneti genitália, hipertenzió, hypokalemia
Vottero és mtsai. 2002 ⁸¹	18	nő	c.2373T>G, I747M	cisztikus akne, hiperandrogenizmus, hirsutizmus, oligomenorrhoea
Charmandari és mtsai. 2005 ⁹¹	29	nő	c.2318T>C, L773P	fáradtság, szorongás, akne, hirsutizmus
Charmandari és mtsai. 2007 ⁹²	7	férfi	c.2209T>C, F737L	hipertónia, hypokalemia
Charmandari és mtsai. 2008 ⁸²	43	nő	c.1201G>C, D401H	szövet-specifikus glukokortikoid <i>hiperszenzitivitás</i> , elhízás, hipertónia, 2-es típusú diabétesz mellitusz, metabolikus szindróma
Raef és mtsai. 2008 ⁹³	19	férfi	c.2035G>A, G679S	hipertenzió, hypokalemia, korai pubertás
Nader és mtsai. 2010 ⁹⁴	2	nő	c.2141G>A, R714Q	hipoglikémia, hypokalemia, hipertenzió, korai pubarche, enyhe klitoromegália
McMahon és mtsai. 2010 ⁹⁵	1 nap	férfi	c.2318_2319delTG, Leu773fs	hipoglikémia, fáradtság, hipertenzió
Treble és mtsai. 2010 ⁹⁶	20	nő	c.1835delC, Arg612fs	fáradtság, hirsutizmus az arcon

A mutációk következtében kialakuló tünetek hátterében a megváltozott szerkezetű receptor domináns negatív hatását tartják a fő oknak. Ez a mutáns receptor heterodimert képezhet a vad típusú receptorral (heterozigóták esetén), vagy csökkent ligand affinitása miatt okozhat glukokortikoidok iránti érzéketlenséget. Emellett a mutáns receptor megváltozott sejten belüli lokalizációja vagy késleltetett illetve elmaradt transzlokációja a sejtmagba és a csökkent GRE kötő kapacitás illetve affinitás miatti csökkent transzkripciós aktivitása szintén kóroki szerepet játszhat a betegségben⁸².

2.5. GR mutációk hatása a GR jelátvitel útvonalaira

A mutációk következtében megváltozott fehérje a glukokortikoid jelátviteli útvonal több pontján okozhat zavart a szignál transzdukció folyamatában, ezek a következők lehetnek:

Csökkent transzkripciós aktivitás: Tranziens transzfekciós elemzési módszerek használata során (egér emlőtumor vírus promoter indukciója dexamethasonnal) az összes mutáció esetében mutatkozott valamilyen szintű csökkenés a transzaktiváló képességben a vad típusú receptorhoz képest. A legsúlyosabb funkcióbeli károsodás az R477H, I559N, V571A és D641V mutációk esetében volt észlelhető^{80,81,85,87-92,97-99}.

Domináns negatív hatás a vad típusú receptorra: Az eddigi vizsgálatok alapján az I559N, F373L, I747M és L773P mutációk esetében igazolódott a mutáns receptor domináns negatív hatása a vad típusú receptorra, így gátolva annak funkcióját. A jelenség a többi jelátviteli útvonalbeli eltérések hatását erősítve elősegíti a betegség manifesztációját, ez magyarázatot adhat a klinikai tünetek megjelenésére heterozigóta hordozói státusz esetén^{81,85,89,91,92}.

Csökkent ligand iránti affinitás: Gyakorlatilag az összes, ligand kötő domént (LBD) kódoló régióban elhelyezkedő mutáció esetében kimutattak valamilyen szintű, ligand iránti affinitásbeli csökkenést. Az LBD struktúrája 12 α -hélixet és 4 β -redőt tartalmaz, melyek 3 dimenziós szerkezete egy 3 rétegű, helikális domént eredményez¹⁰. A H12-es hélixnek esszenciális szerepe van az ún. "agonista kötő konformáció" kialakításában, és ezáltal a ligand dependens aktiváció folyamatában. A H12 aktív konformáció

stabilitásának megőrzésében az ezt követő, C-terminális β -redő játszik fontos szerepet¹⁰⁰. Dexamethason-kötő vizsgálatok során az ezeket a régiókat érintő, I559N, I747M és V571A mutációk esetében véleményezték a legsúlyosabb károsodását a ligandkötő funkcióknak⁸²⁻⁸⁴.

Megváltozott subcellularis lokalizáció és magi transzlokáció: A vad típusú illetve mutáns szerkezetű receptorok sejten belüli elhelyezkedését és magi transzlokációját HeLa sejtekben, fluorescens proteinnel egyesített receptorok segítségével vizsgálták. A vad típusú glukokortikoid receptor ligand hiányában főként a citoplazmában helyezkedik el, ligand (pl. dexamethason) hatására 12 percen belül a sejtmagba transzlokálódik. V729I és F737L mutációk esetében mind citoplazmatikus, mind magi elhelyezkedés megfigyelhető volt ligand hiányában^{88,92}. A többi vizsgált mutáns receptor megőrizte a főként citoplazmatikus elhelyezkedését. Dexamethasone expozíciót követően a megkésett transzlokációjú, mutáns szerkezetű receptorok sejtmagba való áthelyeződése 20 perctől (R477H) egészen 180 percig (I559N, F737L) tartott⁸².

Csökken DNS kötő képesség: A receptor csökkent DNS kötő képessége azokban az esetekben fordult elő, amikor a patogén mutáció a receptor DBD régiójában helyezkedett el, erre példa az R477H (a DBD régió C-terminális cink ujjában⁹⁹, aminek a receptor homodimerizációjában és ezáltal a GRE megkötésében van szerepe) és a V423A mutáció. Általánosságban az LBD régiót érintő mutációk megőrizték a DNS kötő képességüket.

Megváltozott interakció a GRIP1 koaktivátorral: A p160 koaktivátorokkal történő receptor interakció vizsgálatára glutation-S-transzferáz pull-down assay vizsgálatokat végeztek. Ennek alapja, hogy a GRIP1 koaktivátor két receptort megkötő oldallal rendelkezik, az egyik a protein amino-terminális végén elhelyezkedő LXXLL motívum, mely a receptor AF-2 transzaktivációs felszínével lép kölcsönhatásba ligand-függő módon, a másik a protein karboxil-terminális végén, mely az AF-1 transzaktivációs felszínnel lép interakcióba ligandtól független módon^{21,22,101}. Egyes mutáns szerkezetű receptorok in vitro csak GRIP1 karboxil-terminális oldalához kötődnek AF-1-en

keresztül. Megemlíthető két kivétel: az R477H mutációt tartalmazó receptor mindkét felszínnel kölcsönhatást létesít⁹⁹, míg az I559N-t tartalmazó egyikkel sem⁸⁴.

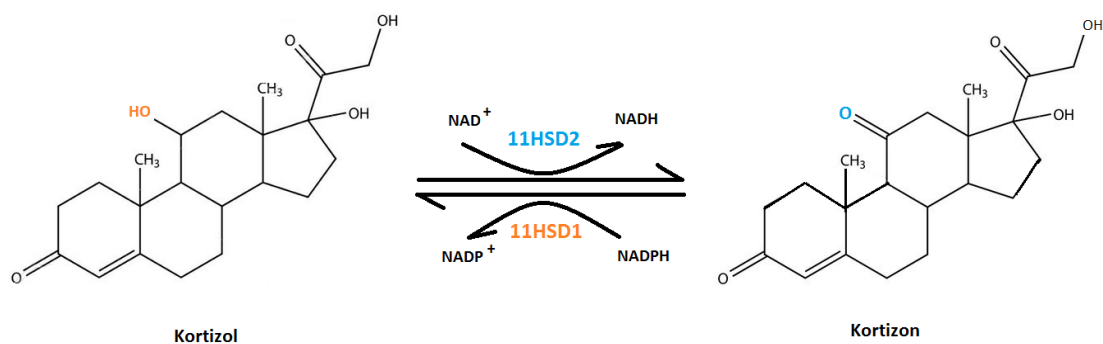
2.6. Az R714Q mutáció

Nader és munkatársai 2010-ben publikálták egy két éves lánygyermek esetét, akinek hipoglikémiával, hypokalaemiával, hipertóniával és korai kezdetű pubertással járó tünetei voltak. Endokrinológiai kivizsgálás során magas szérumszintű kortizol szinteket véleményeztek, melyet magas plazma ACTH szint és emelkedett 24 órás vizelet szabad kortizol kiválasztás (UFC – urinary free cortisol) kísért. A szérumban mérhető dehidroepiandrosteron (DHEA) és androsztendion szintek szintén emelkedettek voltak, a vizelet 17-ketoszteroid kiválasztás ugyancsak meghaladta a normális szintet. Fizikálisan enyhe klitoromegália és előrehaladott csontkor volt megfigyelhető. A klinikai tünetek alapján glukokortikoid rezisztencia volt feltételezhető (Cushingoid tünetek hiánya), amit alátámasztott, hogy dexamethason kezelés hatására a beteg panaszai és tünetei regrediáltak. A teljes glukokortikoid receptor génjének szekvenálásával egy új mutációt azonosítottak, mely a 8-as exon 2141-es nukleotid pozíciójában helyezkedik el és guanin → adenin cserével jár. A mutáció következménye egy arginin (R) → glutamin (Q) csere a receptor fehérje 714-es aminosav pozíciójában. A mutáns receptor csökkent transzkripciós aktivitással bír, domináns negatív hatást gyakorolt a vad típusú receptorra. A ligand specificitását a mutáns receptor megőrizte, de kétszeres csökkenés volt megfigyelhető a dexamethason iránti affinitásában. A nukleáris transzlokáció hasonló volt a vad típusú receptoréhoz, és a GRE kötő aktivitást is érintetlennek találták. A GRIP1 AF-2-n keresztüli megkötésének aktivitása viszont csökkent, melynek oka az lehet (számítógépes alapú strukturális analízis alapján), hogy az aminosavcsere a receptor 10. α -hélixének C-terminális részén helyezkedik el, ahol az eredeti argininnek fontos szerepe van egy nagy, pozitív töltés kialakításában, ami benyúlik a 7-10 hélixek által kialakított térbe, így hidat képez a 8-as hélix 622-es glutaminjával. A kis, töltés nélküli glutaminra történő aminosav csere következtében ez a híd megbomlik, ami konformációs változások sorozatát indítja el, és ennek az eredménye az AF-2 destabilizálódása, ami így nem tudja optimálisan megkötni az LXXLL koaktivációs motívumát a transzaktivációs doménnek⁹⁴.

3. A 11- β -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim

A glukokortikoidok szövet specifikus, lokális hatását prereceptorális szinten a 11- β -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim (11HSD) modulálja, mely a rövid láncú dehidrogenáz/reduktáz szupercsalád (SDRs, Short-Chain Dehydrogenase/Reductase superfamily) tagja. Az enzimnek két típusa ismert: a 2-es típus (11HSD2) – mely leginkább a mineralokortikoid reszponzív szövetekben, főként a vesében és belekben¹⁰², illetve a placentában expresszálódik¹⁰³ - a biológiailag aktív kortizolt - NAD dependens dehidrogenáz aktivitása révén - inaktív kortizonná alakítja, ezzel védve a mineralokortikoid (MR) receptort a túlzott glukokortikoidok általi aktiválástól. Erre azért van szükség, mert az MR affinitása az aldoszteron és a glukokortikoidok iránt egyforma erősségű¹⁰⁴. Az enzim génjében (*HSD11B2*) bekövetkező mutációk látszólagos mineralokortikoid többlet okozta, hipertóniával járó szindrómát (SAME – syndrom of apparent mineralocorticoid excess) eredményezhetnek¹⁰⁵.

A 11- β -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim 1-es típusa (11HSD1) egy NADPH dependens, bidirekcionális enzim, melynek kofaktorát, a NADPH-t a glukóz-6-foszfát dehidrogenáz (G6PD) enzim szolgáltatja¹⁰⁶. A 11HSD1 aktív oldala ennek következtében az endoplazmatikus retikulum lumenjében helyezkedik el¹⁰⁷, mivel a NADPH itt képződik és itt hozzáférhető. A NADPH - mint kofaktor – az enzim egy konzervált szekvenciájú kötőhelyéhez kapcsolódik, melynek másodlagos szerkezete az úgynevezett Rossmann-zseb¹⁰⁸. Az aktív részt egy transzmembrán szakasz köti a rövid, citoszolban elhelyezkedő doménhez. Maga az enzim homodimer formában válik aktívvá¹⁰⁹. A 11HSD1 mind dehidrogenáz, mind reduktáz aktivitással bír, az utóbbi dominanciájával, mely a biológiailag inaktív kortizon aktiválásáért, kortizollá alakításáért felelős, ezáltal fokozza a GR aktivációját.

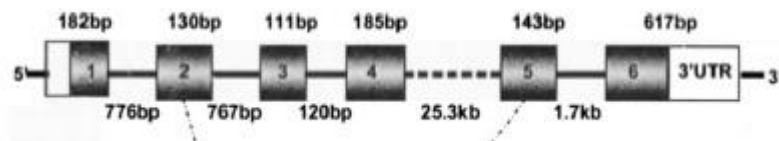


3.Ábra. A 11- β hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim 1-es és 2-es altípusainak szerepe a kortizol-kortizon átalakulásban

A 11HSD1 expressziója szinte minden szövetben kimutatható, beleértve a máj, a zsírszövet, csont, központi idegrendszer, szem, immunszövetek és a gonádok szöveteit^{110,111}. Az enzim szöveti szinten eltérő regulációjának szerepe lehet egyes betegségek patomechanizmusában, elhízás és metabolikus szindróma esetén például csökkent expresszióját mutatták ki a májszövetben, míg az expressziója emelkedett volt a zsírszövetben^{112–114}. Ennek alátámasztására transzgénikus egeret hoztak létre, melyben a 11HSD1 szelektíven a zsírszövetben overexpresszáldott, és hatására inzulin rezisztencia, hiperlipidémia, hiperfágia és elhízás alakult ki¹¹⁵. Ezzel szemben 11HSD1 knock out egerekben nem alakult ki diszlipidémia és glukóz intolerancia még magas zsírtartalmú diéta mellett sem¹¹². Az obezitáson és metabolikus szindrómán kívül az enzim szerepét policisztás ovárium szindróma (PCOS)¹¹⁶, glukokortikoid indukálta oszteoporózis¹¹⁷ és reumatoid artritisz¹¹⁸ patomechanizmusában is leírták. Mindezek alapján az enzim farmakológiai gátlása ígéretes terápiás lehetőségnek tűnik az egyes hiperkortizolizmussal összefüggő kór állapotokban. Több gátlószerrel kapcsolatban is ígéretes kísérleti eredmények születtek, például a Carbenoxolon inzulin érzékenységet növelő hatása¹¹⁹, illetve az INCB13739 éhomi vércukor, HbA1c és koleszterin csökkentő hatása¹²⁰ is bizonyítást nyert.

3.1. A 11- β -hidoxiszteroid dehidrogenáz enzimet kódoló gén (HSD11B1 gén)

A 11- β -hidoxiszteroid dehidrogenáz enzim génje (HSD11B1) az első kromoszóma hosszú karján helyezkedik el (1q32.2-41), 6 exonból és 5 intronból áll^{111,121,122}. A gént Tannin és munkatársai írták le elsőként¹²¹.



4.Ábra. Sémás ábra a HSD11B1 gén szerkezetéről, a szürke négyzetek (1-6) a kódoló exonokat jelölik, a számok pedig az exonok közötti intronok méretét¹¹¹.

3.2. *HSD11B1* gén polimorfizmusok és klinikai vonatkozásuk

A *HSD11B1* génben helyet foglaló polimorfizmusok befolyásolhatják az enzim aktivitását, ezáltal a GR-hoz hozzáférhető hormon mennyiségét, ennek végeredményeként pedig prereceptorális szinten módosulhat a szöveti glukokortikoid érzékenység. Ezt a mechanizmust korábban összefüggésbe hozták az elhízással és a metabolikus szindrómával¹²³⁻¹²⁶. Az SNP-k befolyásolhatják a glukóz- és lipidmetabolizmust¹²⁷, és szerepet játszhatnak az oszteoporózis^{117,128,129}, hipertónia patomechanizmusában, sőt terhesség indukálta hipertóniában is leírták jelentőségét¹³⁰. A glukokortikoidok mentális státuszra gyakorolt hatásának módosításával szerepet játszhatnak egyes pszichés kórképek, úgymint Alzheimer kór, kognitív hanyatlás¹³¹, illetve depresszió¹³² kialakulásában, továbbá hatást gyakorolhatnak a gyulladáso feedback mechanizmusára is¹¹⁸.

Az **rs12086634**-es polimorfizmus a 3-as intronban, 83597-es nukleotid pozícióban egy guanin→timin cseréből álló SNP. Mivel 100% kapcsoltságban áll a szintén 3-as intron régióban elhelyezkedő, 83557-es nukleotid pozícióba beékelődő 83557insA polimorfizmussal, így hatásuk nem szétválasztható. In vivo, sejtranszfekció követően ezen polimorfizmusok hatására csökkent HSD11B1 expresszió volt mérhető¹⁰⁶.

Az SNP-k szerepét oszteoporózisban is leírták, Cushing-szindrómában például a hordozók körében magasabb oszteokalcin-szint volt mérhető¹³³. Bár egyes tanulmányokban a polimorfizmusok összefüggését figyelték meg a nagyobb testtömeggel és inzulin rezisztencia kialakulásával^{124,134}, policisztás ovárium szindrómában (PCOS) mégis az SNP-k paradox védő hatását publikálták obezitással szemben, annak ellenére, hogy hordozókban magasabb plazmaandrogén-szinteket mértek¹³⁵.

2012-ben, munkacsoportunk által elsőként leírt **rs4844880** polimorfizmus¹³⁶ a *HSD11B1* gén promoter régiójában helyezkedik el, timin→adenin cseréből áll. Kezdetben a csontsűrűséget kedvezően befolyásoló hatása került leírásra, hordozókban magasabb BMD és Z-score értékeket észleltek a femur nyak és lumbális csigolyák régióiban. A későbbiekben az SNP ritkább előfordulását dokumentálták PCOS betegségben szenvedőkben, mint az egészséges kontroll csoportban, és az esetleges inzulin felszabadulást serkentő hatása is felmerült¹³⁷.

4. Addison kór

1855-ben Thomas Addison elsőként írta le a mellékvesekéreg-elégtelenség tünetegyüttesét, mely akkoriban halálhoz vezető kórkép volt. Az életmentő glukokortikoid hormonpótló terápia csak 1949-ben vált elérhetővé, amikor is Kendall, Sarett és Reichstein elsőként állított elő szintetikus úton kortizont. Bár az Addison-kórban szenvedő betegek életminősége továbbra is elmarad az egészségesekétől, várható élettartamuk mára alig tér el az átlagpopulációjától. Az új terápiás fejlesztéseknek és a betegek edukációjának köszönhetően további életminőségbeli fejlődés várható az elkövetkezendő évtizedekben.

4.1. Az Addison kór etiológiája és tünetei

A mellékvesekéreg-elégtelenségnek primer és szekunder illetve terciér vagy más néven iatrogen formáját különítjük el. Az utóbbit leggyakrabban krónikus glukokortikoid terápia okozza, ami hosszú távon a hipofízis kortikotrop sejtjeinek atrófiáját eredményezi¹³⁸. Klinikai jelentősége a glukokortikoid terápia felfüggesztésekor kerül

előtérbe, a szteroid készítmény hirtelen elhagyása súlyos klinikai tünetek megjelenéséhez, akár Addisonos krízishez vezethet, ezért a glukokortikoid terápia leépítése csak lépcsőzetesen javasolt. A szekunder kórkép kialakulásában az egyes hipofizist érintő megbetegedések játszanak szerepet, melyek az ACTH hiány következtében vezetnek közvetten mellékvesekéreg-elégtelenséghez. Erre példa a hypophysectomia, hipofízis tumor, irradiáció, autoimmun limfocitás hypophysitis, izolált ACTH hiány, illetve a Sheehan-szindróma. A primer mellékvesekéreg-elégtelenség, vagy más néven Addison kór prevalenciája 93-140/1.000.000 lakos^{139,140}. A korábbi évtizedekben az elsődleges patogenetikai faktor a tuberkulózis volt¹⁴¹, mára ennek visszaszorulásával az autoimmun adrenalitisz került előtérbe¹⁴². További kórokok lehetnek: primer vagy metasztatikus tumoros megbetegedések, bilaterális adrenalectomia, irradiáció, hemorhágia például meningococcus szepszis esetén vagy trauma hatására, különösen veleszületett vérzékenység vagy orális antikoaguláció esetében, primer mellékvesekéreg limfóma, nem tuberkulotikus infekciók vagy disszeminált gombainfekció, szifilisz. Az autoimmun betegség leggyakrabban a negyvenes éveiben járó korosztályt érinti, illetve nőkben gyakoribb, mint férfiakban. A betegség előfordulhat önmagában, vagy autoimmun poliglandurális szindróma (APS) részeként is. Ez utóbbinak két alcsoportját különböztetjük meg: az APS1, vagy más néven autoimmun poliendokrinopátia-kandidiázis-ektodermális disztrófia (APECED, autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy,) esetében az autoimmun adrenalitiszhez hipoparatiroidizmus és krónikus mukokután kandidiázis társul, ritkán egyéb betegség is előfordulhat, úgymint krónikus hepatitisz, alopecia, anémia pernicioza. A betegséget az autoimmun regulátor (AIRE) génben (kromoszomális lokalizáció: 22q22.3) megjelenő mutációk okozzák. APS2 esetében az Addison-kórhoz autoimmun pajzsmirigy betegségek, gonadális diszfunkció, 1-es típusú diabétesz mellitusz és ritkábban egyéb autoimmun eltérések, például vitiligo, Sjögren-szindróma, miasthenia gravis, antifoszfolipid szindróma, reumatoid arthritisz és cöliákia társulhat¹⁴³.

A hipadrénia vezető tünetei a fokozatosan kialakuló gyengeség, fáradtság, hipotenzió és kollapszus hajlam, hányinger, hosszabb ideig fennálló, kezeletlen betegség esetén testsúly-vesztés, akár anorexia, illetve hiperpigmentáció a nyomásnak kitett testfelületeken, tenyérredőkben, újonnan szerzett sérülések gyógyult hegeiben, szájüregben a gingiva és a bucca területén. Sajnos előfordul, hogy Addisonos krízis

tünetei, úgymint hipotenzió vagy akár hipovolémiás sokk, akut hasi fájdalom, láz, gyermekeknél hipoglikémia hívják fel elsőként a betegségre a figyelmet. A tünet együttes akár – tévesen – akut hasi katasztrófára is utalhat.



5.Ábra. Hiperpigmentáció Addison kórban¹⁴³

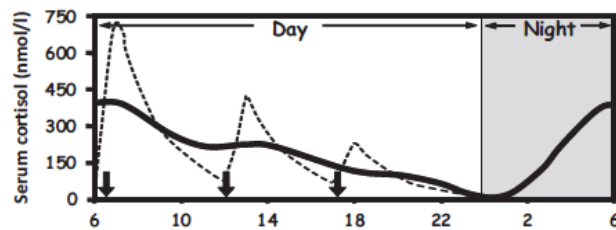
4.2. Az Addison kór diagnózisa

A diagnózis alapja a klinikai tüneteken túl a jellegzetes laboratóriumi eltérések, hyponatraemia, hyperkalaemia és metabolikus acidosis, melynek oka az elégtelen aldoszteron termelés, és következménye a hipovolémia illetve exsiccosis. A betegek többsége esetében anémia is előfordul. A hyperkalaemia EKG eltéréseket (kiszélesedett QRS, csúcsos T), esetleg aritmiát okozhat. Hormonvizsgálatok során alacsony bazális kortizol szint észlelhető (reggel $<5 \mu\text{g/dl}$, normál tartomány: $8\text{-}25 \mu\text{g/dl}$), melyhez magas plazma ACTH szint társul (normál tartomány: $7.2\text{-}63.3 \text{ pg/ml}$). A diagnózis felállítását tovább segíti az ACTH-stimulációs, vagy más néven Synacten-teszt végzése, melynek során $250 \mu\text{g}$ ACTH₁₋₂₄ intravénás adását követően 0, 30 és 60 perccel mérik a plazma kortizol szinteket. Normális válasz esetén a kortizolszint $20 \mu\text{g/dl}$ fölé emelkedik. Addison-kórban a glukokortikoid képzés mellett a mineralokortikoid szintézis is elégtelen. A plazmában alacsony aldoszteron szintet mérhetünk (normál tartomány: $3.5\text{-}30 \text{ ng/dl}$) és emelkedett renin aktivitást regisztrálhatunk (normál tartomány: $0.2\text{-}2.8$

ng/ml/h). Kiegészítő képalkotó eljárások a betegség etiológiájának tisztázásában játszanak szerepet. A mellékvese CT vizsgálat során atrófiára (pl. autoimmun eredet esetén), meszesedésre (pl. tuberkulózisban), bilaterális bevézésre vagy daganatátétekre derülhet fény. Sella MRI vizsgálat során az egyes hipofízist érintő elváltozások ábrázolódhatnak, kezeletlen Addison kór esetén a hipofízis gyakran megnagyobbodik a kortikotrop sejtek hiperpláziája miatt.

4.3. Az Addison kór kezelése

Mind a betegség, mind az élethosszig tartó glukokortikoid hormonpótló kezelés negatív hatással bír a betegek életminőségére¹³⁸. Az Addison kór kezelésének alapja a mineralokortikoid és glukokortikoid hormonok pótlása. A glukokortikoid terápiát illetően a mai napig nincs olyan szakmai irányelv, ami az előírt kezdő hormon dózis, a terápia módosításának mikéntjét tárgyalja. Szintén nem ismert olyan marker, ami a terápia hatékonyságát megfelelően monitorozhatná.. Egészségesekben a szérumban a kortizol szint diurnális ritmust mutat, melyet szinte lehetetlen mesterségesen reprodukálni.



6.Ábra. A szérumban a kortizol szint cirkadián ritmusa egészségesekben (telt vonal) és szérumban a kortizol koncentráció hormonpótló terápia során (szaggatott vonal)²

A szérumban a kortizol szint – mivel a gyakran használt immunanalitikai kortizol mérések bemérik az exogen bevitt hydrocortisont – nagyban függ a hormonpótlás és a mérés között eltelt időtől, így fals eredményt adhat, ha a beteg nem a megfelelő időben vette be a készítményt. A 24 órás vizelet kortizol szint fordítottan arányos a szérumban

kortizol kötő fehérje (Corticosteroid Binding Globulin – CBG) szintjével, ez utóbbinak a változása hamisan alul- vagy túldozírozásra utalhat. A nyál kortizol nem jól korrelál a szérumban lévő kortizol szinttel. Az ACTH szint szintén függ a hormonpótló szer bevitelétől eltelt időtől, illetve korábbi tapasztalatok azt mutatják, hogy a szérumban lévő ACTH szint normál tartományba való beállítása szuprafiziológiás szérumban lévő kortizol szintet eredményez, ezért monitorozásra nem használják. A rutin gyakorlatban a terápiát szubjektív tünetek alapján szokták módosítani, ez kiegészíthető szérumban lévő kortizol méréssel, 4 órával a reggeli gyógyszerbevitel után². A terápiás ajánlásokat illetően megoszlanak a vélemények, melyek általában a betegek szubjektív jólétén, Health Related Quality of Life kérdőíves felméréseken^{4,144–147}, illetve a felüldozírozás mellékhatásainak monitorozásán alapulnak¹⁴⁸. A felmérések eredményei szerint egyes szerzők a napi háromszori^{2,149}, mások a napi kétszeri gyógyszeradagolást preferálják^{144,147}. Egészséges egyéneknél a 24 órás kortizol ráta átlagosan 5.7-7.4 mg/m²/nap^{150,151}, per os bevitt szerekből ez 10-12mg/m²/napnak felel meg, vagyis 15-25 mg összdózisnak. Egyszeri dózisként minimum 2.5 mg ajánlott. Érdekes a reggeli gyógyszeradagnak a napi igény nagyobb hányadát adni, mivel így a teljes napi igény csökken. Ez átlagosan 0.12 mg/ttkg¹⁴⁹, bár ennél sokkal magasabb értékeket is publikáltak (0.33 mg/ttkg/nap)². Mivel reggel a betegek szérumban lévő kortizol szintje a fiziológiás állapottól eltérően gyakorlatilag nulla, érdemes ébredés után egyből bevenni az első gyógyszeradagot. Az éhomi vagy posztprandiális állapot befolyásolja a gyógyszer felszívódását. Étkezéskor történő hormonpótlás esetén a szérumban lévő kortizol szintnövekedés jelentősen lassabb, így a betegeknek ajánlott 15-60 percet várni a reggeli gyógyszerbevitel és az étkezés között¹⁴⁹. Reggelente rendszeresen fáradtság esetén, hajnali 3-kor extra 5 mg-t hydrocortisone bevétele javasolható, de ennek hatékonysága nem bizonyított². Várható fizikai vagy szellemi megterhelés, stressz előtt egyesek ajánlják plusz 5-10 mg hormon bevitelét¹⁵², de ez hosszú távon, napi szinten nem ajánlott, mert a túlzott hormonbevitel nem kívánt mellékhatásokat eredményezhet (abdominális elhízás, magasabb szérumban lévő lipid szintek, károsodott glukóz tolerancia, hipertónia, oszteoporózis, Cushingoid tünetek). Terhesség utolsó trimeszterében a hydrocortisone hormonpótló dózis igény növekszik, a korábbi összdózis 50%-kal emelendő. Váltott munkában dolgozó betegek esetében a felkeléshez kell adaptálnia a terápiát¹⁵². A terápia beállítása során figyelembe kell venni a betegek által szedett egyéb gyógyszereket is, mivel számos gyógyszerinterakció módosíthatja a glukokortikoidok hatásosságát. A

rifampicin például növeli a kortizol clearance-t, így alkalmazása esetén a napi hydrocortisone adag duplázandó. Szintén a napi hydrocortisone adag növelése szükséges ketokonazol, barbiturátok, etomidat, sunitinib, fenitoin és karbamazepin terápia esetén, mivel ezek gátolják a kortizol képzését és növelik a kortizol metabolizmusát. A kortizol metabolizmusban szerepet játszó CYP3A4 enzimet gátolja a ritonavir, fluoxetin, diltiazem és a cimetidin, így ezek a gyógyszerek alkalmazása hydrocortisone pótlásban részesülő betegeknél növeli a szérumban a kortizol szintet. A mitotán indukálja a CYP3A4 enzimet és növeli a CBG szintet, ezért mitotán kezelésben részesülő betegeknél a napi hydrocortisone adag kétszeresét vagy háromszorosát kell alkalmazni¹⁵², amennyiben a beteg hydrocortisone hormonszubsztitúcióra szorul. A betegek részletes krízis prevenciók oktatásban vesznek részt, melynek fontos része az infekciók korai felismerése, ennek megfelelően a hormonpótló dózis kétszerezése vagy háromszorozása¹⁵². Napjainkban több új készítmény áll fejlesztés alatt, melyek szérumban a kortizol szintje sokkal inkább megközelíti a fiziológiásan mérhető szérumban a kortizol szintet. Ideálisabb szérumban a glukokortikoid szintet biztosítanak a módosított ill. kettős felszabadulású, elhúzódó hatású hydrocortisone komponenset tartalmazó készítmények¹⁵³⁻¹⁵⁸, ill. az inzulin pumpa mintájára kifejlesztett folyamatos subcutan kortizol infúziós pumpa^{159,160}. A legújabb terápiás törekvések a betegség lefolyásának módosítását célozzák, úm. a B-lymphocyták depléciós terápia rituximab segítségével¹⁶¹, illetve a még meglévő mellékvesekéreg sejtek indukciója Synacten terápiával¹⁶².

A glukokortikoidok mellett elengedhetetlen a mineralokortikoid-pótlás is. A klinikai gyakorlatban a fludrokortizon alkalmazása terjedt el, napi 0.05-0.2 mg dózisban 2 részre osztva. Fontos a terápia monitorozása, a betegek szubjektív közérzetén kívül ebben segítségünkre lehet a vérnyomás, a szérumban a ionszintek és a plazma renin aktivitás (PRA) rendszeres ellenőrzése. Elégtelen terápia esetén fáradékonyság, gyengeség, hipotónia, hyponatraemia, hyperkalaemia és magas plazma renin aktivitás észlelhető, míg a túlzott mineralokortikoid bevitel hipertóniát és ezzel kapcsolatos panaszokat (pl. fejfájás), hypernatraemiát, hypokalaemiát és szupprimált plazma renin aktivitást eredményezhet.

II. Célkitűzések

Munkám során a glukokortikoid receptor és a prereceptorálisan a glukokortikoid hormonhatást befolyásoló 11- β -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim genetikai variációinak hatását vizsgáltam a hormonpótló terápiára, illetve a terápia asszociált mellékhatások megjelenésére a Semmelweis Egyetem II. számú Belgyógyászati Klinikáján gondozott Addison kóros betegek csoportjában. Célul tűztem ki:

1. Az irodalmi adatok alapján leggyakrabban vizsgált glukokortikoid receptor polimorfizmusok (BclI, N363S és A3669G), illetve a HSD11B1 gén két polimorfizmusának (rs12086634 és a munkacsoportunk által elsőként leírt rs4844880) allélgyakoriság-vizsgálatát, illetve ennek összehasonlítását a nemzetközi irodalomban közöltekkel
2. A vizsgált polimorfizmusok hordozói státuszának és a klinikai paraméterek összefüggéseinek leírását, az SNP-k a hormonpótló terápia kapcsán felmerülő mellékhatások megjelenésének tanulmányozása céljából
3. Az SNP-k hordozása illetve a betegség időbeli megjelenése közötti összefüggés vizsgálatát az esetleges hajlamosító tényezők felderítése érdekében
4. A polimorfizmusok hormonpótló dóziszigényt befolyásoló szerepének felderítését, az egyénre szabott terápia kialakításakor egy további szempont felállítása érdekében
5. A *HSD11B1* polimorfizmusok hordozásának csontanyagcserét befolyásoló hatásának leírását
6. A *HSD11B1* polimorfizmusok metabolikus paramétereket befolyásoló hatásának szeparált vizsgálatát dexamethasont szedő és nem szedő Addison kóros betegekben, tekintettel arra, hogy a 11- β -HSD enzim 2-es típusa a hydrocortisone aktív bontásával szemben a dexamethasont nem oxidálja
7. Az rs4844880 polimorfizmus csontanyagcserére gyakorolt hatásának vizsgálatát szeparáltan 50 év feletti és alatti, női betegcsoportban annak felderítése érdekében, hogy a menopauza okozta hormonális változások megváltoztatják-e az SNP klinikai paramétereket módosító hatását

8. A *GR* gén vizsgálatát egy a Semmelweis Egyetem II.számú Belgyógyászati Klinikáján diagnosztizált és kezelt, 31 éves, Chrousos szindrómás nőbetegben, a mutációhoz társuló genotípus-fenotípus összefüggések összegezése érdekében.

III. Módszerek

1. *Vizsgált beteg- és kontroll csoport*

Munkám során a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikáján diagnosztizált és kezelt Addison kóros (n=68) betegeket vizsgáltam. A kutatás elvégzését a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága engedélyezte. A kutatás összes résztvevője (mind a betegek, mind az egészséges kontrollcsoport) tájékoztatást követően beleegyező nyilatkozatot írt alá. A vizsgált betegcsoportban a primer mellékvesekéreg-elégtelenség oka autoimmun adrenalitisz, az egyéb okból glukokortikoid hormonpótlásra szoruló betegek (kongenitális adrenális hiperplázia, mellékvesekéreg tuberkulózis, szarkoidózis, amiloidózis, hemokromatózis, malignus vagy hematológiai megbetegedések, mellékvese hemorrhágia) adatai nem kerültek feldolgozásra, illetve izolált ACTH hiány, vagy más, hipofízist érintő kórkép sem merült fel a laboratóriumi adatok alapján. A diagnózis klinikai tüneteken (fáradtság, hiperpigmentáció, gyengeség, hipotenzió, súlyvesztés és gasztrointesztinális panaszok), elektrolit eltéréseken (hyponatraemia, hyperkalaemia) alapul, melyet további laboratóriumi vizsgálatok erősítettek meg: alacsony szérumszintű kortizol, mely Synactennel végzett stimuláció hatására sem mutat kellő emelkedést. A diagnóziskor mért plazma ACTH szintről 56 beteg esetében voltak elérhetőek az adatok (12 beteg diagnózisa évtizedekkel ezelőtt született meg, ebből az időszakból nem állnak rendelkezésre laboratóriumi adatok), ezeknek mindegyike meghaladta a referencia tartomány felső határát (1381 ± 1523 pg/ml), alátámasztva a primér mellékvesekéreg-elégtelenség diagnózist. A diagnóziskor mért 21-hidroxiáz ellenes antitest szint eredményei csak 5 esetben álltak rendelkezésre, ezek erős pozitívítást mutattak. A betegeket a terápia szempontjából három csoportra bontottam: hydrocortisont monoterápiában (n=34), hydrocortisont és prednizolont (n=4), illetve hydrocortisont és dexamethason (n=30) szedő csoportokra. Mivel a dexamethason napjainkban már nem része a korszerű terápia kialakításának, így főként azoknál a betegeknél jellemző, akiknek a diagnózisa még évtizedekkel ezelőtt született meg (a legrégebbi 1968-ban), és az akkori terápia részeként szedett esti, hosszú hatású dexamethason elhagyásakor reggelente fáradtság, gyengeség, fejfájás, hányinger jelentkezett esetükben, ezért a dexamethason terápia fenntartását igényelték.

2. Táblázat. A vizsgált Addison kóros betegek illetve egészséges kontroll csoportok klinikai jellemzői

Klinikai jellemzők	Addison kóros betegek (n=68)	Egészséges kontroll csoport I. (n=160)	Egészséges kontroll csoport II. (n=250)
Életkor (év), átlag ±SD	53±17	52.7±14.7	47.3 ± 15.3
Nem			
Nő	47	111	250
Férfi	21	49	0
BMI (kg/m ²), átlag ±SD	27.7±5.7	26.1±4.4	NA
Össz. hydrocortisone ekvivalens szubsztitúciós dózis (mg/nap), átlag ±SD	29.98±7.6	NA	NA
Testtömegre korrigált szubsztitúciós dózis (mg/kg/nap), átlag ±SD	0.34±0.13	NA	NA
Dexamethasont szedők	30/68	NA	NA
Vérnyomás-csökkentő terápia	23/68	NA	NA
Antidiabetikus terápia és/vagy magas éhomi vércukorszint	15/68	NA	NA
Koleszterin-csökkentő terápia és/vagy magas se. koleszterin szint	6/68	NA	NA
RBC (T/l), átlag±SD	4.7±0.57	NA	NA
Hb (g/l), átlag±SD	139.8±14.78	NA	NA
Ht, átlag±SD	0.41±0.04	NA	NA
Éhomi vércukorszint (mmol/l), átlag±SD	4.99±1.75	NA	NA
Se. koleszterin (mmol/l), átlag±SD	5.3±1.25	NA	NA
Tg (mmol/l), átlag±SD	1.8±1.15	NA	NA
LDL (mmol/l), átlag±SD	3.1±1.06	NA	NA
HDL (mmol/l), átlag±SD	1.38±0.46	NA	NA

NA – nem alkalmazható, BMI – body mass index/testtömeg index, RBC – red blood cell mass/ vörösvértest szám, Hb – hemoglobin, Ht – hematocrit, Tg – triglicerid, LDL – low density lipoproteine koleszterin, HDL – high density lipoproteine koleszterin

Azok a betegek, akik egyéb okokból (pl. reumatoid arthritisz) további szteroid terápiaiban részesülnek, vagy a hydrocortisone metabolizmusát befolyásoló gyógyszereket szednek (ld. 5.4.2. fejezet, gyógyszerinterakciókról szóló rész) nem kerültek be a vizsgálati csoportba.

A glukokortikoid receptor gén polimorfizmusok vizsgálatához egy 160 fős, a *HSD11B1* SNP-k vizsgálatához egy 250 fős, egészséges, hazai populációból származó kontrollcsoportot használtam. Endokrin megbetegedés nem szerepelt csoportok résztvevőinek anamnézisében. A beteg- és kontrollcsoportok adatait az **2. Táblázat** tartalmazza.

2. *Klinikai és laboratóriumi paraméterek*

A betegek esetében regisztrálásra kerültek a metabolikus státusz megítélése céljából szükséges antropometriai paraméterek, úgymint életkor, magasság (cm), testtömeg (kg), illetve az utóbbi kettőből számított testtömeg index (body mass index, BMI).

$$BMI = \frac{\text{testtömeg (kg)}}{\text{testmagasság (m)}^2}$$

Továbbá rögzítettem a betegek életkorát a betegség kezdetekor, a testtömeg változását a terápia során (kg/év), a glukokortikoid hormonpótló dózist hydrocortisone ekvivalens értékben megadva (mg/nap), illetve ez utóbbit a testtömegre korrigálva (mg/ttkg/nap). A hydrocortisone ekvivalens értékek számításakor az alábbi táblázatot vettem figyelembe:

Készítmény neve	Hatóanyag	Kiszerezés (mg)	Hydrocortisone ekvivalens dózis (mg)
Prednisolon	prednisolone	5	4
Dexamethason	dexamethasone	0.5	25
Oradexon	dexamethasone	0.5	25
Medrol	methylprednisolone	2-4-8-16-32	5
Polcortolon	triamcinolon	4	5
Bethamethasone	bethamethasone	0.5	25

Feljegyeztem a betegek által szedett egyéb, a metabolikus státuszt befolyásoló gyógyszereket (antihipertenzív, koleszterincsökkentő, antidiabetikus terápia), illetve hormon készítményeket (pajzsmirigy-, növekedési-, illetve nemi hormon szupplementáció). Azoknak a betegeknek, akik pajzsmirigy hormonpótló terápiaiban részesültek, a TSH értékük a referencia tartományban volt.

A laboratóriumi és hormon vizsgálatokhoz éjszakai éhezést követően a betegeknél reggel 8 és 9 óra között történt vérvétel perifériás vérből. A mérések a Semmelweis Egyetem Központi Laboratóriumában történtek. A következő adatok kerültek összegyűjtésre: vérkép (Advia 2120, Siemens, Németország), máj-és vesefunkciós

paraméterek, szérum glükóz, koleszterin, triglicerid, LDL-koleszterin és HDL-koleszterin szintek (AU 5800, Beckman Coulter, USA), plazma-, nyál- és vizeletkortizol, plazma ACTH, szérum ösztadiol, progeszteron, nemi hormont kötő fehérje (sex hormone binding globulin, SHBG), tesztoszteron, luteotrop hormon (LH), follikulus-stimuláló hormon (FSH), tiroidea stimuláló hormon (TSH), szabad tiroxin (free thyroxin, fT4), prolaktin és növekedési hormon (growth hormone, GH) koncentrációk (elektrochemiluminescens immunoassay, Cobas E411, ROCHE, Indianapolis; Architect System, Lisnamuck, Longford, Ireland; IDS-iSYS, Immunodiagnostic Systems Ltd, Boldon, England), szérum dehidroepiandrosteron szulfát (DHEAS) és androsztendion koncentrációk (radioimmunoassay, Beckman Coulter Brea, California, USA).

3. Csontsűrűség mérés

A csont ásványi anyag sűrűségének mérése DEXA módszerrel történt (QDR 4500C, Hologic Inc., Waltham, MA, USA; Software version 9.03) femur nyak és a lumbális csigolyák (L1-4) régiójában. Meghatározásra került a csontok felületi sűrűsége (bone mineral density, BMD, g/cm^2), amit összehasonlítva az azonos nemű, fiatal populáció csúcs-csontsűrűségével, és az ettől való eltérés alapján került meghatározásra a régiókhöz szórásegységben számított T-score értékeket. Szintén számításra került az életkor- és nem-specifikus átlagtól való, szórásegységben kifejezett eltérés (Z-score). A mérésekhez a gyártó által megadott referencia értékek kerültek felhasználásra. A kapott adatokat összehasonlítva a betegek azonos gépen mért korábbi eredményeivel kiszámítottam az éves BMD, T- és Z-score változást.

4. Molekuláris biológiai módszerek

4.1. DNS izolálás

A DNS izolálást perifériás vérmintákból végeztem a kereskedelemben forgalmazott kit-ek segítségével (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, ROCHE Gmb Basel, Svájc; Qiamp DNA Blood Kit, Qiagen, USA). A DNS mintákat a felhasználásig -80°C -on tároltam.

4.2. Allél specifikus PCR reakció

A BclI. és N363S polimorfizmusok vizsgálatához allél specifikus PCR reakciót alkalmaztam. Az amplifikációhoz a BclI. polimorfizmus esetében az alábbi primereket használtam:

forward (F): 5'-GAGAAATTCACCCCTACCAAC-3'

reverz (R): 5'-AGAGCCCTATTCAAAC-3'

vad forward (VF): 5'-CAATTCCTCTCTTAAAGAGATT-3'

mutáns reverz (MR): 5'-GACAAGTTATGTCTGCTGATG-3'

(Invitrogene Life Technologies, Glasgow, UK)

A reakciót ThermoCycler (ProFlex PCR System, ThermoFisher Scientific, USA) segítségével végeztem, 25 μ l-es végtérfogatú PCR elegyen, mely tartalmazott 0.3 μ mol/l-t minden felsorolt oligonukleotid primerből, 10mmol/l Tris-HCl-t, 2.5 mmol/l MgCl₂-t, 50 mmol/l KCl-t, 0.2 mmol/l deoxinukleotid trifoszfátot, 0.5U Taq polimerázt (2 \times ImmoMix, Bioline, UK) és 5% glicerolt. A program egy 7 perces denaturációval kezdődik 95°C-on, majd ezt egy 3 lépcsőből álló, 38 ciklusos fázis követi: 95°C, 56°C és 72°C 45-45 másodpercig, és végül egy 10 perces, 72°C-on történő extenzió zárja le.

Az N363S polimorfizmus vizsgálatokor a következő primereket alkalmaztam:

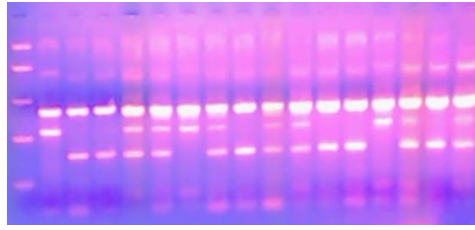
2/4 F: 5'-CCAGTAATGTAACACTGCCCC-3'

2/4 R: 5'-TTCGACCAGGGAAGTTCAGA-3'

363-MR: 5'-ATCCCTGGCACCTATTCCAAC-3'

(Invitrogene Life Technologies, Glasgow, UK)

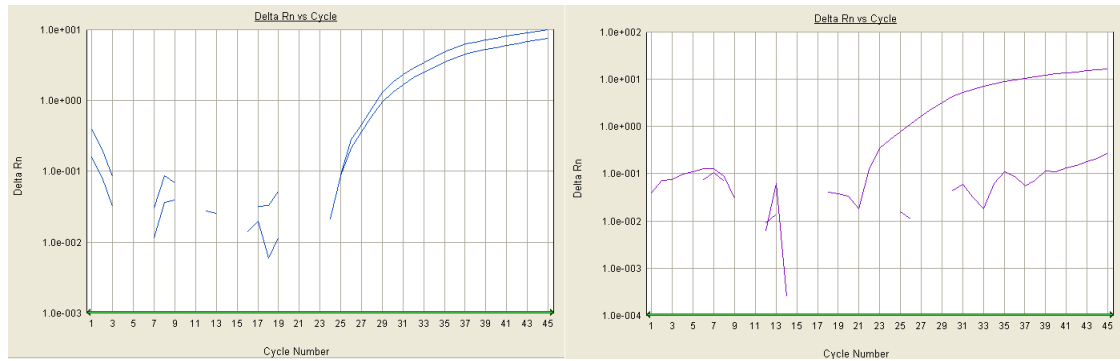
A reakciót a BclI. polimorfizmusnál leírt berendezés segítségével végeztem a munkacsoportunk által korábban kidolgozott protokoll szerint, 50 μ l-es végtérfogatú, a BclI. polimorfizmusnál részletezett összetételű PCR elegyen. A program egy 5 perces denaturációval kezdődik 95°C-on, majd ezt egy 3 lépcsőből álló, 34 ciklusos fázis követi: 95°C, 61°C és 72°C 1-1 percig, és végül egy 10 perces, 72°C-on történő extenzió zárja le. Az amplifikált DNS szakaszokat a BclI. polimorfizmus esetében 2%-os, az N363S polimorfizmus esetében 3%-os agaróz gélen, gélelektroforézis segítségével választottam szét, és ethidium-bromid segítségével, ultraibolya transzilluminátor alatt vizualizáltam.



7. Ábra. A BclI. polimorfizmus vizsgálata, allél specifikus PCR reakciót követően az eredmények gélelektroforetikus értékelése: a marker mellett (1. oszlop) pozitív kontrollként egy homozigóta mutáns (GG) minta, mellette negatív kontrollként egy homozigóta vad (AA) genotípusú minta látható. Mellette balról jobbra két heterozigóta minta (AG) látható, melyek esetében a vad és mutáns allélokat jelölő mindkét sáv megtalálható. Ezt követően a felvitt minták genotípusa: GG-AG-AA-AG-AG-AA-AA-GG-AG-AA-AG

4.3. Valós idejű (real time) PCR reakció

A glukokortikoid receptor gén 9-es exonján található A3669G és a *HSD11B1* génjében fellelhető rs12086634 és rs4844880 polimorfizmusok vizsgálatához valós idejű PCR reakciót használtam, gyártó javaslatának megfelelően, 7500 Fast Real-Time PCR System gépen (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, California, USA), Taqman SNP Assay segítségével (Applied Biosystems). Az eljárás lényege, hogy az SNP-k helyének megfelelően a vad és mutáns nukleotid szekvenciához két különböző, fluorofór festékekkel (jelen esetben FAM és VIC) jelölt próba köthet be, melyeket a gyártó által elkészített reakcióelegy tartalmaz. Az SNP hordozása, illetve nem hordozása (vad típus) esetén a reakció során a két próba egyike köt be, a fluorofór festék felszabadul a gátlás alól és fluoreszcens jelintenzitást bocsát ki, mely a PCR termék mennyiségével arányos és mérhető, az idő függvényében megjeleníthető, grafikonon ábrázolható. Homozigóta vad típus esetén csak az egyik (jelen esetben FAM) festék intenzitása mérhető, homozigóta mutáns genotípus esetén a másik festék (VIC) ad jelintenzitást, heterozigóta hordozói státusz esetén pedig mindkét festék jelintenzitása detektálható.



8.Ábra. Az A3669G polimorfizmus vizsgálata real timePCR segítségével. Az első ábrán egy heterozigóta hordozó minta látható, a vizsgálat során a FAM-mal és VIC-kel jelölt vad és mutáns allélek egyaránt és egy időben adtak jelintenzitást. A jobb oldali ábrán egy homozigóta vad genotípusú minta mérése eredménye látható, csak a FAM-mal jelölt vad típusú allél adott érdemi jelintenzitást.

A genotipizáláshoz az alábbi próbákat használtam:

rs12086634: FAM-al jelölt próba: 5'-GATTTCTTAATATAGCCATCTCTTG-3'

VIC-el jelölt próba: 5'-GAATGGGAAAGGTATCAACCCAG-3'

rs4844880: FAM-al jelölt próba: 5'-TAGTACCTGACCAACAGTAAATACC-3'

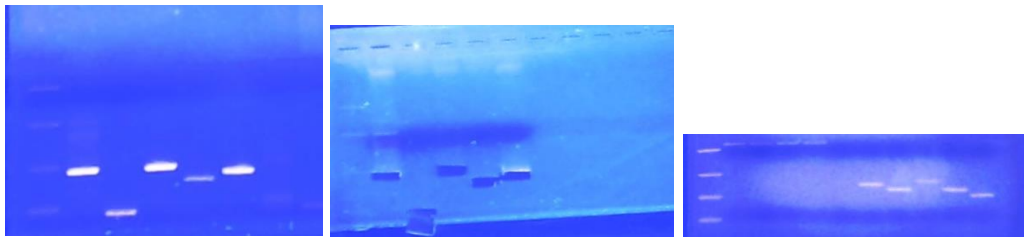
VIC-el jelölt próba: 5'-GAGCATTTCAATGGTGTTTTTATTC-3'

A program paraméterei a következők voltak: 2 perc 50°C-on, majd egy 10 perces denaturáció 95°C-n, ezt egy 2 lépcsőből álló, 40 ciklusos fázis követi: 95°C 15 másodpercig és 60°C 1 percig.

4.4. Direkt DNS szekvenálás

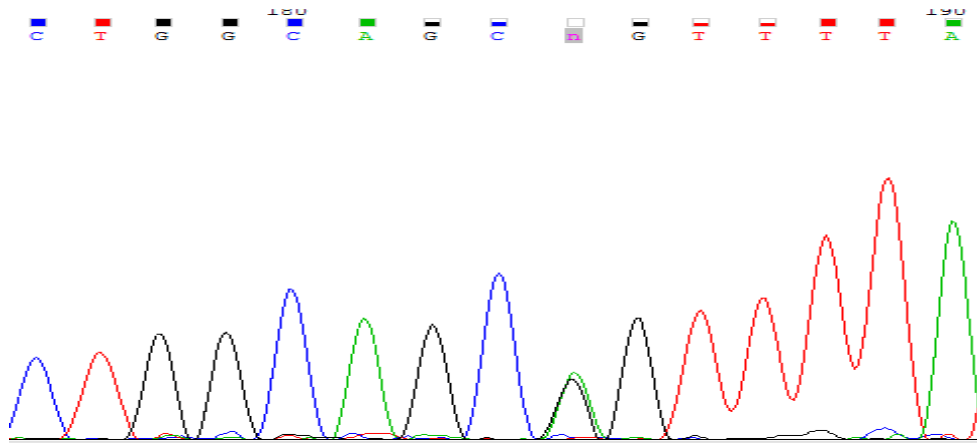
A glukokortikoid receptor kódoló régiójának nukleotid szekvenciáját az esetleges mutációk felderítés céljából direkt DNS szekvenálással határoztam meg. Első lépésben PCR-t végeztem, melyhez a Koper és munkatársai által leírt eredeti forward és reverz oligonukleotid primereket használtam²⁸. A reakciót ThermoCycler (ProFlex PCR System, ThermoFisher Scientific, USA) segítségével végeztem, 50µl-es végtérfogatú PCR elegyen, mely tartalmazott 0.3µmol/l-t minden felsorolt oligonukleotid primerből

(Invitrogene Life Technologies, Glasgow, UK), 10mmol/l Tris-HCl-t, 2.5 mmol/l MgCl₂-t, 50 mmol/l KCl-t, 0.2 mmol/l deoxinukleotid trifoszfátot, 0.5U Taq polimerázt (2×ImmoMix, Bioline, UK) és 5% glicerolt, ennek segítségével 100 ng mennyiségű DNS mintát amplifikáltam. A program egy 10 perces denaturációval kezdődik 95°C-on, majd ezt egy 3 lépcsőből álló, 35 ciklusos fázis követi: 95°C, 60°C és 72°C 45-45 másodpercig, és végül egy 10 perces, 72°C-on történő extenzió zárja le. Az így kapott PCR termékeket 1%-os agaróz gélelektroforézis segítségével vizualizáltam, majd a terméket kivágtam és tisztítottam (DNA extraction kit, Viogene, New Taipei City, Taiwan).



9.Ábra. A GR gén direkt szekvenálása során a PCR reakciót követően az eredmények gélelektroforetikus értékelése (bal oldali kép, 5-9 exonok), termék kivágása (középső kép), majd tisztítást követően a termékek ismételt gélelektroforetikus ellenőrzése (jobb oldali kép)

Az így nyert terméket BigDye Terminator Cycle-Sequencing Kit segítségével (Applied Biosystems, Foster City, CA), 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) készüléken szekvenáltam, ezt követően gél-filtráció segítségével tisztítottam (NucleoSEQ, Macherey-Nagel, Düren, Germany).



10.Ábra. Direkt DNS szekvenálás sorány nyert kromatogram képe

5. Statisztikai módszerek

Az allélfrekvenciák eloszlásának vizsgálatokor Chi-négyzet és Fischer tesztet alkalmaztam. A *GR* és *HSD11B1* polimorfizmusok és a folyamatos változók átlagainak összefüggéseinek vizsgálatokor egy utas ANOVA-t használtam SPSS statisztikai program segítségével (IBM SPSS Statistics version 19.0, IBM Corp., Armonk, New York, USA). A statisztikai próbák erejének ellenőrzése céljából power analízist alkalmaztam egy online elérhető algoritmus segítségével (https://www.dssresearch.com/Knowledge_Center/toolkitcalculators/statisticalpowercalculators.aspx). $P < 0.05$ és $\text{power} > 80\%$ értékeket tekintettem szignifikánsnak.

6. Három dimenziós protein modellezés

A *GR* génben beazonosított variánsnak a fehérjeszerkezetre gyakorolt hatásának vizsgálatára molekula modellezést és analízist az UCSF Chimera package segítségével végeztünk. A *GR* ligandkötő domén koordinátáit a 4UDC PDB struktúrából nyertük. Az eredmények részletes bemutatását az Eredmények megfelelő fejezetében részletezem.

IV. Eredmények

A genotípus eloszlás minden vizsgált polimorfizmus esetében megfelelt a Hardy-Weinberg egyensúlynak. A vérnyomás értékekkel, szérum koleszterin- és triglicerid szintekkel, plazma glukóz koncentrációkkal nem mutattak összefüggést a vizsgált *GR* és *HSD11B1* SNP-k. Szintén nem volt összefüggés a hordozói státusz és az alkalmazott antihipertenzív, antidiabetikus és lipidcsökkentő terápia gyakorisága között. Az egy utas ANOVA teszt során (polimorfizmusok és a folyamatos változók átlagai közötti összefüggés vizsgálata) kapott p értékeket az **3. Táblázat** tartalmazza. Power analízist követően a számos szignifikáns eredmény közül csak néhány bizonyult megfelelő erősségűnek.

3. Táblázat. A GR és HSD11B1 polimorfizmusok illetve az antropometriai, laboratóriumi paraméterek és a hormonpótló dózis közötti összefüggés vizsgálata során nyert p értékek egy utas ANOVA segítségével, Addison kóros betegekben

Paraméter	HSD11B1 SNP-k						GR SNP-k								
	rs12086634			rs4844880			BclI.			N363S			A3669G		
	átlag±szórás		p	átlag±szórás		p	átlag±szórás		p	átlag±szórás		p	átlag±szórás		p
	Hordozó	Nem hordozó		Hordozó	Nem hordozó		Hordozó	Nem hordozó		Hordozó	Nem hordozó		Hordozó	Nem hordozó	
BMI (kg/m ²)	25.79 ±5.3	26.84 ±5.2	0.49	29.98 ±3.7	25.11 ±5.2	0.002*	23.92 ±3.92	28.13 ±5.2	0.007*	30.19 ±4.7	26.2 ±5.1	0.073	26.9 ±4.4	26.6 ±5.7	0.87
Életkor a betegség kezdetekor	39.6 ±13.7	38.1 ±12.5	0.83	43.67 ±7.0	36.6 ±13.4	0.064	36.6 ±13.4	39.1 ±11.9	0.29	40.9 ±5.7	38.2 ±13.6	0.51	34.5 ±12.2	41.05 ±12.4	0.04*
Testsúly-változás (kg/év)	2.75 ±11.9	7.85 ±10.9	0.42	17.5 ±9.9	4.05 ±9.95	0.020*	2.83 ±9.6	8.33 ±11.9	0.24	13.3 ±11.5	5.9 ±11	0.28	7.5 ±11.3	6.4 ±11.3	0.81
Hydrocortisone ekvivalens hormonpótló dózis (mg/nap)	27.69 ±10.7	24.13 ±6.1	0.24	22.17 ±4.8	25.8 ±8.3	0.22	26.89 ±9.5	24.16 ±5.7	0.08	24.7 ±6.5	25 ±7.8	0.88	25.9 ±6.8	24.4 ±8.1	0.41
Testtömegre korrigált hormonpótló dózis (mg/kg/nap)	0.4 ±0.19	0.32 ±0.1	0.14	0.278 ±0.06	0.371 ±0.14	0.018*	0.395 ±0.17	0.313 ±0.08	0.035*	0.33 ±0.06	0.35 ±0.14	0.68	0.33 ±0.09	0.35 ±0.15	0.63
Éhomi vércukorszint (mmol/l)	4.97 ±1.3	5.1 ±2.3	0.86	4.91 ±0.9	5.05 ±2.3	0.59	4.51 ±1.2	5.56 ±2.6	0.8	5.16 ±1.3	5.03 ±2.2	0.85	4.91 ±1.1	5.14 ±2.5	0.66
Se. koleszterin (mmol/l)	4.35 ±1.9	4.74 ±2.3	0.49	5.33 ±1.8	4.52 ±2.2	0.49	5.15 ±1.6	4.36 ±2.5	0.94	5.03 ±2.7	4.49 ±2.1	0.62	4.7 ±1.8	4.63 ±2.4	0.21
Se. triglicerid (mmol/l)	1.1 ±0.72	1.38 ±1.21	0.54	1.83 ±1.1	1.18 ±1.1	0.17	1.1 ±0.7	1.46 ±1.3	0.066	1.8 ±1.9	1.2 ±0.9	0.11	1.34 ±0.97	1.28 ±1.18	0.31
Plazma ACTH a diagnóziskor (pg/ml)	1118 ±1089	1477 ±1676	0.45	1622 ±1837	1345 ±1442	0.58	1734 ±1884	1099 ±1143	0.145	893 ±669	1475 ±1625	0.29	1944 ±478	984 ±144	0.02*
Denzitás az FN régióban	0.74±0.11	0.76±0.1	0.012	0.8±0.15	0.75±0.11	0.92	0.741±0.108	0.765±0.1	0.01	0.76±0.05	0.76±0.12	0.89	0.76±0.11	0.76±0.12	0.95

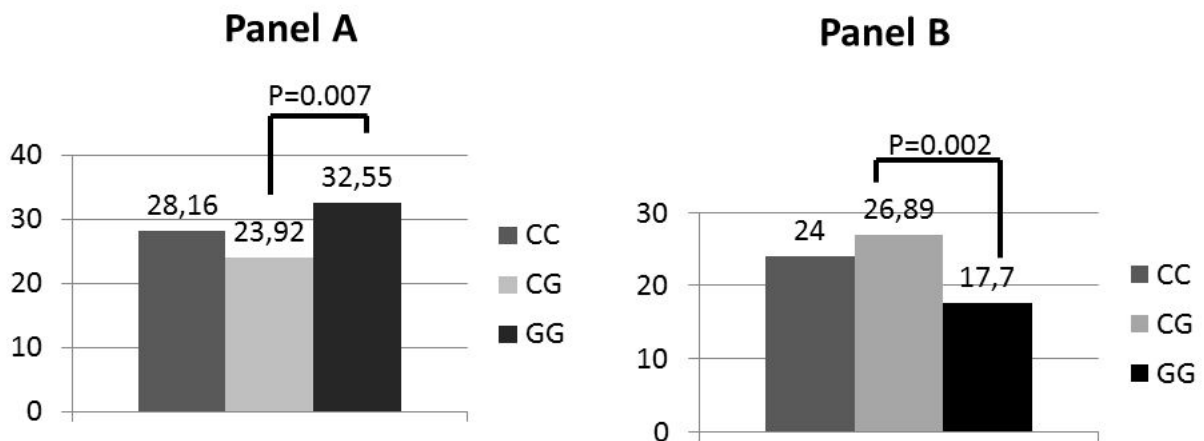
Paraméter	HSD11B1 SNP-k						GR SNP-k								
	rs12086634			rs4844880			BclI.			N363S			A3669G		
	átlag±szórás		p	átlag±szórás		p	átlag±szórás		p	átlag±szórás		p	átlag±szórás		p
	Hordozó	Nem hordozó		Hordozó	Nem hordozó		Hordozó	Nem hordozó		Hordozó	Nem hordozó		Hordozó	Nem hordozó	
Éves denzitás változás az FN régióban	0.009±0.03	0.003±0.02	0.41	0.003±0.013	0.006±0.02	0.6	0.0013±0.019	0.008±0.019	0.37	0.005±0.01	0.006±0.02	0.65	0.005±0.02	0.005±0.02	0.95
Denzitás az LS régióban	0.94±0.15	0.86±0.19	0.1	0.9±0.14	0.89±0.2	0.31	0.948±0.137	0.842±0.208	0.048	0.82±0.08	0.09±0.2	0.42	0.83±0.25	0.93±0.14	0.11
Éves denzitás változás az LS régióban	-0.01±0.02	0.01±0.03	0.051	0.024±0.03	0.001±0.03	0.017*	-0.005±0.018	0.014±0.038	0.12	0.0±0.03	0.007±0.03	0.71	0.022±0.04	-0.004±0.02	0.019
T-score az FN régióban	-1.13±0.89	-1.0±0.77	0.002	-0.57±1.3	-1.1±0.85	0.82	-1.15±0.85	-0.96±0.79	0.002	-1.02±0.18	-0.96±1.01	0.97	-1.0±0.8	-0.94±1.03	0.82
Éves T-score változás az FN régióban	0.07±0.22	-0.13±0.11	0.28	0.005±0.06	0.006±0.11	0.66	-0.005±0.104	0.011±0.102	0.82	0.009±0.12	0.013±0.16	0.98	0.008±0.1	0.001±0.1	0.79
T-score az LS régióban	-0.78±1.4	-1.59±1.1	0.017	-1.48±1.3	-1.2±1.3	0.32	-0.96±1.19	-1.54±1.3	0.038	-1.9±0.65	-1.2±1.3	0.2	-1.6±1.2	-0.97±1.4	0.13
Éves T-score változás az LS régióban	-0.06±0.15	0.056±0.2	0.14	0.22±0.23	-0.03±0.13	0.005*	-0.008±0.14	0.049±0.22	0.44	0.007±0.31	0.026±0.18	0.86	0.1±0.23	-0.27±0.15	0.067
Z-score az FN régióban	-0.2±0.87	-0.11±0.77	0.001	0.23±1.4	-0.098±0.8	0.78	-0.25±0.7	0.029±0.84	0.001	0.07±0.72	-0.08±0.97	0.8	-0.13±0.84	0.06±0.99	0.52
Éves Z-score változás az FN régióban	0.12±0.21	0.046±0.12	0.25	0.054±0.1	0.076±0.17	0.65	0.043±0.16	0.087±0.15	0.46	0.039±0.1	0.073±0.16	0.71	0.08±0.17	0.06±0.15	0.78
Z-score az LS régióban	-0.12±0.94	-0.72±1.3	0.026	-0.77±1.4	-0.35±1.2	0.19	-0.081±1.09	-0.74±1.2	0.013	-0.77±1.05	-0.41±1.3	0.44	-0.78±1.4	-0.14±1.1	0.11
Éves Z-score változás az LS régióban	-0.12±0.18	-0.07±0.13	0.01*	0.26±0.22	-0.003±0.1	0.003*	0.035±0.13	0.073±0.22	0.58	0.043±0.3	0.056±0.17	0.87	0.155±0.22	-0.006±0.1	0.019

BMI-testtömeg index (body mass index), RBC-vörösvértest szám (red blood cell mass), Hb-hemoglobin, Ht-hematocrit, LDL-low density lipoproteine, FM-femur nyak régió (femoral neck), LS-IV-V lumbális csigolya régió (lumbal spine), * p<0.05 és power>80%; a félkövér betűvel kiemelt értékek szignifikánsak, de a power analízis 80%-nál kisebb értéket mutatott.

1. GR polimorfizmusok hatásai

a. BclI. polimorfizmus

A 2. intronikus régióban elhelyezkedő BclI. polimorfizmus allélfrekvenciája nem tért el a beteg- és kontrollcsoport között. Az SNP szignifikáns összefüggést mutatott a testtömeg-index-szel (BMI, kg/m²). Homozigóta hordozók esetében a BMI szignifikánsan magasabb volt, mint a heterozigóta genotípussal rendelkezők esetében (p=0.007, power: 100%). Emellett a homozigóta hordozók hydrocortisone ekvivalensre számított napi szubsztitúciós hormondózisa szignifikánsan kisebb, mint a heterozigóta hordozóké vagy a vad genotípusú betegeké (p=0.002, power: 98.9%). Az alábbi összefüggéseket az **11. Ábrán** szemléltettem.



11. Ábra. Az átlagos testtömeg-index (BMI, kg/m²) (Panel A) és össz. hydrocortisone ekvivalens szubsztitúciós dózis (mg/nap) (Panel B) ábrázolása homozigóta vad (CC), heterozigóta (CG) és homozigóta mutáns (GG) BclI polimorfizmust hordozók esetében, Addison-kóros betegekben

b. N363S polimorfizmus

Az N363S polimorfizmus allélfrekvenciája szignifikánsan magasabbnak bizonyult az Addison-kóros betegcsoportban, mint a kontroll csoportban (8.0% vs. 3.1%; p=0,019). A vizsgált polimorfizmusok allélgyakoriságát a **4. Táblázatban** tüntettem fel.

4. Táblázat. A vizsgált *GR* és *HSD11B1* polimorfizmusok genotípus megoszlása és allélgyakorisága Addison kóros betegekben és a kontroll csoportokban.

	Addison-kóros betegek (n=68)		Egészséges kontroll csoport (n=160 és n=250)	
	esetszám	allélgyakoriság (%)	esetszám	allélgyakoriság (%)
BclI.		26.4%		35%
CC	36		62	
CG	28		82	
GG	4		16	
N363S		8.0%*		3.1%
AA	57		150	
AG	11		10	
GG	0		0	
A3669G		19.1%		22%
AA	42		100	
AG	26		48	
GG	0		12	
rs12086634		13.9%		17.5%
GG	50		86	
GT	17		40	
TT	1		3	
rs4844880		14.7%		18.2%
TT	50		167	
TA	16		75	
AA	2		8	

*: $p < 0,05$ Chi négyzet vagy Fischer teszt alkalmazásával

c. *A3669G polimorfizmus*

Az A3669G polimorfizmus allélfrekvenciája nem tért el a beteg- és kontrollcsoport között. Érdekes eredmény, hogy a betegség hordozók körében szignifikánsan korábbi életkorban jelentkezett, mint nem-hordozók esetében (34.5 ± 12.2 vs. 41.05 ± 12.35 év, $p=0.04$, 1. Táblázat) függetlenül a többi SNP hordozói státuszától. Emellett a polimorfizmust hordozók esetében szignifikánsan magasabb volt a diagnóziskor mérhető plazma ACTH szint a nem-hordozókhöz képest (1944 ± 478 vs. 984 ± 144 pg/ml, $p=0.031$, power: 100%).

2. *HSD11B1 polimorfizmusok hatásai*

a. *rs12086634 polimorfizmus*

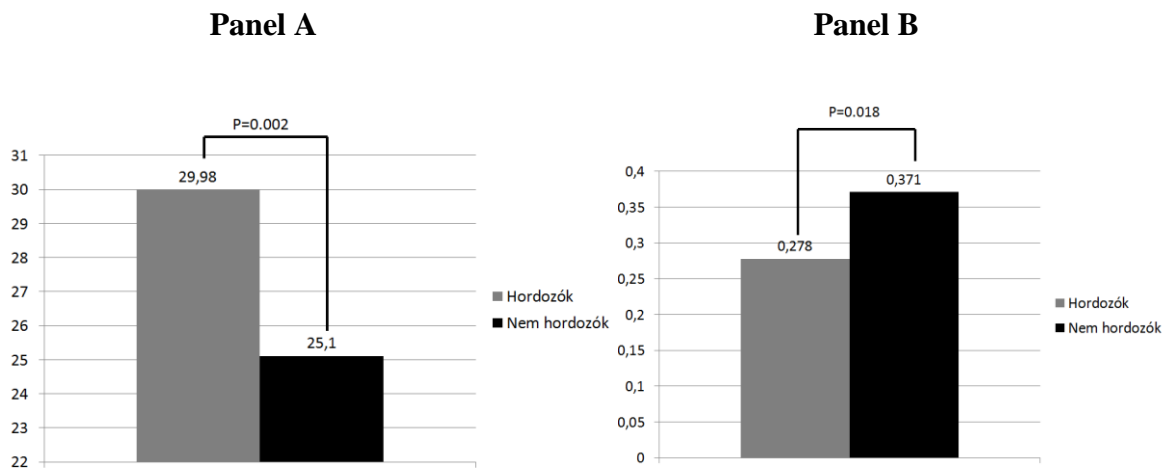
Az rs12086634 polimorfizmus allélfrekvenciája nem tért el a beteg- és kontrollcsoport között. A polimorfizmus szignifikáns összefüggést mutatott az éves Z-score változással a lumbális régióban, hordozókban az éves Z-score csökkenés szignifikánsan nagyobb mértékű volt, mint nem-hordozókban (-0.12 ± 0.18 vs. -0.07 ± 0.13 , $p=0.01$, 3. Táblázat). Emellett a hordozókban szignifikánsan alacsonyabb denzitás, T- és Z-score értékeket észleltünk a femorális régióban, és szignifikánsan magasabb T- és Z-score értékeket a lumbális régióban, de ezeket az eredményeket a power analízis nem erősítette meg.

b. *rs4844880 polimorfizmus*

Az rs4844880 polimorfizmus allélfrekvenciája nem tért el a beteg- és kontrollcsoport között. Az eredmények alapján az SNP szignifikáns hatást gyakorol a testtömeg-indexre és a testtömeg változására a hormonpótló terápia során. A polimorfizmust hordozókban a BMI szignifikánsan magasabb volt, mint nem-hordozók körében (29.9 ± 3.7 vs. 25.1 ± 5.1 kg/m², $p=0.002$, power: 95.5%). A hormonpótló terápia mellékhatásaként észlelhető testtömeg növekedés hordozók esetében szignifikánsan nagyobb mértékű volt, mint a nem-hordozóknál (17.5 ± 9.87 vs. 4.05 ± 9.95 kg, $p=0.02$, power: 84%). Mindezek mellett a testtömegre korrigált hormon-szubsztitúciós dózis szignifikánsan alacsonyabb volt hordozók körében a nem-hordozókkal összehasonlítva (0.278 ± 0.06 vs. 0.371 ± 0.14 mg/kg/nap, $p=0.018$, power: 94.9%). A BMI-re és testtömegre korrigált hormonpótló dózissra vonatkozó adatokat a **12. Ábrán** szemléltettem.

A polimorfizmus pozitív hatása volt megfigyelhető az éves denzitás, T- és Z-score változás esetében a lumbális régióban. A denzitás esetében a növekedés szignifikánsan nagyobb mértékű volt hordozóknál, míg a T- és Z-score értékek hordozók esetében növekvő, nem-

hordozók esetében csökkenő tendenciát mutattak (0.024 ± 0.03 vs. 0.001 ± 0.03 , $p=0.017$; 0.22 ± 0.23 vs. -0.03 ± 0.13 , $p=0.005$; 0.26 ± 0.22 vs. -0.003 ± 0.1 , $p=0.003$; power: 92.1%, 90.7%, 96.2%).



12. Ábra. BMI (kg/m²) (**panel A**) és testtömegre korrigált hormon-szubsztitúciós dózis (mg/kg/nap) (**panel B**) az rs4844880 polimorfizmust hordozók és nem hordozók esetében, Addison-kóros betegcsoportban

Tekintettel arra, hogy a 11- β -HSD enzim 2-es izotípusa (NAD dependens dehidrogenáz, mely a kortizol inaktiválása által védi a mineralokortikoid receptort a túlzott, glukokortikoidok általi aktiválástól) nem metabolizálja a dexamethasont – és így a 11HSD1 által visszaalakítandó hormon mennyisége megváltozik - a betegeket két csoportra osztottam attól függően, hogy a hormonpótló terápiájuk tartalmaz-e dexamethasont. A két csoport között nem volt szignifikáns eltérés az életkor, hormon szubsztitúciós dózis, éhomi vércukor és szérum lipid koncentrációk tekintetében. A dexamethasont nem szedők körében továbbra is szignifikánsan magasabb BMI és nagyobb testsúlygyarapodás volt megfigyelhető az rs4844880 polimorfizmust hordozók esetében, a nem-hordozókkal összehasonlítva (31.2 ± 5 vs. 23.8 ± 4.9 kg/m² illetve 16.2 ± 12.5 vs. 3 ± 8.9 kg), ezzel szemben a dexamethasont szedőknél ez az összefüggés nem volt megfigyelhető (**5. Táblázat**), bár észlelhető volt, hogy a BclII polimorfizmus a dexamethasonnal nem kezelt csoportban szignifikánsan gyakrabban fordult elő, mint a dexamethasont is szedőknél (34.2% vs. 18.3% , $p=0.03$, **6. Táblázat**), ami az rs4844880 polimorfizmus hatását tovább árnyalhatta.

5. Táblázat. Az rs12086634 és rs4844880 polimorfizmusokat hordozó és nem hordozó Addison kóros betegek klinikai paramétereinek közötti különbségeket reprezentáló p értékek dexamethasont szedő és nem szedő betegcsoportokban

	Dexamethasont szedők (n=30)						Dexamethasont nem szedők (n=38)					
	rs12086634			rs4844880			rs12086634			rs4844880		
	átlag±szórás		p	átlag±szórás		p	átlag±szórás		p	átlag±szórás		p
	Hordozók	Nem hordozók		Hordozók	Nem hordozók		Hordozók	Nem hordozók		Hordozók	Nem hordozók	
BMI (kg/m²)	30.5±4.6	27.4±3.8	0.13	29.1±2.5	27.1±4.9	0.72	23.1±3.5	26.3±6.4	0.23	31.2±5.05	23.8±5.0	0.002*
Életkor a betegség kezdetekor (év)	45±14.3	38.7±12.3	0.29	42.2±7.5	38.3±14.1	0.31	35.9±12.5	37.6±12.9	0.83	45.8±6.1	35.4±13.0	0.09
Testsúly-változás (kg)	20.1±11.3	9.1±11.4	0.38	20.0±0	8.7±14.4	0.45	2.1±10.4	7.3±10.42	0.25	16.2±12.5	3.0±8.9	0.021*
Hydrocortisone ekvivalens hormonpótló dózis (mg/nap)	24.3±2.1	25.2±2	0.14	21.6±3.4	24.9±4.5	0.18	31.8±12.2	23.7±7.6	0.051	23.0±6.8	26.5±10.4	0.61
Testtömegre korrigált hormonpótló dózis (mg/kg/nap)	0.3±0.08	0.3±0.08	0.79	0.2±0.06	0.3±0.08	0.17	0.4±0.2	0.3±0.1	0.1	0.3±0.1	0.4±0.1	0.10
Éhomi vércukorszint (mmol/l)	5.6±1.9	4.7±1.3	0.14	5.0±0.8	4.8±1.7	0.82	4.5±0.4	5.5±2.9	0.69	4.7±1.03	5.2±2.7	0.73
Se. koleszterin (mmol/l)	4.3±2.1	5.2±2.0	0.67	5.7±1.05	4.9±2.1	0.67	4.3±1.7	4.3±2.4	0.65	4.7±2.6	4.2±2.2	0.86
Se. triglicerid (mmol/l)	1.1±0.6	1.3±1.0	0.54	1.6±1.0	1.2±0.9	0.18	1.1±0.8	1.4±1.4	0.49	2.2±1.3	1.2±1.2	0.28

BMI-testtömeg index (body mass index), * p<0.05 és power>80%

6. Táblázat. A vizsgált *GR* és *HSD11B1* polimorfizmusok genotípus megoszlása és allélgyakorisága Addison kóros betegekben, dexametasont szedő és nem szedő alcsoportokban

	Dexametasont szedők (n=30)		Dexametasont nem szedők (n=38)	
	esetszám	allélgyakoriság (%)	esetszám	allélgyakoriság (%)
BclI.		18,3		34,2*
CC	20		16	
CG	9		19	
GG	1		3	
N363S		11,6		5,2
AA	23		34	
AG	7		4	
GG	0		0	
A3669G		23,3		15,8
AA	16		26	
AG	14		12	
GG	0		0	
rs12086634		11,6		15,8
GG	23		27	
GT	7		10	
TT	0		1	
rs4844880		18,3		11,8
TT	20		30	
TA	9		7	
AA	1		1	

*: $p < 0,05$ Chi négyzet vagy Fischer teszt alkalmazásával

Nőbetegek esetében a betegcsoportot két alcsoportra osztottam a fertilitástól függően, a pre- és posztmenopauzális csoport közötti határt az 50. betöltött életévnél húztam meg. A 50 évnél idősebbek csoportjában az rs4844880 polimorfizmusnak főként a csontsűrűsége gyakorolt jótékony hatása, míg az 50 évnél fiatalabbak esetében a testtömeget és BMI-t befolyásoló hatása került előtérbe, és a csontsűrűséget jelző paraméterek között nem volt szignifikáns eltérés (**7. Táblázat**).

7. Táblázat. Az rs4844880 polimorfizmus illetve a BMI, hydrocortisone ekvivalens hormonpótló dózis és csontsűrűség értékek közötti összefüggést reprezentáló p értékek 50 év feletti és alatti, Addison kóros betegcsoportokban

	Életkor: 0-50 év	Életkor >50 év
Testtömeg	0.023	0.338
BMI	0.005*	0.476
Éves testtömeg-változás	0.035*	0.154
Se. Triglicerid	0.028	0.249
Testtömegre korrigált hormonpótló dózis	0.231	0.029
Éves dinzítás változás az LS régióban	0.442	0.0001*
Éves T-score változás az LS régióban	0.709	0.0001*
Éves Z-score változás az LS régióban	0.463	0.0001*

BMI – testtömeg index (body mass index), FN – femur nyak régió (femoral neck), LS – lumbális csigolya régió (lumbal spine)

* $p < 0.05$ és $\text{power} > 80\%$; a félkövér betűvel kiemelt értékek szignifikánsak, de a power analízis 80%-nál kisebb értéket mutatott.

3. *Esetismerterés – R714Q mutáció következtében kialakult Chrousos szindróma*

31 éves nőbeteg kivizsgálása infertilitás miatt kezdődött meg a Semmelweis Egyetem II.számú Belgyógyászati Klinikán. Anamnézisében érdemi megbetegedés nem szerepelt, 2.5 éves sikertelen gyermekvállalási próbálkozást követően került az egészségügy látóterébe. 13 éves kora óta rendszeres és szabályos menstruációs ciklus jellemezte. A klinikai vizsgálat során a testtömeg-indexe (19.8 kg/m^2) és vérnyomása a normál tartományban volt, laboratóriumi leleteiben ioneltérés nem mutatkozott (normokalaemiás volt). Semmilyen Cushing-szindrómára vagy hiperandrogenizmusra utaló fizikális és klinikai tünet nem volt fellelhető, galaktorrhoea sem jelentkezett. Családi anamnézise nem volt érdemi. A kezdeti hormonális vizsgálatok során emelkedett prolaktin érték volt fellelhető (93 ng/ml , referencia tartomány: $1.4\text{-}24 \text{ ng/ml}$). További vizsgálatok során ez az eltérés makroprolaktinémiának bizonyult (polietilén glikol – PEG precipitációs érték: 76%), sella MR vizsgálat során két alkalommal sem ábrázolódtott kóros eltérés. Az infertilitás apai oka kizárható, hiszen a férjnek az előző házasságából két gyermeke született. Részletes hormonális kivizsgálás eredményei részleges glukokortikoidok iránti rezisztenciára utaltak (**8. Táblázat**). Többször ismételt hormonvizsgálatok során a szérum kortizol szint mindig emelkedettnek bizonyult a reggeli órákban (az értékek 35.4 és $26 \text{ } \mu\text{g/dl}$ között mozogtak, referencia tartomány: $8\text{-}25 \text{ } \mu\text{g/dl}$), míg a plazma ACTH koncentráció vagy a normál tartományban mozgott, vagy azt éppen meghaladta (28.5 és 65 pg/ml között, normál tartomány: $7.2\text{-}63.3 \text{ pg/ml}$). A reggeli nyálkörtizol érték kétszer került meghatározásra, mindkét alkalommal emelkedettnek bizonyult (1.36 és $1.13 \text{ } \mu\text{g/dl}$, normál tartomány: <0.69), ezzel szemben az éjjeli nyálkörtizol a normál tartományban volt (0.21 és $0.23 \text{ } \mu\text{g/dl}$, normál tartomány: <0.43), ami megtartott kortizol ritmusra utal. Kis dózisú (1 mg) dexamethason szupressziós teszt két alkalommal került elvégzésre, az eredmények inadekvát szérum kortizol szupresszióra utalnak (10 és $15 \text{ } \mu\text{g/dl}$, normál: $<5 \text{ } \mu\text{g/dl}$). A 24 órás vizelet szabad kortizolszint (UFC, urinary free cortisol) 280 és 513 nmol/nap között változott (normál tartomány: $100\text{-}379$). A szérum DHEAS (dehidroepiandrosteron szulfát) szint ismételt mérések során a normál tartományban mozgott, vagy azt éppen meg is haladta (163 és $342 \text{ } \mu\text{g/dl}$, normál tartomány: $130\text{-}330$). A szérum androsztendion koncentráció emelkedett volt (344 ng/dl , normál tartomány: $80\text{-}280$). A szérum GH, SHBG, TSH, FT4, LH, FSH, progeszteron és ösztadiol értékek mind a normál tartományban voltak.

8.Táblázat. Glukokortikoid rezisztenciában szenvedő, 31 éves nőbeteg és tünetmentes testvére esetében mért laboratóriumi paraméterek

	Referencia	1.Vizit	2.Vizit	3.Vizit	4.Vizit	5.Vizit	6.Vizit	7.Vizit	Testvér
reggeli sz. kortizol (ug/dl)	8-25	32.4		26.0	27.0	35.4	32.5	26.53	22
éjjeli sz. kortizol (ug/dl)	0-5							4.81	
plazma ACTH (pg/ml)	7.2-63.3	65		32.4	28.5	47.4	38.6	27	19.9
reggeli nyál kortizol (ug/dl)	<0.69		1.13				1.36		
éjjeli nyál kortizol (ug/dl)	<0.43		0.23				0.21		
sz. kortizol LDDST-t követően (ug/dl)	<5		10.1				15.08		
24h UFC (nmol/nap)	100-379		513	288			208		
DHEAS (ug/dl)	130-330				163	342		183.3	204
androsztendion (ng/dl)	80-280				344				
TSH (mU/l)	0.35-4.94	2.444		1.054	1.298	1.75		1.49	
ft4 (pmol/l)	9-23.2	11.65							
prolaktin (ng/ml)	1.39-24.2	93.55		25.61	61.48	158.57		114.89	40.4
prolaktin PEG precipitációt követően (ng/ml)	1.39-24.2	21		6.1					

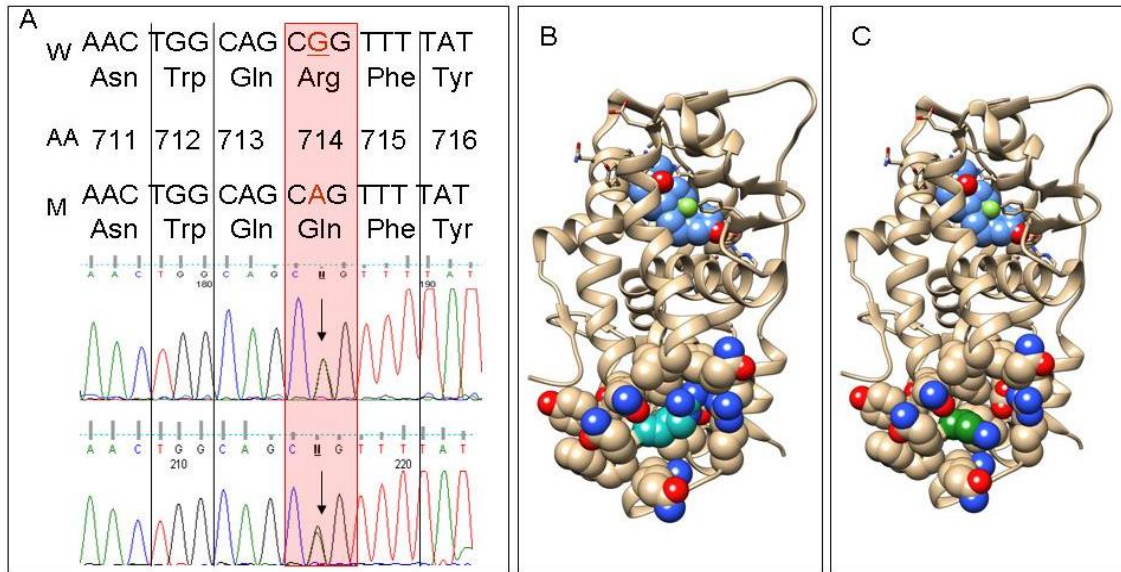
LDDST – kis dózisú dexamethason szuppressziós teszt (low dose dexamethasone suppression test (1 mg); UFC – vizelet szabad kortizol (urinary free cortisol); DHEAS

- dehidroepiandroszteron szulfát; ACTH - adrenocorticotrop hormon ; PEG – polietilén glikol , TSH - thyreoidea stimuláló hormon; ft4 – szabad thyroxin

Genetikai tanácsadást és írásos beleegyező nyilatkozat aláírását követően elvégeztem a GR gén (*NR3C1*, NM_000176) kódoló régióinak mutáció analízisét. Az index beteg és testvére genetikai tanácsadáson vett részt, a vizsgálatot tájékozott beleegyezésen alapuló nyilatkozat aláírását követően végeztük el. A humán adatokat a Helsinki Deklarációnak megfelelően kezeltük, a kutatás elvégzését a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága engedélyezte.

A *GR* gén szekvenálása során egy missense, heterozigóta mutációra derült fény (c.2141G→A), ami a GR fehérjében egy Arg714Glu aminosavcserét eredményez a 8-as exon régiójában, melyet Nader és munkatársai 2010-ben publikáltak elsőként, és patogénnek tekintették. A patogén mutáció identifikálását követően családszűrés keretében a beteg 35 éves, klinikailag egészséges lánytestvérénél is megismételtem a vizsgálatot. A testvér szintén hordozza a mutációt, ennek ellenére normál szteroid hormonszintekkel rendelkezik, és nincs fertilitási problémája (egy 10 éves leánygyermek édesanyja). A család többi tagja nem egyezett bele a genetikai szűrésbe. Az index beteg és testvérenek Sanger szekvenálás során nyert, a fent említett mutációt ábrázoló kromatogramot, illetve a három dimenziós modellt a 714-es aminosav pozícióban elhelyezkedő argininről és glutaminról **13. Ábrán** tüntettem fel.

Három dimenziós modellezés során a 714 pozícióban lévő arginin a GR ligandkötő doménjének (LBD) 10-es helixében helyezkedett el, a ligand kötő zsebbel ellentétes oldalon, viszonylag messze bármely, ismert funkcionális régiótól. Az arginin nagy, pozitív töltésű oldallánccal rendelkezik, ami benyúlik a 7-10 hélixek által alkotott részbe. Ezzel szemben a glutaminnak kicsi, töltés nélküli oldallánca van, ami felszabadítja a 10-es hélixet az eredeti pozíciójából, ami további konformációs változásokat hoz létre a ligandkötő zseb szerkezetében.⁹⁴ Nader és mtsai. elvégezték a mutáció komplex funkcionális vizsgálatát, melynek során kimutatták, hogy a szimuláció időtartama alatt a mutáns LBD mérete megnövekedett a vad típushoz képest, ami csökkent ligand kötési affinitáshoz vezethet.⁹⁴



13.Ábra. Sanger szekvenálással nyert kromatogram, melyen a heterozigóta c.2141G→A mutáció ábrázolódik a GR gén 8.exonjának régiójában, az index beteg és a klinikailag egészséges testvérében (**A**); három dimenziós modell a 714-es aminosav pozícióban elhelyezkedő argininről (**B**) illetve glutaminról (**C**): a 714-es pozícióban eredetileg elhelyezkedő arginin a ligand kötő domén felszínén található, nagy pozitív töltéssel rendelkezik. A glutaminra történő aminosavcsere szerkezeti- és töltésbeli változásokhoz létre (a domén gerince szalagként jelenik meg, a 714-es és környező aminosavakat gömbök jelölik, az arginint világoskék, a glutamint zöld szín jelöli)

A beteg vizsgálata során detektált, és korábban patogénként publikált mutációt nem észleltük korábban, a munkacsoportunk által glukokortikoid rezisztencia és Cushing szindróma irányába vizsgált 60 beteg, illetve kontroll esetében. Ezenkívül nem volt jelen a leggyakrabban használt genetikai adatbázisokban, mint például az Exome Variant Server (evs.gs.washington.edu/EVS), Exact (exac.broadinstitute.org) vagy SNPeffect (<http://snpeffect.switchlab.org>).

V. Megbeszélés

1. A GR és HSD11B1 polimorfizmusok vizsgálati eredményei

Az Addison-kórban szenvedő betegek életminősége mind a betegség, mind a hormonpótló terápia következtében elmarad az egészségesekétől¹³⁸. A nem megfelelő hormonpótló terápia komoly rizikót jelent az emelkedett morbiditás és mortalitás szempontjából. Az alkalmazott glukokortikoid szubsztitúciós kezelés pontos beállítása emiatt különösen fontos. Ez a feladat a mai napig kihívások elé állítja az endokrinológusokat, mivel napjainkig nem született ajánlás a terápia felépítéséről, illetve a kezelés követésére alkalmas paraméterről². A szérumban mérhető hormonértékeken túl első sorban a betegek szubjektív hogyléte befolyásolja a terápiás módosításokat. Elégtelen hormonpótlás esetén gyengeség, fáradtság, hipotenzió és kollapszusra való hajlam, hányinger, testsúly-vesztés, illetve hiperpigmentáció léphet fel, túlzott hormonbevitelkor a következmény abdominális elhízás, magasabb szérum lipid szintek, károsodott glukóz tolerancia, hipertónia, oszteoporózis, Cushingoid tünetek lehetnek. A kezelés beállításakor további nehézség, hogy testtömegtől függetlenül a betegek szubsztitúciós dózis igénye eltérő, a glukokortikoid érzékenység egyénenként változó, ennek következtében igen hamar megjelent az egyénre szabott terápia igénye. A glukokortikoidok iránti érzékenység mértéke részben genetikailag determinált. A glukokortikoid receptor illetve a receptorhoz hozzáférő hormonmennyiséget prereceptorális szinten moduláló 11- β -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim génjében előforduló eltérések - mint például a polimorfizmusok – a glukokortikoid hatás jelátvitelének ezen pontjait módosítva akár globálisan, akár szöveti szinten eltérően módosíthatják az egyéni glukokortikoid érzékenységet, ezáltal a hormonpótló terápia során az igényelt hormonmennyiséget, illetve a mellékhatások megjelenésének súlyosságát.

Napjainkban az eddig dokumentált, a glukokortikoid receptor génjében (GR) megjelenő polimorfizmusok száma folyamatosan növekszik. A három leggyakrabban – és általunk is – vizsgált SNP a BcII., N363S és A3669G polimorfizmusok, mivel ezeknek a genetikai variációknak glukokortikoid érzékenységet befolyásoló szerepe – az irodalomban időnként felmerülő ellentmondások ellenére – összességében bizonyított. A BcII. és N363S SNP-k a glukokortikoid érzékenységet növelik, tehát ugyanazon

glukokortikoid hormonpótló dózis esetén a hordozóknál a mellékhatások megjelenésére a kockázat fokozott, míg ezzel ellentétben az A3669G polimorfizmus relatív glukokortikoid rezisztenciát okoz, így hordozó betegek esetében az igényelt hormonpótló dózis nagyobb, mint a nem-hordozóké, és a mellékhatások megjelenése is nagyobb szubsztitúciós dózis adása esetében várható.

Vizsgálataim során az N363S polimorfizmus allélfrekvenciája majdnem háromszorosa volt a vizsgált betegcsoportban, mint a munkacsoportunk által korábban vizsgált egészséges kontrollcsoportokban^{27,66}. Ez a megfigyelés felveti az SNP hajlamosító tényezőként való jelenlétét az autoimmun adrenalitisz patogenezisében, amit korábban még nem publikáltak, sőt egyéb autoimmun megbetegedésekkel (pl. colitis ulcerosa, Crohn betegség, reumatoid arthritisz, szklerózis multiplex) sem írták le az összefüggését, ellentétben például az A3669G polimorfizmussal.

Az eredmények alapján továbbá felvethető az A3669G polimorfizmus patogenetikai szerepe is az Addison-kór kialakulásában tekintettel arra, hogy a betegség a hordozók esetében korábbi életkorban manifesztálódott. A jelenség azzal magyarázható, hogy az endogén glukokortikoidok iránt is csökkent érzékenység miatt a betegek korábban szorulnak hormonpótló terápiára az endogén glukokortikoid termelés csökkenésével párhuzamosan, mivel a rezisztencia miatt a még meglévő hormontermelés hamarabb vezet elégtelen működéshez. Ezt a teóriát alátámasztja az az eredmény is, hogy a polimorfizmust hordozókban a diagnóziskor magasabb plazma ACTH koncentrációk voltak mérhetőek, ami a negatív feedback mechanizmus fokozott működésére, a hipofízis nagyobb mértékű aktivációjára és ACTH termelésére utal. Hordozók esetében a betegség fiatalabb életkorban történő manifesztációja továbbá összhangban van a korábbi megállapításokkal, miszerint az SNP összefüggésbe hozható egyéb autoimmun megbetegedésekkel, például reumatoid arthritisz¹⁶³ és szklerózis multiplex⁵³ kialakulásával is.

Az irodalomban korábban már leírásra került a BclI. polimorfizmus glukokortikoidok iránti érzékenyítő hatása⁴¹. Eredményeim ezt a korábbi megállapítást alátámasztják, mivel homozigóta hordozókban alacsonyabb hormonpótló dózist és ennek ellenére magasabb átlagos testtömeget detektáltam, ami a nagyobb mértékű glukokortikoid expozíció mellékhatása lehet. Mindezek alapján a genotípus eloszlás megállapításával az

egyénre szabott glukokortikoid szubsztitúciós terápia tovább pontosítható lehet. Ugyan az SNP-k szűrése költséges eljárás, elvégzése minden beteg esetében nem térülne meg az egészségügy számára, véleményem szerint azonban néhány beteg esetében, elsősorban azoknál, akiknél szokatlanul nagymértékű hízás vagy egyéb mellékhatások fellépése tapasztalható a hormonpótló dózis csökkentése ellenére, megfontolandó lenne ennek az SNP-nek a vizsgálata.

A *HSD11B1* génben előforduló polimorfizmusok az enzimaktivitás modulálásával prereceptorális szintén árnyalhatják az egyéni – akár szöveti szinten is eltérő – glukokortikoid érzékenységet, korábban a szerepüket már felvetették az elhízás és a hiperlipidémia kapcsán. Az rs12086634 polimorfizmus illetve a vele 100% kapcsoltságban álló 83557insA polimorfizmus hatásaként korábban csökkent *HSD11B1* expressziót igazoltak¹⁰⁶. Az SNP-k szerepét oszteoporózisban is igazolták¹³³. Ez utóbbi megállapítást eredményeim is alátámasztották, mi szerint a polimorfizmust hordozókban az éves Z-score csökkenés szignifikánsan nagyobb mértékű volt, mint nem-hordozókban, illetve esetükben szignifikánsan alacsonyabb denzitás, T- és Z-score értékeket észleltünk a femorális régióban. Ezen eredményeinket a power analízis nem erősítette, és ellentétben állnak azokkal a szintén gyenge statisztikai erősségű eredményekkel, amelyek szerint hordozókban szignifikánsan magasabbak a T- és Z-score értékek a lumbális régióban. Az ellentmondásos illetve kis statisztikai erővel rendelkező eredmények tisztázása érdekében az esetszám emelése lenne szükséges, de akár arra is utalhatnak, hogy ezen polimorfizmusok a korábban leírtaknál kisebb jelentőségűek.

A 2012-ben, munkacsoportunk által elsőként leírt, a *HSD11B1* gén promoter régiójában elhelyezkedő rs4844880 polimorfizmus¹³⁶ csontsűrűséget kedvezően befolyásoló hatása már bizonyított. A BclI. polimorfizmushoz hasonlóan vizsgálataim az rs4844880 SNP hormonpótló dózist befolyásoló hatását is igazolták, hiszen hordozókban szignifikánsan alacsonyabb testtömegre korrigált glukokortikoid szubsztitúciós dózist észleltünk. Mindemellett a hordozók átlagos testtömege szignifikánsan magasabb volt a nem-hordozókéhoz képest, illetve esetükben – a nem-hordozóknál is megfigyelhető – testtömeg növekedés nagyobb mértékű volt. Mindezen eredmények nem egyeznek a munkacsoportunk által leírt korábbi megállapításokkal, miszerint a polimorfizmus jelenléte csökkent transzkripciós aktivitást eredményez¹³⁶, azaz a korábbi eredmények

alapján csökkent mértékű kortizon→kortizol átalakulást, ezáltal kisebb hormonhatást, vagyis relatív glukokortikoid rezisztenciát váránk, míg a jelen eredmények, azaz a kisebb hormondózis ellenére észlelhető nagyobb mértékű elhízás inkább fokozott glukokortikoid érzékenységet sugall. Korábban hasonló ellentmondásos eredmény született a *GR* gén ER22/23EK polimorfizmusával kapcsolatban, ami az A3669G SNP-hez hasonlóan relatív glukokortikoid rezisztenciát okoz, jelenlétét mégis összefüggésbe hozták az emelkedett BMI értékekkel Addison-kóros betegek esetében¹⁶⁴. Vizsgálataim során az rs4844880 polimorfizmus BMI-t és testtömeg gyarapodást befolyásoló szerepe csak azoknak a betegeknek az esetében jelentkezett, akiknek dexamethason nem képezte részét a terápiájuknak. Tekintettel arra, hogy ebben a betegcsoportban a BclI. polimorfizmus szignifikánsan nagyobb arányban fordult elő, lehetséges, hogy a magasabb BMI és testtömeg növekedés csupán ezen SNP érzékenyítő hatásának köszönhető. Mindazonáltal nem hagyhatjuk figyelmen kívül, hogy a 11HSD enzim 2-es típusa - mely az aktív kortizolt hivatott inaktív kortizonná alakítani és ezzel a mineralokortikoid receptort a glukokortikoidok által kifejtett túlzott mineralokortikoid hatástól védeni – a dexamethason nem bontja, viszont a 11HSD2 által inaktívált glukokortikoidokat a 11HSD1-es altípusa reaktiválhatja, így lehetséges, hogy az rs4844880 polimorfizmus BMI-re és testtömeg változásra gyakorolt hatását a nem lebontott dexamethason felülírja. A glukokortikoidok egy feed forward visszacsatolási körön keresztül növelik a HSD11B1 expresszióját, és az enzim aktivitását, ezáltal szöveti szinten glukokortikoid többlet alakulhat ki. Addison-kóros betegek esetében a megfelelő hormonhatást csak külsőleg bevitt glukokortikoidok segítségével lehet elérni. Mivel a 11-β-HSD enzim fő forrása a zsírszövet, a súlygyarapodással és BMI növekedésével párhuzamosan a zsírszövet mennyisége, és ennek következtében az enzim expressziója is növekszik. Ez egyezik a korábbi megfigyelésekkel, melyeket zsírszöveti 11-β-HSD enzimet overexpresszáló egerek esetében regisztráltak, amiknél metabolikus szindróma alakult ki érdemi keringő glukokortikoid szintemelkedés nélkül^{115,165,166}. Egy nemrégiben publikált összefoglalás (do Nascimento által¹⁶⁷) továbbá 15 különböző vizsgálat eredményeit összegzik, melyek emelkedett HSD11B1 expresszióval járó abdominális zsírszövet felszaporodásáról, emelkedett BMI-ről tudósítanak. Az eredményekre alapozva egy prospektív, farmakokinetikai vizsgálat tisztázhatná a vizsgált SNP-k hydrocortisone metabolizmusra gyakorolt hatását Addison kóros betegekben.

A munkacsoportunk által elsőként leírt rs4844880-as polimorfizmus továbbá kedvezően befolyásolta a csontsűrűség értékeket, Addison kóros betegekben pozitív hatása volt megfigyelhető az éves denzitás, T- és Z-score változás esetében a lumbális csigolya régióban. Ezen eredmény megerősíti a korábban posztmenopauzális osteoporózisban szenvedő nőbetegek esetében tett megfigyelést, ami szerint a polimorfizmust hordozókban magasabb BMD, T- és Z-score értékek voltak mérhetők a lumbális csigolyák régiójában¹³⁶.

Fertilitástól függően a nőbetegek csoportját két alcsoportra felosztva az rs4844880 polimorfizmus testtömeget és csontsűrűséget befolyásoló hatásai nem egyforma mértékben érvényesültek. Az 50 év felettek csoportjában az SNP főként a csontsűrűsége gyakorolt jótékony hatást, míg az 50 év alattiakban a testtömeget és BMI-t befolyásoló hatása került előtérbe. A csontsűrűséget befolyásoló hatás hiánya a premenopauzális csoportban a csoportra jellemző, kedvező nemi hormonhatással, illetve a nagyobb mértékű fizikai aktivitással is magyarázható.

2. Esetismertetés megbeszélése

Vizsgálataim során egy klinikailag glukokortikoid rezisztenciában szenvedő, infertilitás miatt vizsgált, fiatal nőbeteg panaszai háttérében egy missense, heterozigóta formában hordozott, Arg714Glu mutációt identifikáltam a GR gén 8-as exonjában. A beteg kezdeti hormonvizsgálata hiperprolaktinémiára utaltak, mely szintén az infertilitás okozója lehet, bár későbbiekben az emelkedett prolaktin szint makroprolaktinémiának bizonyult (PEG precipitációs eredmények alaján), és a betegnek nem voltak hiperprolaktinémiára utaló klinikai tünetei, a sella MR vizsgálatok során pedig normális hipofízis morfológia ábrázolódott. Mindezek alapján nem valószínű, hogy a beteg infertilitásának okaként a hiperprolaktinémia jelölhető meg. A részletes endokrinológiai kivizsgálás során a hormonális laboratóriumi eredmények enyhe fokú glukokortikoid rezisztenciára utaltak. Elvégeztem a GR gén kódoló régiójának mutáció analízisét, melynek során egy már korábban, Nader és munkatársai által publikált, patogénnek minősített mutációra derült fény. A mutációt korábban egy 2 éves leány gyermek esetében azonosították, akit hipoglikémia, hipertenzió, korai pubarche, enyhe klitoromegália és előrehaladott csontkor, illetve emelkedett szérumban kortizol, ACTH, DHEA,

androsztendion és vizelet 17-ketoszteroid szintek miatt vizsgáltak. A mutáció azonosítását követően annak funkcionális következményeit is meghatározták, a mutáns receptor csökkent transzkripciós aktivitással és ligand kötő affinitással bír, és domináns negatív hatást gyakorol a vad típusú receptorra⁹⁴. Molekuláris modellezés alapján a 714-es aminosav pozícióban elhelyezkedő arginin→glutamin csere olyan konformáció változást okoz a receptor ligand kötő egységében, ami megtöri az AF-2 domén stabilitását, és így károsul a receptor interakciója a GRIP1 koaktivátorral⁹⁴.

A korábban publikált 2 éves leány gyermek és az általam vizsgált fiatal nőbeteg, illetve az ő klinikailag egészséges lánytestvérének fenotípusa ugyanazon mutáció hordozása ellenére jelentősen eltér, ami ismét rávilágít arra, hogy a glukokortikoid rezisztencia klinikai manifesztációja igen heterogén. Az irodalomban eddig megjelent GR génmutációkat és az általuk okozott klinikai tüneteket dolgozatomban bevezető részében, az 1. Táblázatban foglaltam össze. Mindezek alapján lehetséges, hogy ugyanaz a mutáció egyaránt enyhe, akár klinikailag jelentéktelen, illetve súlyos fokú elváltozásokhoz vezethet. További vizsgálatok rávilágíthatnának egyéb mechanizmusokra, vagy más, a patomechanizmust módosító génekre, melyek tovább árnyalhatják a betegség klinikai megjelenését.

A glukokortikoid rezisztencia terápiája nagy dózisos glukokortikoid adásából áll, melynek célja az emelkedett ACTH szint szuppressziója, ezáltal a túlzott mineralokortikoid és androgén termelés gátlása⁸⁴. A jelenleg vizsgált nőbeteg esetében azonban figyelembe kell vennünk, hogy a betegsége nem okoz mineralokortikoid és az infertilitáson túl egyéb, androgén többletre utaló klinikai tüneteket, ráadásul nem tudható, hogy a nagy dózisos glukokortikoid az infertilitás kezelése céljából is megfelelő-e, főként annak tudatában, hogy jelentős maternális és főtális rizikóval jár a terhesség során. Arról sincsenek adatok, hogy a glukokortikoid rezisztencia terápiájaként megkezdett glukokortikoid kezelés folytatható-e a terhesség alatt. Tekintettel arra, hogy az általunk detektált Arg714Glu mutáció mind enyhe, mind súlyos tünetek kialakulásához vezethet, a súlyos beteg várandós nők esetében mérlegelhető a terápia folytatása terhesség alatt is azzal a céllal, hogy a magzat ne legyen kitéve a túlzott mértékű mineralokortikoid és androgén hatásnak. Sajnos nem megjósolható, hogy az érintett magzat is hordozza-e a mutációt, és ha igen, milyen mértékű klinikai tünetek fognak nála jelentkezni. Minden

esetre a magzat prenatalis vizsgálata megfontolandó a genotípus meghatározása érdekében.

VI. Következtetések

1. A glukokortikoid receptor gén Bell. polimorfizmusát homozigóta hordozók esetében a BMI szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint a heterozigóta genotípussal rendelkezők esetében. Emellett a homozigóta hordozók hydrocortisone ekvivalensre számított napi szubsztitúciós hormondózisa szignifikánsan kisebb átlagértéket mutatott, mint a heterozigóta hordozóké vagy a vad genotípusú betegeké.
2. A GR gén N363S polimorfizmusának allélfrekvenciája szignifikánsan magasabb volt az Addison-kóros betegcsoportban, mint az egészséges kontroll csoportban.
3. Addison kóros betegcsoportban az A3669G polimorfizmust hordozók körében a betegség szignifikánsan korábbi életkorban jelentkezett, mint nem-hordozók esetében, függetlenül a többi SNP hordozói státuszától.
4. Az A3669G polimorfizmust hordozó Addison kóros betegek esetében szignifikánsan magasabb volt a diagnóziskor mérhető plazma ACTH szint a nem-hordozókhoz képest.
5. Az rs12086634 polimorfizmus szignifikáns összefüggést mutatott az éves Z-score változással a lombális régióban, hordozó Addison kóros betegekben az éves Z-score csökkenés szignifikánsan nagyobb mértékű volt, mint nem-hordozókban.
6. Az rs4844880 polimorfizmus szignifikáns hatást gyakorolt a testtömeg-indexre és a testtömeg változására Addison kór hormonpótló terápiája során. A polimorfizmust hordozókban a BMI szignifikánsan magasabb volt, mint nem-hordozók körében, a testtömeg növekedés hordozók esetében szignifikánsan nagyobb mértékű volt, mint a nem-hordozóknál. Mindezek mellett a testtömegre korrigált hormon-szubsztitúciós dózis szignifikánsan alacsonyabb volt hordozók körében a nem-hordozókkal összehasonlítva.
7. Az rs4844880 polimorfizmus pozitív hatása volt megfigyelhető az éves denzitás, T- és Z-score változás esetében a lumbális csigolya régióban. A denzitás esetében a növekedés szignifikánsan nagyobb mértékű volt hordozóknál, míg a T- és Z-score értékek hordozók esetében növekvő, nem-hordozók esetében csökkenő tendenciát mutattak

8. Az rs4844880 polimorfizmust hordozók esetében, dexamethasont nem szedők körében továbbra is szignifikánsan magasabb BMI és nagyobb testsúlygyarapodás volt megfigyelhető a nem-hordozókkal összehasonlítva, ezzel szemben a dexamethasont szedőknél ez az összefüggés nem volt megfigyelhető.
9. Az rs4844880 polimorfizmus a női betegek 50 év feletti csoportjában főként a csontsűrűsége gyakorolt jótékony hatást, míg az 50 év alattiakban a testtömeget és BMI-t befolyásoló hatása került előtérbe, és a csontsűrűséget jelző paraméterek között nem volt szignifikáns eltérés.
10. Direkt DNS szekvenálási módszer segítségével egy korábban már Nader és mtsai által publikált, R714Q mutációt azonosítottam a GR gén 8. exon régiójában, mely a klinikailag enyhe glukokortikoid rezisztenciában szenvedő, Klinikánkon infertilitás miatt vizsgált, 31 éves nőbeteg kórképének etiológiai tényezője lehet.

VII. Összefoglalás

A glukokortikoidoknak jelentős szerepe van számos betegség gyógyszeres terápiájában, hiányuk esetén, például Addison kórban, a betegeknek akár életre szóló hormonpótló terápiára lehet szükségük. Az egyénre szabott terápiát, illetve az igényelt hormonpótló kezelés dózisékat többek között genetikai tényezők is befolyásolják. A glukokortikoidok intracellulárisan elhelyezkedő receptorokhoz kötődve fejtik ki hatásukat. Az eddig leggyakrabban vizsgált GR SNP-k: N363S, BclI., ER22/23EK és A3669G, melyek esetében összefüggéseket igazoltak a csökkent vagy emelkedett glukokortikoidok iránti érzékenységgel. Vizsgálataim során igazoltam a BclI. polimorfizmus BMI-t és hormonszubsztitúciós dózis igényt befolyásoló hatását, az N363S és A3669G SNP-k lehetséges hajlamosító szerepét Addison kór esetében, illetve az A3669G polimorfizmus relatív rezisztenciát okozó hatását támasztja alá azon eredményünk, mi szerint a hordozók ACTH szintje magasabb volt a diagnóziskor.

A glukokortikoidok lokális hatását prereceptorális szinten a 11- β -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim (11HSD) modulálja. Az enzim 1-es típusa főként a kortizon kortizollá alakításáért felelős, ezáltal fokozza a GR aktivációját. A HSD11B1 génben helyet foglaló polimorfizmusok befolyásolhatják az enzim aktivitását, ezáltal a GR-hoz hozzáférhető hormon mennyiségét. Vizsgálataim során igazoltam az rs4844880 polimorfizmus BMI-t és hormonszubsztitúciós dózis igényt befolyásoló hatását, amely összefüggés a dexamethasont szedőknél azonban nem volt megfigyelhető. Emellett az SNP pozitív hatása volt megfigyelhető az éves denzitás, T- és Z-score változás esetében a lumbális csigolya régióban. Érdekeség, hogy az rs4844880 polimorfizmus az 50 év feletti női betegek esetében főként a csontsűrűsége gyakorolt jótékony hatást, míg az 50 év alattiakban a testtömeget és BMI-t befolyásoló hatása került előtérbe.

Mindezek mellett egy klinikailag Chrousos szindrómában szenvedő, infertilitás miatt vizsgált, fiatal nőbeteg panaszai háttérében egy - már korábban, Nader és munkatársai által publikált - missense, heterozigóta formában hordozott, Arg714Glu mutációt identifikáltam a GR gén 8-as exonjában. A korábban publikált 2 éves leány gyermek és az általam vizsgált fiatal nőbeteg, illetve a klinikailag egészséges lánytestvére fenotípusa ugyanazon mutáció hordozása ellenére jelentősen eltér, ami ismét rávilágít arra, hogy a glukokortikoid rezisztencia klinikai manifesztációja igen heterogén.

VIII. Summary

Glucocorticoids play an important role in the therapy of many (for example autoimmune) diseases. In case of absence of glucocorticoids, for example in Addison's disease, patients may need lifelong hormone substitution therapy. The individualized therapy and the required dose of the hormone replacement therapy is influenced by genetic factors as well. Glucocorticoids exert their action through the intracellular glucocorticoid receptor (GR). The most investigated SNPs are N363S, BclI., ER22/23EK and A3669G, since their correlations are confirmed with the increased or decreased sensitivity to glucocorticoids. During this study, the effect of the BclI. polymorphism on the BMI and the need of hormone supplementation dose was confirmed. Moreover, the possible predisposing role of the N363S and A3669G polymorphisms to Addison's disease, and the relative resistance causing role of the A3669G polymorphism, since carriers had higher plasma ACTH levels at the diagnosis than non-carriers were also revealed.

The locally available glucocorticoid level is modulated by the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD) enzymes. The 11 β -HSD1 converts cortisone to cortisol, thereby it enhance the activation of the GR. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *HSD11B1* gene influence the activity of the enzyme, thereby the accessible hormone-quantity to the GR. During this study, the effect of the rs4844880 polymorphism on the BMI and the need of hormone supplementation dose were confirmed. This association was found only in patients treated with glucocorticoids other than dexamethasone, but not in those receiving dexamethasone substitution therapy. Moreover, the rs4844880 polymorphism of the HSD11B1 gene may have a positive effect on the annual change of the bone mineral density, T- and Z-scores at the lumbar spine. It is an interesting result that in women in postmenopausal has this SNP mainly impact on the bone mineral density, while in premenopausal group, it has mainly effect on the body weight and BMI.

In addition to these, I present a 31-year-old woman who was evaluated for infertility and was diagnosed with a mild phenotype of glucocorticoid resistance caused by the pathogenic Arg714Glu mutation of the *GR* gene. The same mutation has been previously documented by Nader et al. in a child with severe disease phenotype, suggesting that the Arg714Glu mutation may lead to both severe and mild diseases.

IX. Irodalomjegyzék

1. Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ. (1984) Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr. Rev.* 5: 25–44.
2. Debono M, Ross RJ. (2013) What is the best approach to tailoring hydrocortisone dose to meet patient needs in 2012? *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 78: 659–664.
3. Purnell JQ, Brandon DD, Isabelle LM, Loriaux DL, Samuels MH. (2004) Association of 24-hour cortisol production rates, cortisol-binding globulin, and plasma-free cortisol levels with body composition, leptin levels, and aging in adult men and women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 281–287.
4. Crown A, Lightman S. (2005) Why is the management of glucocorticoid deficiency still controversial: a review of the literature. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 63: 483–492.
5. Kirschke E, Goswami D, Southworth D, Griffin PR, Agard DA. (2014) Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles. *Cell* 157: 1685–1697.
6. Dittmar KD, Banach M, Galigniana MD, Pratt WB. (1998) The role of DnaJ-like proteins in glucocorticoid receptor.hsp90 heterocomplex assembly by the reconstituted hsp90.p60.hsp70 foldosome complex. *J. Biol. Chem.* 273: 7358–7366.
7. Koper JW, van Rossum EFC, van den Akker ELT. (2014) Glucocorticoid receptor polymorphisms and haplotypes and their expression in health and disease. *Steroids* 92: 62–73.
8. Maltese P, Canestrari E, Palma L, Ruzzo A, Corini F, Menotta M, Andreoni F, Latiano A, Annese V, Magnani M. (2009) High resolution melting (HRM) analysis for the detection of ER22/23EK, BclI, and N363S polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 113: 269–274.
9. Schaaf MJM, Cidlowski JA. (2003) Molecular determinants of glucocorticoid receptor mobility in living cells: the importance of ligand affinity. *Mol. Cell. Biol.*

23: 1922–1934.

10. Bledsoe RK, Montana VG, Stanley TB, Delves CJ, Apolito CJ, McKee DD, Consler TG, Parks DJ, Stewart EL, Willson TM, Lambert MH, Moore JT, Pearce KH, Xu HE. (2002) Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell* 110: 93–105.
11. Newton R. (2000) Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax* 55: 603–613.
12. Gyires K, Fürst Z. *A farmakológia alapjai. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2011.*
13. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318: 635–641.
14. Encío IJ, Detera-Wadleigh SD. (1991) The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 266: 7182–7188.
15. Zhou J, Cidlowski J a. (2005) The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* 70: 407–417.
16. Chrousos GP, Kino T. (2005) Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic. *Sci. STKE* 2005: pe48.
17. Gross KL, Cidlowski J a. (2008) Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends Endocrinol. Metab.* 19: 331–339.
18. DeRijk RH, Schaaf M, de Kloet ER. (2002) Glucocorticoid receptor variants: clinical implications. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 81: 103–122.
19. Yudt MR, Cidlowski JA. (2001) Molecular identification and characterization of a and b forms of the glucocorticoid receptor. *Mol. Endocrinol.* 15: 1093–1103.
20. Ebrecht M, Buske-Kirschbaum A, Hellhammer D, Kern S, Rohleder N, Walker B, Kirschbaum C. (2000) Tissue specificity of glucocorticoid sensitivity in healthy adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85: 3733–3739.
21. Auboeuf D, Hönig A, Berget SM, O'Malley BW. (2002) Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators. *Science* 298: 416–419.

22. Hong H, Kohli K, Garabedian MJ, Stallcup MR. (1997) GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors. *Mol. Cell. Biol.* 17: 2735–2744.
23. Bray PJ, Cotton RGH. (2003) Variations of the human glucocorticoid receptor gene (NR3C1): pathological and in vitro mutations and polymorphisms. *Hum. Mutat.* 21: 557–568.
24. Manenschijn L, van den Akker ELT, Lamberts SWJ, van Rossum EFC. (2009) Clinical features associated with glucocorticoid receptor polymorphisms. An overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1179: 179–198.
25. Murray JC, Smith RF, Ardinger HA, Weinberger C. (1987) RFLP for the glucocorticoid receptor (GRL) located at 5q11-5q13. *Nucleic Acids Res.* 15: 6765.
26. van Rossum EFC, Koper JW, van den Beld AW, Uitterlinden AG, Arp P, Ester W, Janssen JAMJL, Brinkmann AO, de Jong FH, Grobbee DE, Pols HAP, Lamberts SWJ. (2003) Identification of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 59: 585–592.
27. Boyle B, Korányi K, Patocs A, Liko I, Szappanos A, Bertalan R, Racz K, Balazs C. (2008) Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene in Graves ophthalmopathy. *Br. J. Ophthalmol.* 92: 131–134.
28. Koper JW, Stolk RP, de Lange P, Huizenga NA, Molijn GJ, Pols HA, Grobbee DE, Karl M, de Jong FH, Brinkmann AO, Lamberts SW. (1997) Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance. *Hum. Genet.* 99: 663–668.
29. Marti A, Ochoa MC, Sánchez-Villegas A, Martínez JA, Martínez-González MA, Hebebrand J, Hinney A, Vedder H. (2006) Meta-analysis on the effect of the N363S polymorphism of the glucocorticoid receptor gene (GRL) on human obesity. *BMC Med. Genet.* 7: 50.
30. Damjanovic SS, Antic J a, Ilic BB, Cokic BB, Ivovic M, Ognjanovic SI, Isailovic T V, Popovic BM, Bozic IB, Tatic S, Matic G, Todorovic VN, Paunovic I. (2012) Glucocorticoid receptor and molecular chaperones in the pathogenesis of adrenal

- incidentalomas: potential role of reduced sensitivity to glucocorticoids. *Mol. Med.* 18: 1456–1465.
31. Schaaf MJM, Cidlowski J a. (2002) AUUUA motifs in the 3'UTR of human glucocorticoid receptor alpha and beta mRNA destabilize mRNA and decrease receptor protein expression. *Steroids* 67: 627–636.
 32. Derijk RH, Schaaf MJ, Turner G, Datson NA, Vreugdenhil E, Cidlowski J, de Kloet ER, Emery P, Sternberg EM, Detera-Wadleigh SD. (2001) A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 28: 2383–2388.
 33. Oakley RH, Sar M, Cidlowski JA. (1996) The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. *J. Biol. Chem.* 271: 9550–9559.
 34. van den Akker ELT, Koper JW, van Rossum EFC, Dekker MJH, Russcher H, de Jong FH, Uitterlinden AG, Hofman A, Pols HA, Witteman JCM, Lamberts SWJ. (2008) Glucocorticoid receptor gene and risk of cardiovascular disease. *Arch. Intern. Med.* 168: 33–39.
 35. Lin RCY, Wang XL, Morris BJ. (2003) Association of coronary artery disease with glucocorticoid receptor N363S variant. *Hypertension* 41: 404–407.
 36. Di Blasio AM, Van Rossum EFC, Maestrini S, Berselli ME, Tagliaferri M, Podestà F, Koper JW, Liuzzi A, Lamberts SWJ. (2003) The relation between two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and body mass index, blood pressure and cholesterol in obese patients. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 59: 68–74.
 37. Cercato C, Halpern A, Frazzatto EST, Guazzelli C, Mara S, Villares F. (2009) glucocorticoid receptor gene : 288–292.
 38. Giordano R, Marzotti S, Berardelli R, Karamouzis I, Brozzetti A, D'Angelo V, Mengozzi G, Mandrile G, Giachino D, Migliaretti G, Bini V, Falorni A, Ghigo E, Arvat E. (2012) BCII polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated with increased obesity, impaired glucose metabolism and dyslipidaemia in patients with Addison's disease. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 77: 863–870.

39. Moreira RPP, Bachega T a SS, Machado MC, Mendonca BB, Bronstein MD, Villares Fragoso MCB. (2013) Modulatory effect of BclII GR gene polymorphisms on the obesity phenotype in Brazilian patients with Cushing's disease. *Clinics (Sao Paulo)*. 68: 579–585.
40. Trementino L, Appolloni G, Concettoni C, Cardinaletti M, Boscaro M, Arnaldi G. (2012) Association of glucocorticoid receptor polymorphism A3669G with decreased risk of developing diabetes in patients with Cushing's syndrome. *Eur. J. Endocrinol.* 166: 35–42.
41. Yan Y-X, Dong J, Wu L-J, Shao S, Zhang J, Zhang L, Wang W, He Y, Liu Y-Q. (2013) Associations between polymorphisms in the glucocorticoid-receptor gene and cardiovascular risk factors in a Chinese population. *J. Epidemiol.* 23: 389–395.
42. Koeijvoets KCMC, van der Net JB, van Rossum EFC, Steyerberg EW, Defesche JC, Kastelein JJP, Lamberts SWJ, Sijbrands EJG. (2008) Two common haplotypes of the glucocorticoid receptor gene are associated with increased susceptibility to cardiovascular disease in men with familial hypercholesterolemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93: 4902–4908.
43. Otte C, Wüst S, Zhao S, Pawlikowska L, Kwok P-Y, Whooley MA. (2010) Glucocorticoid receptor gene, low-grade inflammation, and heart failure: the Heart and Soul study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95: 2885–2891.
44. Ross IL, Dandara C, Swart M, Lacerda M, Schatz D, Blom DJ. (2014) 9 β Polymorphism of the glucocorticoid receptor gene appears to have limited impact in patients with Addison's disease. *PLoS One* 9: e86350.
45. van Schoor NM, Dennison E, Lips P, Uitterlinden AG, Cooper C. (2007) Serum fasting cortisol in relation to bone, and the role of genetic variations in the glucocorticoid receptor. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 67: 871–878.
46. Rosmond R, Bouchard C, Björntorp P. (2001) Tsp509I polymorphism in exon 2 of the glucocorticoid receptor gene in relation to obesity and cortisol secretion: cohort study. *BMJ* 322: 652–653.
47. Huizenga NA, Koper JW, De Lange P, Pols HA, Stolk RP, Burger H, Grobbee DE, Brinkmann AO, De Jong FH, Lamberts SW. (1998) A polymorphism in the

- glucocorticoid receptor gene may be associated with and increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 144–151.
48. van Rossum EFC, Koper JW, Huizenga NATM, Uitterlinden AG, Janssen JAMJL, Brinkmann AO, Grobbee DE, de Jong FH, van Duyn CM, Pols HAP, Lamberts SWJ. (2002) A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes* 51: 3128–3134.
 49. Szappanos A, Patócs A, Tőke J, Boyle B, Sereg M, Majnik J, Borgulya G, Varga I, Likó I, Rácz K, Tóth M. (2009) BclI polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated with decreased bone mineral density in patients with endogenous hypercortisolism. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 71: 636–643.
 50. Koetz KR, van Rossum EFC, Ventz M, Diederich S, Quinkler M. (2013) BclI polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated with increased bone resorption in patients on glucocorticoid replacement therapy. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 78: 831–837.
 51. Fichna M, Zurawek M, Fichna P, Gryczynska M, Nowak J, Ruchala M. (2012) Increased serum osteoprotegerin in patients with primary adrenal insufficiency receiving conventional hydrocortisone substitution. *J. Physiol. Pharmacol.* 63: 677–682.
 52. van Oosten MJM, Dolhain RJEM, Koper JW, van Rossum EFC, Emonts M, Han KH, Wouters JMGW, Hazes JMW, Lamberts SWJ, Feelders RA. (2010) Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene that modulate glucocorticoid sensitivity are associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 12: R159.
 53. van Winsen LML, Manenschijn L, van Rossum EFC, Crusius JBA, Crusius BA, Koper JW, Polman CH, Uitdehaag BMJ. (2009) A glucocorticoid receptor gene haplotype (TthIII1/ER22/23EK/9beta) is associated with a more aggressive disease course in multiple sclerosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94: 2110–2114.
 54. Nagy Z, Acs B, Butz H, Feldman K, Marta A, Szabo PM, Baghy K, Pazmany T, Racz K, Liko I, Patocs A. (2016) Overexpression of GR β in colonic mucosal cell line partly reflects altered gene expression in colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 155: 76–84.

55. El-Hage W, Phillips ML, Radua J, Gohier B, Zelaya FO, Collier DA, Surguladze SA. (2013) Genetic modulation of neural response during working memory in healthy individuals: interaction of glucocorticoid receptor and dopaminergic genes. *Mol. Psychiatry* 18: 174–182.
56. Szczepankiewicz A, Rybakowski JK, Suwalska A, Hauser J. (2011) Glucocorticoid receptor polymorphism is associated with lithium response in bipolar patients. *Neuro Endocrinol. Lett.* 32: 545–551.
57. Hauer D, Weis F, Papassotiropoulos A, Schmoeckel M, Beiras-Fernandez A, Lieke J, Kaufmann I, Kirchhoff F, Vogeser M, Roozendaal B, Briegel J, de Quervain D, Schelling G. (2011) Relationship of a common polymorphism of the glucocorticoid receptor gene to traumatic memories and posttraumatic stress disorder in patients after intensive care therapy. *Crit. Care Med.* 39: 643–650.
58. Van Rossum EFC, Binder EB, Majer M, Koper JW, Ising M, Modell S, Salyakina D, Lamberts SWJ, Holsboer F. (2006) Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene and major depression. *Biol. Psychiatry* 59: 681–688.
59. Krishnamurthy P, Romagni P, Torvik S, Gold PW, Charney DS, Detera-Wadleigh S, Cizza G. (2008) Glucocorticoid receptor gene polymorphisms in premenopausal women with major depression. *Horm. Metab. Res. = Horm. und Stoffwechselforsch. = Horm. métabolisme* 40: 194–198.
60. Cellini E, Castellini G, Ricca V, Bagnoli S, Tedde A, Rotella CM, Faravelli C, Sorbi S, Nacmias B. (2010) Glucocorticoid receptor gene polymorphisms in Italian patients with eating disorders and obesity. *Psychiatr. Genet.* 20: 282–288.
61. Bet PM, Penninx BWJH, Bochdanovits Z, Uitterlinden AG, Beekman ATF, van Schoor NM, Deeg DJH, Hoogendijk WJG. (2009) Glucocorticoid receptor gene polymorphisms and childhood adversity are associated with depression: New evidence for a gene-environment interaction. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 150B: 660–669.
62. Spijker AT, van Rossum EFC, Hoencamp E, DeRijk RH, Haffmans J, Blom M, Manenschijn L, Koper JW, Lamberts SW, Zitman FG. (2009) Functional polymorphism of the glucocorticoid receptor gene associates with mania and hypomania in bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 11: 95–101.

63. Tang JI, Seckl JR, Nyirenda MJ. (2011) Prenatal glucocorticoid overexposure causes permanent increases in renal erythropoietin expression and red blood cell mass in the rat offspring. *Endocrinology* 152: 2716–2721.
64. Varricchio L, Tirelli V, Masselli E, Ghinassi B, Saha N, Besmer P, Migliaccio AR. (2012) The expression of the glucocorticoid receptor in human erythroblasts is uniquely regulated by KIT ligand: implications for stress erythropoiesis. *Stem Cells Dev.* 21: 2852–2865.
65. Varricchio L, Masselli E, Alfani E, Battistini A, Migliaccio G, Vannucchi AM, Zhang W, Rondelli D, Godbold J, Ghinassi B, Whitsett C, Hoffman R, Migliaccio AR. (2011) The dominant negative β isoform of the glucocorticoid receptor is uniquely expressed in erythroid cells expanded from polycythemia vera patients. *Blood* 118: 425–436.
66. Majnik J, Patocs A, Balogh K, Toth M, Gergics P, Szappanos A, Mondok A, Borgulya G, Panczel P, Prohaszka Z, Racz K. (2006) Overrepresentation of the N363S variant of the glucocorticoid receptor gene in patients with bilateral adrenal incidentalomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91: 2796–2799.
67. Majnik J, Patócs A, Balogh K, Luczay A, Török D, Szabó V, Borgulya G, Gergics P, Szappanos A, Bertalan R, Belema B, Toke J, Sereg M, Nagy ZZ, Sólyom J, Tóth M, Gláz E, Rác K, Németh J, Fekete G, Tulassay Z. (2006) [Nucleotide sequence variants of the glucocorticoid receptor gene and their significance in determining glucocorticoid sensitivity]. *Orv. Hetil.* 147: 2107–2115.
68. Boyle B, Butz H, Liko I, Zalatnai A, Toth M, Feldman K, Horanyi J, Igaz P, Racz K, Patocs A. (2010) Expression of glucocorticoid receptor isoforms in human adrenocortical adenomas. *Steroids* 75: 695–700.
69. Valkenburg O, Uitterlinden a G, Themmen a P, de Jong FH, Hofman A, Fauser BCJM, Laven JSE. (2011) Genetic polymorphisms of the glucocorticoid receptor may affect the phenotype of women with anovulatory polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod.* 26: 2902–2911.
70. van den Akker ELT, Nouwen JL, Melles DC, van Rossum EFC, Koper JW, Uitterlinden AG, Hofman A, Verbrugh H a, Pols H a, Lamberts SWJ, van Belkum A. (2006) *Staphylococcus aureus* nasal carriage is associated with glucocorticoid

- receptor gene polymorphisms. *J. Infect. Dis.* 194: 814–818.
71. Ross IL, Levitt NS, Van der Merwe L, Schatz DA, Johannsson G, Dandara C, Pillay TS, Blom DJ. (2013) Investigation of glucocorticoid receptor polymorphisms in relation to metabolic parameters in Addison's disease. *Eur. J. Endocrinol.* 168: 403–412.
 72. De Iudicibus S, Stocco G, Martelossi S, Londero M, Ebner E, Pontillo A, Lionetti P, Barabino A, Bartoli F, Ventura A, Decorti G. (2011) Genetic predictors of glucocorticoid response in pediatric patients with inflammatory bowel diseases. *J. Clin. Gastroenterol.* 45: e1-7.
 73. Chen H-L, Li L-R. (2012) Glucocorticoid receptor gene polymorphisms and glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Dig. Dis. Sci.* 57: 3065–3075.
 74. Mwinyi J, Wenger C, Eloranta JJ, Kullak-Ublick GA. (2010) Glucocorticoid receptor gene haplotype structure and steroid therapy outcome in IBD patients. *World J. Gastroenterol.* 16: 3888–3896.
 75. Eipel OT, Németh K, Török D, Csordás K, Hegyi M, Ponyi A, Ferenczy A, Erdélyi DJ, Csóka M, Kovács GT. (2013) The glucocorticoid receptor gene polymorphism N363S predisposes to more severe toxic side effects during pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) therapy. *Int. J. Hematol.* 97: 216–222.
 76. Panek M, Pietras T, Antczak A, Fabijan A, Przemęcka M, Górski P, Kuna P, Szemraj J. (2012) The N363S and I559N single nucleotide polymorphisms of the h-GR/NR3C1 gene in patients with bronchial asthma. *Int. J. Mol. Med.* 30: 142–150.
 77. Vannucchi G, Covelli D, Campi I, Origo D, Curro N, Cirello V, Dazzi D, Beck-Peccoz P, Salvi M. (2013) The therapeutic outcome of intravenous steroid therapy for active Graves' orbitopathy is influenced by the time of response but not polymorphisms of the glucocorticoid receptor. *Eur. J. Endocrinol.* 170: 55–61.
 78. Chrousos GP, Vingerhoeds A, Brandon D, Eil C, Pugeat M, DeVroede M, Loriaux DL, Lipsett MB. (1982) Primary cortisol resistance in man. A glucocorticoid receptor-mediated disease. *J. Clin. Invest.* 69: 1261–1269.

79. Chrousos GP, Detera-Wadleigh SD, Karl M. (1993) Syndromes of glucocorticoid resistance. *Ann. Intern. Med.* 119: 1113–1124.
80. Ruiz M, Lind U, Gåfvvels M, Eggertsen G, Carlstedt-Duke J, Nilsson L, Holtmann M, Stierna P, Wikström AC, Werner S. (2001) Characterization of two novel mutations in the glucocorticoid receptor gene in patients with primary cortisol resistance. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 55: 363–371.
81. Vottero A, Kino T, Combe H, Lecomte P, Chrousos GP. (2002) A novel, C-terminal dominant negative mutation of the GR causes familial glucocorticoid resistance through abnormal interactions with p160 steroid receptor coactivators. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 2658–2667.
82. Charmandari E, Kino T, Ichijo T, Chrousos GP. (2008) Generalized glucocorticoid resistance: clinical aspects, molecular mechanisms, and implications of a rare genetic disorder. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93: 1563–1572.
83. Kino T, Vottero A, Charmandari E, Chrousos GP. (2002) Familial/sporadic glucocorticoid resistance syndrome and hypertension. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 970: 101–111.
84. Charmandari E, Kino T, Chrousos GP. (2004) Familial/sporadic glucocorticoid resistance: clinical phenotype and molecular mechanisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1024: 168–181.
85. Karl M, Lamberts SW, Koper JW, Katz DA, Huizenga NE, Kino T, Haddad BR, Hughes MR, Chrousos GP. (1996) Cushing's disease preceded by generalized glucocorticoid resistance: clinical consequences of a novel, dominant-negative glucocorticoid receptor mutation. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 108: 296–307.
86. Brönnegård M, Werner S, Gustafsson JA. (1986) Primary cortisol resistance associated with a thermolabile glucocorticoid receptor in a patient with fatigue as the only symptom. *J. Clin. Invest.* 78: 1270–1278.
87. Karl M, Lamberts SW, Detera-Wadleigh SD, Encio IJ, Stratakis CA, Hurley DM, Accili D, Chrousos GP. (1993) Familial glucocorticoid resistance caused by a splice site deletion in the human glucocorticoid receptor gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76: 683–689.

88. Malchoff DM, Brufsky A, Reardon G, McDermott P, Javier EC, Bergh CH, Rowe D, Malchoff CD. (1993) A mutation of the glucocorticoid receptor in primary cortisol resistance. *J. Clin. Invest.* 91: 1918–1925.
89. Kino T, Stauber RH, Resau JH, Pavlakis GN, Chrousos GP. (2001) Pathologic human GR mutant has a transdominant negative effect on the wild-type GR by inhibiting its translocation into the nucleus: importance of the ligand-binding domain for intracellular GR trafficking. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 5600–5608.
90. Mendonca BB, Leite M V, de Castro M, Kino T, Elias LLK, Bachega TAS, Arnhold IJP, Chrousos GP, Latronico AC. (2002) Female pseudohermaphroditism caused by a novel homozygous missense mutation of the GR gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 1805–1809.
91. Charmandari E, Raji A, Kino T, Ichijo T, Tiulpakov A, Zachman K, Chrousos GP. (2005) A novel point mutation in the ligand-binding domain (LBD) of the human glucocorticoid receptor (hGR) causing generalized glucocorticoid resistance: the importance of the C terminus of hGR LBD in conferring transactivational activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90: 3696–3705.
92. Charmandari E, Kino T, Ichijo T, Jubiz W, Mejia L, Zachman K, Chrousos GP. (2007) A novel point mutation in helix 11 of the ligand-binding domain of the human glucocorticoid receptor gene causing generalized glucocorticoid resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92: 3986–3990.
93. Raef H, Baitei EY, Zou M, Shi Y. (2008) Genotype-phenotype correlation in a family with primary cortisol resistance: possible modulating effect of the ER22/23EK polymorphism. *Eur. J. Endocrinol.* 158: 577–582.
94. Nader N, Bachrach BE, Hurt DE, Gajula S, Pittman A, Lescher R, Kino T. (2010) A novel point mutation in helix 10 of the human glucocorticoid receptor causes generalized glucocorticoid resistance by disrupting the structure of the ligand-binding domain. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95: 2281–2285.
95. McMahon SK, Pretorius CJ, Ungerer JPJ, Salmon NJ, Conwell LS, Pearen MA, Batch JA. (2010) Neonatal complete generalized glucocorticoid resistance and growth hormone deficiency caused by a novel homozygous mutation in helix 12

- of the ligand binding domain of the glucocorticoid receptor gene (NR3C1). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95: 297–302.
96. Trebble P, Matthews L, Blaikley J, Wayte AWO, Black GCM, Wilton A, Ray DW. (2010) Familial glucocorticoid resistance caused by a novel frameshift glucocorticoid receptor mutation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95: 490–499.
 97. Hurley DM, Accili D, Stratakis CA, Karl M, Vamvakopoulos N, Rorer E, Constantine K, Taylor SI, Chrousos GP. (1991) Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance. *J. Clin. Invest.* 87: 680–686.
 98. Charmandari E, Kino T, Souvatzoglou E, Vottero A, Bhattacharyya N, Chrousos GP. (2004) Natural glucocorticoid receptor mutants causing generalized glucocorticoid resistance: molecular genotype, genetic transmission, and clinical phenotype. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 1939–1949.
 99. Charmandari E, Kino T, Ichijo T, Zachman K, Alatsatianos A, Chrousos GP. (2006) Functional characterization of the natural human glucocorticoid receptor (hGR) mutants hGRalphaR477H and hGRalphaG679S associated with generalized glucocorticoid resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91: 1535–1543.
 100. Zhang S, Liang X, Danielsen M. (1996) Role of the C terminus of the glucocorticoid receptor in hormone binding and agonist/antagonist discrimination. *Mol. Endocrinol.* 10: 24–34.
 101. Ding XF, Anderson CM, Ma H, Hong H, Uht RM, Kushner PJ, Stallcup MR. (1998) Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC-1): multiple motifs with different binding specificities. *Mol. Endocrinol.* 12: 302–313.
 102. Kucka M, Vagnerová K, Klusonová P, Miksík I, Pácha J. (2006) Corticosterone metabolism in chicken tissues: evidence for tissue-specific distribution of steroid dehydrogenases. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147: 377–383.
 103. OSINSKI PA. (1960) Steroid 11beta-ol dehydrogenase in human placenta. *Nature* 187: 777.
 104. Agarwal AK, Monder C, Eckstein B, White PC. (1989) Cloning and expression of

- rat cDNA encoding corticosteroid 11 beta-dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 264: 18939–18943.
105. Stewart PM, Krozowski ZS. (1999) 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam. Horm.* 57: 249–324.
 106. White PC, Rogoff D, McMillan DR. (2008) Physiological roles of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase. *Curr. Opin. Pediatr.* 20: 453–457.
 107. Ozols J. (1995) Luminal orientation and post-translational modifications of the liver microsomal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 270: 2305–2312.
 108. Grundy WN, Bailey TL, Elkan CP, Baker ME. (1997) Hidden Markov model analysis of motifs in steroid dehydrogenases and their homologs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231: 760–766.
 109. Maser E, Völker B, Friebertshäuser J. (2002) 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: dimerization and enzyme cooperativity support its postulated role as glucocorticoid reductase. *Biochemistry* 41: 2459–2465.
 110. Atanasov AG, Odermatt A. (2007) Readjusting the glucocorticoid balance: an opportunity for modulators of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity? *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 7: 125–140.
 111. Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, Draper N, Lavery GG, Cooper MS, Hewison M, Stewart PM. (2004) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocr. Rev.* 25: 831–866.
 112. Walker BR, Andrew R. (2006) Tissue production of cortisol by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and metabolic disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1083: 165–184.
 113. Anagnostis P, Athyros VG, Tziomalos K, Karagiannis A, Mikhailidis DP. (2009) Clinical review: The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94: 2692–2701.
 114. Rask E, Walker BR, Söderberg S, Livingstone DEW, Eliasson M, Johnson O,

- Andrew R, Olsson T. (2002) Tissue-specific changes in peripheral cortisol metabolism in obese women: increased adipose 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 3330–3336.
115. Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS. (2001) A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 294: 2166–2170.
116. Gambineri A, Fanelli F, Tomassoni F, Munarini A, Pagotto U, Andrew R, Walker BR, Pasquali R. (2014) Tissue-specific dysregulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in overweight/obese women with polycystic ovary syndrome compared with weight-matched controls. *Eur. J. Endocrinol.* 171: 47–57.
117. Pierotti S, Gandini L, Lenzi A, Isidori AM. (2008) Pre-receptorial regulation of steroid hormones in bone cells: insights on glucocorticoid-induced osteoporosis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 108: 292–299.
118. Ergang P, Leden P, Vagnerová K, Klusonová P, Miksík I, Jurcovicová J, Kment M, Pácha J. (2010) Local metabolism of glucocorticoids and its role in rat adjuvant arthritis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 323: 155–160.
119. Walker BR, Connacher AA, Lindsay RM, Webb DJ, Edwards CR. (1995) Carbenoxolone increases hepatic insulin sensitivity in man: a novel role for 11-oxosteroid reductase in enhancing glucocorticoid receptor activation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 3155–3159.
120. Rosenstock J, Banarer S, Fonseca VA, Inzucchi SE, Sun W, Yao W, Hollis G, Flores R, Levy R, Williams W V, Seckl JR, Huber R, INCB13739-202 Principal Investigators. (2010) The 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor INCB13739 improves hyperglycemia in patients with type 2 diabetes inadequately controlled by metformin monotherapy. *Diabetes Care* 33: 1516–1522.
121. Tannin GM, Agarwal AK, Monder C, New MI, White PC. (1991) The human gene for 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization. *J. Biol. Chem.* 266: 16653–16658.
122. Wake DJ, Walker BR. (2006) Inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase

- type 1 in obesity. *Endocrine* 29: 101–108.
123. Dujic T, Bego T, Mlinar B, Semiz S, Malenica M, Prnjavorac B, Ostanek B, Marc J, Causevic A. (2012) Association between 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene polymorphisms and metabolic syndrome in Bosnian population. *Biochem. medica* 22: 76–85.
 124. Gelernter-Yaniv L, Feng N, Sebring NG, Hochberg Z, Yanovski JA. (2003) Associations between a polymorphism in the 11 beta hydroxysteroid dehydrogenase type I gene and body composition. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27: 983–986.
 125. Gandhi K, Adhikari P, Basu A, Achappa B. (2013) Association between a 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene polymorphism and metabolic syndrome in a South Indian population. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 11: 397–402.
 126. Olza J, Gil-Campos M, Leis R, Rupérez AI, Tojo R, Cañete R, Gil A, Aguilera CM. (2012) A gene variant of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is associated with obesity in children. *Int. J. Obes. (Lond).* 36: 1558–1563.
 127. Turek LV, Leite N, Rodrigues Souza RL, Lima JK, Milano GE, Timossi L da S, Osiecki ACV, Osiecki R, Alle LF. (2014) Gender-dependent association of HSD11B1 single nucleotide polymorphisms with glucose and HDL-C levels. *Genet. Mol. Biol.* 37: 490–495.
 128. Siggelkow H, Etmanski M, Bozkurt S, Groß P, Koepp R, Brockmüller J, Tzvetkov M V. (2014) Genetic polymorphisms in 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 correlate with the postdexamethasone cortisol levels and bone mineral density in patients evaluated for osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99: E293-302.
 129. Hwang J-Y, Lee SH, Kim GS, Koh J-M, Go MJ, Kim Y-J, Kim H-C, Kim T-H, Hong JM, Park EK, Lee J-Y, Kim S-Y. (2009) HSD11B1 polymorphisms predicted bone mineral density and fracture risk in postmenopausal women without a clinically apparent hypercortisolemia. *Bone* 45: 1098–1103.
 130. Shimodaira M, Nakayama T, Sato I, Sato N, Izawa N, Mizutani Y, Furuya K, Yamamoto T. (2013) Glucocorticoid synthesis-related genes: HSD11B1 and HSD11B2 in hypertensive disorders in pregnancy. *Gynecol. Endocrinol.* 29: 657–

661.

131. Deary IJ, Hayward C, Permana PA, Nair S, Whalley LJ, Starr JM, Chapman KE, Walker BR, Seckl JR. (2006) Polymorphisms in the gene encoding 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (HSD11B1) and lifetime cognitive change. *Neurosci. Lett.* 393: 74–77.
132. Dekker MJHJ, Tiemeier H, Luijendijk HJ, Kuningas M, Hofman A, de Jong FH, Stewart PM, Koper JW, Lamberts SWJ. (2012) The effect of common genetic variation in 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and incident depression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97: E233-237.
133. Szappanos A, Patócs A, Gergics P, Bertalan R, Kerti A, Acs B, Feldmann K, Rácz K, Tóth M. (2011) The 83,557insA variant of the gene coding 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 enzyme associates with serum osteocalcin in patients with endogenous Cushing's syndrome. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 123: 79–84.
134. Nair S, Lee YH, Lindsay RS, Walker BR, Tataranni PA, Bogardus C, Baier LJ, Permana PA. (2004) 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase Type 1: genetic polymorphisms are associated with Type 2 diabetes in Pima Indians independently of obesity and expression in adipocyte and muscle. *Diabetologia* 47: 1088–1095.
135. Gambineri A, Vicennati V, Genghini S, Tomassoni F, Pagotto U, Pasquali R, Walker BR. (2006) Genetic variation in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 predicts adrenal hyperandrogenism among lean women with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91: 2295–2302.
136. Feldman K, Szappanos A, Butz H, Grolmusz V, Majnik J, Likó I, Kriszt B, Lakatos P, Tóth M, Rácz K, Patócs A. (2012) The rs4844880 polymorphism in the promoter region of the HSD11B1 gene associates with bone mineral density in healthy and postmenopausal osteoporotic women. *Steroids* 77: 1345–1351.
137. Grolmusz VK, Acs OD, Feldman-Kovács K, Szappanos Á, Stenczer B, Fekete T, Szendei G, Reismann P, Rácz K, Patócs A. (2014) Genetic variants of the HSD11B1 gene promoter may be protective against polycystic ovary syndrome. *Mol. Biol. Rep.* 41: 5961–5969.

138. Arlt W, Allolio B. (2003) Adrenal insufficiency. *Lancet* 361: 1881–1893.
139. Willis AC, Vince FP. (1997) The prevalence of Addison's disease in Coventry, UK. *Postgrad. Med. J.* 73: 286–288.
140. Laureti S, Vecchi L, Santeusanio F, Falorni A. (1999) Is the prevalence of Addison's disease underestimated? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84: 1762.
141. Nerup J. (1974) Addison's disease--clinical studies. A report fo 108 cases. *Acta Endocrinol. (Copenh).* 76: 127–141.
142. Løvås K, Husebye ES. (2002) High prevalence and increasing incidence of Addison's disease in western Norway. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 56: 787–791.
143. Tulassay Z. *A belgyógyászat alapjai 1-2.* Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2011.
144. Benson S, Neumann P, Unger N, Schedlowski M, Mann K, Elsenbruch S, Petersenn S. (2012) Effects of standard glucocorticoid replacement therapies on subjective well-being: a randomized, double-blind, crossover study in patients with secondary adrenal insufficiency. *Eur. J. Endocrinol.* 167: 679–685.
145. Forss M, Batcheller G, Skrtic S, Johannsson G. (2012) Current practice of glucocorticoid replacement therapy and patient-perceived health outcomes in adrenal insufficiency - a worldwide patient survey. *BMC Endocr. Disord.* 12: 8.
146. Roussel R, Reis AF, Dubois-Laforgue D, Bellanné-Chantelot C, Timsit J, Velho G. (2003) The N363S polymorphism in the glucocorticoid receptor gene is associated with overweight in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 59: 237–241.
147. Bleicken B, Hahner S, Loeffler M, Ventz M, Decker O, Allolio B, Quinkler M. (2010) Influence of hydrocortisone dosage scheme on health-related quality of life in patients with adrenal insufficiency. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 72: 297–304.
148. Behan L-A, Kelleher G, Hannon MJ, Brady JJ, Rogers B, Tormey W, Smith D, Thompson CJ, McKenna MJ, Agha A. (2014) Low-dose hydrocortisone replacement therapy is associated with improved bone remodelling balance in hypopituitary male patients. *Eur. J. Endocrinol.* 170: 141–150.
149. Mah PM, Jenkins RC, Rostami-Hodjegan A, Newell-Price J, Doane A, Ibbotson V, Tucker GT, Ross RJ. (2004) Weight-related dosing, timing and monitoring

- hydrocortisone replacement therapy in patients with adrenal insufficiency. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 61: 367–375.
150. Esteban N V, Loughlin T, Yergey AL, Zawadzki JK, Booth JD, Winterer JC, Loriaux DL. (1991) Daily cortisol production rate in man determined by stable isotope dilution/mass spectrometry. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 72: 39–45.
 151. Kerrigan JR, Veldhuis JD, Leyo SA, Iranmanesh A, Rogol AD. (1993) Estimation of daily cortisol production and clearance rates in normal pubertal males by deconvolution analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76: 1505–1510.
 152. Quinkler M, Hahner S. (2012) What is the best long-term management strategy for patients with primary adrenal insufficiency? *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 76: 21–25.
 153. Johannsson G, Nilsson AG, Bergthorsdottir R, Burman P, Dahlqvist P, Ekman B, Engström BE, Olsson T, Ragnarsson O, Ryberg M, Wahlberg J, Biller BMK, Monson JP, Stewart PM, Lennernäs H, Skrtic S. (2012) Improved cortisol exposure-time profile and outcome in patients with adrenal insufficiency: a prospective randomized trial of a novel hydrocortisone dual-release formulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97: 473–481.
 154. Newell-Price J, Whiteman M, Rostami-Hodjegan A, Darzy K, Shalet S, Tucker GT, Ross RJM. (2008) Modified-release hydrocortisone for circadian therapy: a proof-of-principle study in dexamethasone-suppressed normal volunteers. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 68: 130–135.
 155. Debono M, Ghobadi C, Rostami-Hodjegan A, Huatan H, Campbell MJ, Newell-Price J, Darzy K, Merke DP, Arlt W, Ross RJ. (2009) Modified-release hydrocortisone to provide circadian cortisol profiles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94: 1548–1554.
 156. Mallappa A, Sinaii N, Kumar P, Whitaker MJ, Daley L-A, Digweed D, Eckland DJA, Van Ryzin C, Nieman LK, Arlt W, Ross RJ, Merke DP. (2015) A phase 2 study of Chronocort, a modified-release formulation of hydrocortisone, in the treatment of adults with classic congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100: 1137–1145.
 157. Langenheim J, Ventz M, Hinz A, Quinkler M. (2013) Modified-release prednisone

- decreases complaints and fatigue compared to standard prednisolone in patients with adrenal insufficiency. *Horm. Metab. Res.* 45: 96–101.
158. Johannsson G, Bergthorsdottir R, Nilsson AG, Lennernas H, Hedner T, Skrtic S. (2009) Improving glucocorticoid replacement therapy using a novel modified-release hydrocortisone tablet: a pharmacokinetic study. *Eur. J. Endocrinol.* 161: 119–130.
 159. Løvås K, Husebye ES. (2007) Continuous subcutaneous hydrocortisone infusion in Addison's disease. *Eur. J. Endocrinol.* 157: 109–112.
 160. Gagliardi L, Nenke MA, Thynne TR, von der Borch J, Rankin WA, Henley DE, Sorbello J, Inder WJ, Torpy DJ. (2014) Continuous subcutaneous hydrocortisone infusion therapy in Addison's disease: a randomised, placebo-controlled clinical trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* jc20142433. doi:10.1210/jc.2014-2433
 161. Pearce SHS, Mitchell AL, Bennett S, King P, Chandran S, Nag S, Chen S, Smith BR, Isaacs JD, Vaidya B. (2012) Adrenal steroidogenesis after B lymphocyte depletion therapy in new-onset Addison's disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97: E1927-1932.
 162. Gan EH, MacArthur K, Mitchell AL, Hughes BA, Perros P, Ball SG, James RA, Quinton R, Chen S, Furmaniak J, Arlt W, Pearce SHS. (2014) Residual adrenal function in autoimmune Addison's disease: improvement after tetracosactide (ACTH1-24) treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99: 111–118.
 163. van Oosten M, Dolhain R, Koper J, van Rossum E, Emonts M, Han K, Wouters J, Hazes J, Lamberts S, Feelders R. (2010) Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene that modulate glucocorticoid sensitivity are associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 12: R159.
 164. Ross IL, Levitt NS, Van der Merwe L, Schatz D a, Johannsson G, Dandara C, Pillay TS, Blom DJ. (2013) Investigation of glucocorticoid receptor polymorphisms in relation to metabolic parameters in Addison's disease. *Eur. J. Endocrinol.* 168: 403–412.
 165. Paterson JM, Morton NM, Fievet C, Kenyon CJ, Holmes MC, Staels B, Seckl JR, Mullins JJ. (2004) Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression

- of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 7088–7093.
166. Masuzaki H, Yamamoto H, Kenyon CJ, Elmquist JK, Morton NM, Paterson JM, Shinyama H, Sharp MGF, Fleming S, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS. (2003) Transgenic amplification of glucocorticoid action in adipose tissue causes high blood pressure in mice. *J. Clin. Invest.* 112: 83–90.
167. do Nascimento FV, Piccoli V, Beer MA, von Frankenberg AD, Crispim D, Gerchman F. (2015) Association of HSD11B1 polymorphic variants and adipose tissue gene expression with metabolic syndrome, obesity and type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *Diabetol. Metab. Syndr.* 7: 38.

X. Saját publikációk jegyzéke

1. A dolgozat témájában megjelent közlemények

1. Molnar A, Patocs A, Liko I, Nyiro G, Racz K, Toth M, Sarman B. (2018) An unexpected, mild phenotype of glucocorticoid resistance associated with glucocorticoid receptor gene mutation case report and review of the literature. BMC Medical Genetics, 19(1):37.
2. Molnar A, Kovesdi A, Szucs N, Toth M, Igaz P, Racz K, Patocs A. (2016) Polymorphisms of the GR and HSD11B1 genes influence body mass index and weight gain during hormone replacement treatment in patients with Addison's disease. Clin. Endocrinol., 85(2):180-188.
3. Molnár Á, Kövesdi A, Sarkadi B, Rác K, Patócs A. (2016) A krónikus glükokortikoidhormon-pótlás aktuális kérdései. Magyar Belorvosi Archivum, 69(1):38-45.

2. A dolgozat témájától független publikációk

Nincs ilyen publikáció.

XI. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Patócs Attilának, hogy magasszintű szakmai tudásával, irányításával, értékes tanácsaival, és nem utolsó sorban türelmével terelgette és segítette munkámat.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Rácz Károly professzor úrnak, hogy a Doktori Iskolába történő jelentkezésemet támogatta, hogy a II.sz. Belgyógyászati Klinika Endokrin Genetikai Laboratóriumában dolgozhattam, hogy magasszintű szaktudásával, értékes tanácsaival, valamint a betegellátásban tanúsított példa értékű emberi magatartásával munkámat végig segítette.

Köszönöm Dr. Igaz Péter professzor úrnak és Dr. Tóth Miklós professzor úrnak, a II.sz. Belgyógyászati Klinika jelenlegi és előző igazgatóinak, hogy kutatómunkámat mindvégig támogatták.

Köszönöm Dr. Tulassay Zsolt és Dr. Tulassay Tivadar professzor uraknak, a Klinikai Orvostudományok Doktori Program előző és jelenlegi vezetőinek, hogy PhD tanulmányaimat a Semmelweis Egyetemen végezhettem.

Köszönettel tartozom Dr. Tóth Miklós professzor úrnak, Dr. Igaz Péter professzor úrnak és Dr. Szücs Nikolette egyetemi adjunktus asszonynak a kutatásomhoz szükséges beteganyag gyűjtésében és a felmerülő szakmai kérdések terén nyújtott rengeteg tanácsért, segítségért.

Szeretném megköszönni Dr. Sármán Beatrix egyetemi adjunktus asszonynak az esetismertetéssel kapcsolatos betegvizitek megszervezését, a betegadatok gyűjtésében és rendszerezésében nyújtott segítséget, az esettel kapcsolatos és egyéb, endokrinológiai témában felmerülő kérdések terén nyújtott messzemenő szakmai segítségét és - nem utolsó sorban – baráti támogatását.

Szeretnék köszönetet mondani a II.sz. Belgyógyászati Klinika endokrinológiai munkacsoportjában dolgozó valamennyi klinikusnak a szakmai és baráti támogatásáért. Külön köszönet illeti Dr. Pusztai Pétert, aki felkeltette az

érdeklődésemet az endokrinológia iránt, és nap mint nap példával jár előttem mind szakmailag, mind emberileg.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Nyirő Gábor posztdoktor kutatónak a számtalan önzetlen, különösen a Sanger szekvenálás során nyújtott technikai segítségért, hogy módszertani kérdésekkel bármikor fordulhattam hozzá, valamint hogy türelemmel és barátsággal segítette a munkámat.

Köszönöm Dr. Likó Istvánnak a három dimenziós protein modellezésben nyújtott segítséget.

Köszönöm az Endokrin Genetikai Laboratórium további posztdoktor kutatóinak (Dr. Butz Henriett, Dr. Doleschall Márton, Dr. Grolmusz Vince), volt és jelenlegi PhD hallgatóinak (Dr. Feldman-Kovács Karolina, Dr. Stark Júlia, Dr. Marczell István, Dr. Koncz Klára, Dr. Nagy Zoltán, Dr. Nagy Zsolt, Fülöpné Németh Kinga, Dr. Perge Pál, Dr. Kövesdi Annamária, Dr. Sarkadi Balázs, Dr. Decmann Ábel) és Benkő Mariann asszisztensnőnek, hogy mindennapos segítségük mellett jó hangulatban végezhettem a kutatómunkám.

Köszönöm II.sz. Belgyógyászati Klinika Endokrinológiai, Izotóp és Osteodenzitometriai Laboratóriumában dolgozó valamennyi asszisztensnek az adatgyűjtésben nyújtott segítséget, Szabó Rózsának a vérvételi mintavételek lebonyolítását.

Köszönöm TDK munkám témavezetőjének, Dr. Nemeskéri Ágnes egyetemi docens asszonynak, hogy felkeltette érdeklődésemet a kutatás iránt, hogy mind kutatóként, mind tanárként kimagasló munkájával a későbbi kutatómunkámhoz is útravalóul szolgált.

Nem lehetek elég hálás férjemnek, kislányomnak, szüleimnek a végtelen türelmükért, szeretetükért és töretlen biztatásukért! Külön köszönöm testvéremnek, Dr. Molnár Tamásnak, hogy mindemellett a technikai nehézségek áthidalásában is segített.